

На правах рукописи

РЕШЕТНИКОВ ВАСИЛИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**Изменение транскриптома и паттерна распределения
эпигенетической модификации H3K4me3 под действием
раннего постнатального стресса в префронтальной коре
у самцов мышей**

1.5.7 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Новосибирск - 2024

Работа выполнена в лаборатории регуляции экспрессии генов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель:

Бондарь Наталья Петровна, кандидат биологических наук, заведующая сектором молекулярной нейробиологии стресса, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г.Новосибирск

Официальные оппоненты:

1. **Тихонова Мария Александровна**, доктор биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов, ФГБУН «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», г. Новосибирск
2. **Пчелина Софья Николаевна**, доктор биологических наук, руководитель отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий, ФГБОУ высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Ведущая организация:

ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.icgbio.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постнатальный период является важным периодом для завершения нейроэндокринного развития (Lupien et al., 2009). В постнатальный период наблюдается снижение активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, что необходимо для нормального завершения развития мозговых структур и формирования нейрональных связей. Хронические стрессовые воздействия в этот период способны привести к увеличению уровня глюкокортикоидных гормонов в крови. Стресс в ранний период жизни может привести к снижению когнитивных способностей, усилению тревожности, стресс-реактивности и повышает риск развития психопатологий во взрослом возрасте. Однако, несмотря на интенсивное изучение эффектов раннего постнатального стресса, молекулярные механизмы, приводящие к отставленным поведенческим нарушениям, все еще остаются мало исследованными.

Целью данной работы было выявить отставленные эффекты раннего постнатального стресса на поведение взрослых мышей и определить молекулярные последствия данного стресса для префронтальной коры головного мозга на уровне экспрессии генов и распределения гистоновой модификации H3K4me3 как в нормальных условиях развития, так и после предъявления хронического стресса социальных поражений во взрослом возрасте.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить влияние раннего постнатального стресса на индивидуальное и социальное поведение, процессы обучения и памяти у взрослых животных.
2. Определить отсроченное влияние постнатального стресса на транскриптом префронтальной коры головного мозга взрослых самцов мышей.
3. Определить отсроченные эффекты раннего постнатального стресса на полногеномное распределение модификации хроматина H3K4me3 (ChIP-seq) в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей.
4. Оценить влияние раннего постнатального стресса на чувствительность к социальному стрессу во взрослом возрасте по поведенческим показателям, изменениям в транскриптом и распределении гистоновой модификации H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей.

Научная новизна работы

В данной работе впервые был проведен комплексный анализ отставленных эффектов стресса в раннем возрасте на транскриптом и профиль гистоновой модификации H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей. Были найдены значительные изменения в уровне транскрипции генов и лишь небольшие изменения в уровне H3K4me3 в отдельных районах генома, которые не связаны с выявленными изменениями в экспрессии генов.

Кроме того, мы впервые оценили влияние раннего постнатального стресса на чувствительность к хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте на поведенческом уровне, на уровне экспрессии генов (транскриптом) и

распределения гистоновой модификации H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга. Сочетание двух стрессов усиливает изменения в экспрессии ряда генов, связанных с циркадными ритмами, а также изменяет паттерн распределения H3K4me3 в их промоторах.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы

Использованный в данной работе подход позволяет выявить новые гены-мишени и генные пути, изменяющиеся под действием раннего постнатального стресса, хронического стресса социальных поражений и их комбинации, что в сочетании с анализом их регуляторных районов дает более целостное представление об отсроченных эффектах раннего постнатального стресса. Эти результаты вносят вклад в понимание фундаментальных основ молекулярных механизмов стресса в ранний период жизни и его роли в формировании последующей гиперчувствительности к стрессу во взрослом возрасте. Кроме того, результаты могут быть использованы для выбора и разработки терапевтических препаратов, корректирующих отсроченные последствия стресса в раннем возрасте.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ранний постнатальный стресс негативно влияет на активность глутаматной системы в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей C57BL/6 и связанных с ней процессов обучения и памяти – снижает экспрессию генов факторов синаптической пластичности *Pclo* и *Bdnf* и генов *Grin2a* и *Grin2b* ионотропных NMDA рецепторов, а также повышает экспрессию генов белков Mal, Mbp и Ugt8a, участвующих в процессах миелинизации.

2. Сочетание стресса в ранний постнатальный период и социального стресса во взрослом возрасте негативно влияет на активность ключевых генов глутаматной системы *Homer1* и *Sorcs3* в префронтальной коре головного мозга у самцов мышей, а также повышает уровень экспрессии генов *Ciart* и *Dbp*, что связано с нарушениями циркадных ритмов.

Апробация результатов

Результаты данной работы были представлены на 10th IBRO World congress in Neuroscience (Тэгу, Корея, 2019), 11 международной конференции «Биоинформатика и структурная геномика» (Новосибирск, Россия, 2018); 4-й конференции «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пушино, Россия, 2018); международной конференции «Беляевские чтения» (Новосибирск, Россия, 2017); 24 международной мультидисциплинарной конференции «Стресс и поведение» (Санкт Петербург, Россия, 2017); VII Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология живых существ» (Звенигород, Россия, 2016).

Личный вклад автора

Все основные научные результаты были получены автором как самостоятельно, так и совместно с сотрудниками лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦиГ СО РАН: проведены и проанализированы результаты поведенческих тестов, выделены образцы префронтальной коры, и гипоталамуса, приготовлены

библиотеки для RNA-seq и ChIP-seq. Проведен анализ результатов RNA-seq и ChIP-seq. Автор выражает благодарность к.б.н. Н.И. Ершову за биоинформатическую обработку данных; к.б.н. Антонову Е.В. за помощь в хроматографическом анализе уровня кортикостерона; к.б.н. Хоцкину Н.В. за помощь с настройкой и обработкой поведенческих данных с помощью программы EthoStudio.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и заключения, списка литературы (378 источников). Работа изложена на 185 страницах, содержит 26 рисунков, 6 таблиц и 4 приложения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на самцах инбредной линии мышей C57BL/6, содержащихся в условиях конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН. Для комплексной оценки эффектов раннего постнатального стресса на поведение, когнитивные способности, структурные и функциональные изменения, а также молекулярные изменения у самцов мышей в рамках диссертационной работы было проведено 6 независимых друг от друга экспериментов с животными (Рис. 1-2).

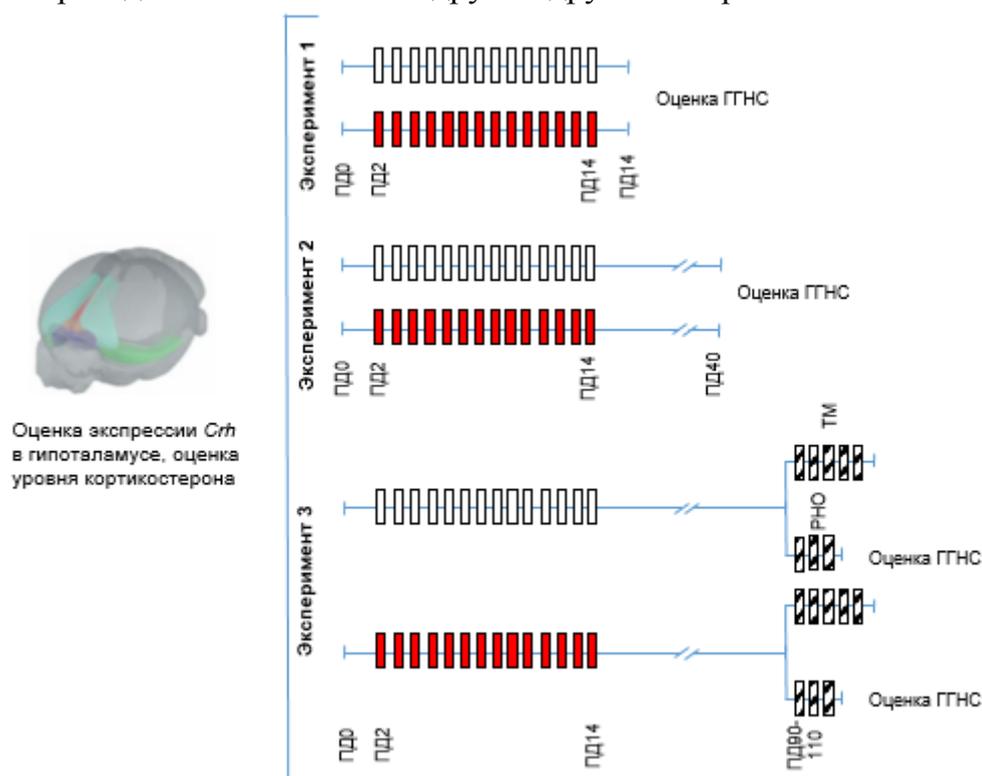


Рисунок 1. Дизайн экспериментов 1-3. ПД- постнатальный день; ТМ – тест Морриса (Morris water maze test); РНО – тест на распознавание нового объекта (novel object recognition test).

В каждом эксперименте использовались самцы мышей с опытом отделения от матери в течение 2-х недель и контрольные животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария. В первом и втором эксперименте было оценено влияние раннего постнатального стресса на показатели активности ГГС у 15-ти дневных детенышей - через сутки после прекращения действия стресса и у подростков на 40-й постнатальный день жизни. Эксперименты 3-6 были проведены на взрослых самцах

мышей (90-110 постнатальный день жизни). В третьем эксперименте у части взрослых животных был оценен индекс надпочечников, экспрессия гена *Crh* в гипоталамусе и уровень кортикостерона в сыворотке крови, в то время как у другой части животных были оценены параметры обучения и памяти в тесте на распознавание нового объекта (novel object recognition test) и тесте водного лабиринта Морриса (Morris water maze test). В экспериментах 4 и 5 (Рис. 2) у взрослых животных с опытом раннего постнатального стресса были оценены параметры индивидуального поведения (уровень тревожности, исследовательская и двигательная активность) и параметры социального поведения. После оценки поведения в эксперименте 4 на образцах префронтальной коры головного мозга мышей был проведен транскриптомный анализ (RNA-seq), а в эксперименте 5 на образцах префронтальной коры головного мозга мышей был проведен анализ распределения модификации активного хроматина H3K4me3 с последующим секвенированием в рамках всего генома (ChIP-seq). В заключительном 6-м эксперименте были 3 экспериментальные группы:

- Мыши, подвергнутые длительному отделению в детстве и хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте (ДО+СС группа)

- Мыши, подвергнутые только хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте без истории стресса в постнатальном периоде (СС группа)

- Контрольные животные, не подвергнутые стрессу (К группа)

В этом эксперименте были оценены параметры индивидуального поведения (уровень тревожности), параметры социального поведения и депрессивно-подобного поведения. На образцах префронтальной коры этих животных был проведен как транскриптомный анализ (RNA-seq), так и иммунопреципитация хроматина с антителами к модификации H3K4me3 с последующим секвенированием (ChIP-seq). Следует отметить, что в данном эксперименте как RNA-seq, так и ChIP-seq анализ был проведен на одних и тех же гомогенатах префронтальной коры, что позволило, в дальнейшем, сопоставить результаты этих двух анализов и провести корреляционный анализ между изменениями интенсивности пиков H3K4me3 и уровнем экспрессии гена.

Процедура раннего постнатального стресса. Во всех экспериментах использовалась модель длительного отделения (ДО) детенышей от матерей на 3 часа в день со 2 по 14 день постнатального развития. Детенышей из гнезда перемещали в контейнеры с перегородками, чтобы изолировать друг от друга, где поддерживалась постоянная температура 30-33 °С.

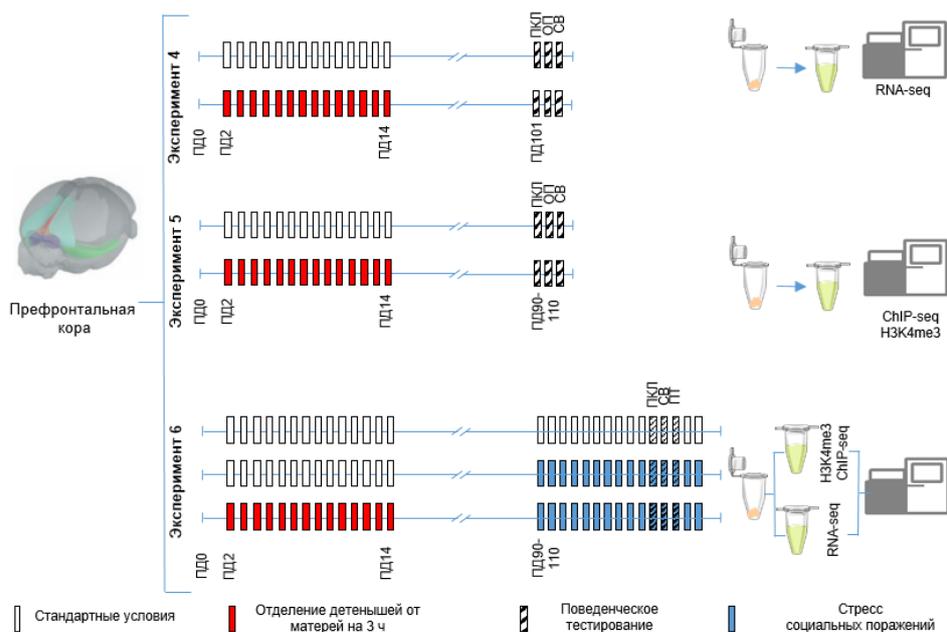


Рисунок 2. Дизайн экспериментов 4-6. ПД- постнатальный день; ПКЛ- тест приподнятого крестообразного лабиринта; ОП – тест «открытое поле»; СВ – тест социального взаимодействия; ПТ – тест Порсолта.

Хронический стресс социальных поражений. Для получения мышей с опытом социальных поражений использовали модель сенсорного контакта (Kudryavtseva et al., 1991) с некоторыми модификациями (Bondar et al., 2018). Мышей размещали в металлической клетке, разделенной пополам перфорированной прозрачной перегородкой. По одну сторону перегородки помещали самца линии C57BL/6, по другую - самца CD1, того же возраста, но более тяжелого по весу (на 3-5 г). Ежедневно на три минуты убирали перегородку и в это время происходила агонистическая конфронтация животных. Стрессирование проводили в течение 15 дней.

Поведенческие тесты. В работе были использованы тест открытого поля и тест приподнятого крестообразного лабиринта для оценки двигательной активности и уровня тревожности. Для оценки социального поведения был использован тест социальных взаимодействий. Для оценки депрессивно-подобного поведения был использован тест вынужденного плавания (тест Порсолта). Для оценки обучения и памяти был использован тест водного лабиринта Морриса и тест на распознавание нового объекта.

Анализ уровня кортикостерона. Анализ уровня кортикостерона в сыворотке крови проводили с помощью коммерческого набора Corticosterone ELISA Kit («Enzo Life Sciences Inc.», США). Анализ уровня кортикостерона в надпочечниках был оценен с помощью хроматографии.

Оценка экспрессии генов с помощью количественного ПЦР анализа. Для оценки экспрессии использовали ПЦР в режиме реального времени.

Имунопреципитация хроматина с использованием антител к H3K4me3. Для иммунопреципитации хроматина использовался метод нативной иммунопреципитации (без фиксации формальдегидом), который подходит для гистонов и позволяет получить более высокое разрешение пиков при секвенировании (Huang et al., 2006).

Подготовка библиотек для секвенирования. Образцы префронтальной коры использовали для анализа RNA-seq и ChIP-seq. Библиотеки готовили в соответствии с протоколами New England Biolab (NEB, UK). Секвенирование проводили на платформе Illumina HiSeq 4000 (ЗАО «Евроген», Россия).

Биоинформатический анализ данных секвенирования. Обработка данных секвенирования проводилась к.б.н. Ершовым Н.И. Анализ RNA-seq проводился с помощью Trimmomatic (v0.36), hisat2 (v2.1.0), PicardTools (v2.4.1), FeatureCounts (v1.5.2), DESeq2 (v1.16.1). В качестве референсного генома была использована версия GRCm38/mm10. Оценку качества данных проводили с помощью пакета программ SortSam, MarkDuplicates и CollectRnaSeqMetrics.

Анализ ChIP-seq проводился с помощью Bowtie2, MACS2, DESeq2 (v1.16.1). Значимыми принимались различия при пороге достоверности дифференциальной экспрессии $p\text{-value} \leq 0,1$ после коррекции на множественные сравнения методом Бенджамини-Хохберга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период не влияет на базальную активность ГНС у самцов мышей различных возрастов

Мы оценили экспрессию гена *Crh* в гипоталамусе, уровень кортикостерона в сыворотке крови и относительный вес надпочечников у детенышей (ПД15), подростков (ПД40) и взрослых (ПД90) самцов мышей C57BL/6. Несмотря на то, что уровень кортикостерона в ДО группе был несколько выше во всех временных точках по сравнению с контролем, мы не нашли значимых различий между группами ни по одному из исследуемых параметров. Таким образом, длительное отделение от матерей в раннем возрасте не повлияло на базальную активность ГНС. Данные литературы по отставленным во времени эффектам длительного отделения детенышей от матерей на базальное состояние ГНС противоречивы. Большинство исследований на мышах не находят влияния на базальный уровень кортикостерона или экспрессию *Crh* в гипоталамусе, однако такие эффекты находят у крыс (van Bodegom et al., 2017). Таким образом, одна из возможных причин появления противоречивых результатов может заключаться в зависимости эффектов от вида животного (мышь или крыса).

Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к снижению двигательной активности и нарушению пространственной памяти у взрослых самцов

Наши результаты показали, что длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит у взрослых животных к снижению двигательной и исследовательской активности, а также нарушению пространственной памяти и распознавания новых объектов, но не влияет на параметры тревожности, социального поведения и скорость обучения (Рис 3-4). Таким образом, длительное отделение от матерей в раннем возрасте приводит к выраженным эффектам на поведение взрослых животных. Недавний мета-анализ показал, что ранний

постнатальный стресс усиливает тревожное поведение в тесте приподнятого крестообразного лабиринта у крыс, но не у мышей (Wang et al., 2020). С другой стороны, как показано в другом мета-анализе, различные типы стресса в раннем возрасте вызывают сходные когнитивные нарушения в задачах, зависящих от дорсального гиппокампа и префронтальной коры, таких как тест водного лабиринта Морриса и тест распознавания новых объектов, как у мышей, так и у крыс (Rocha et al., 2021). Влияние раннего постнатального стресса на другие поведенческие характеристики, такие как социальное поведение непоследовательны (Loi et al., 2017; Tractenberg et al., 2016).

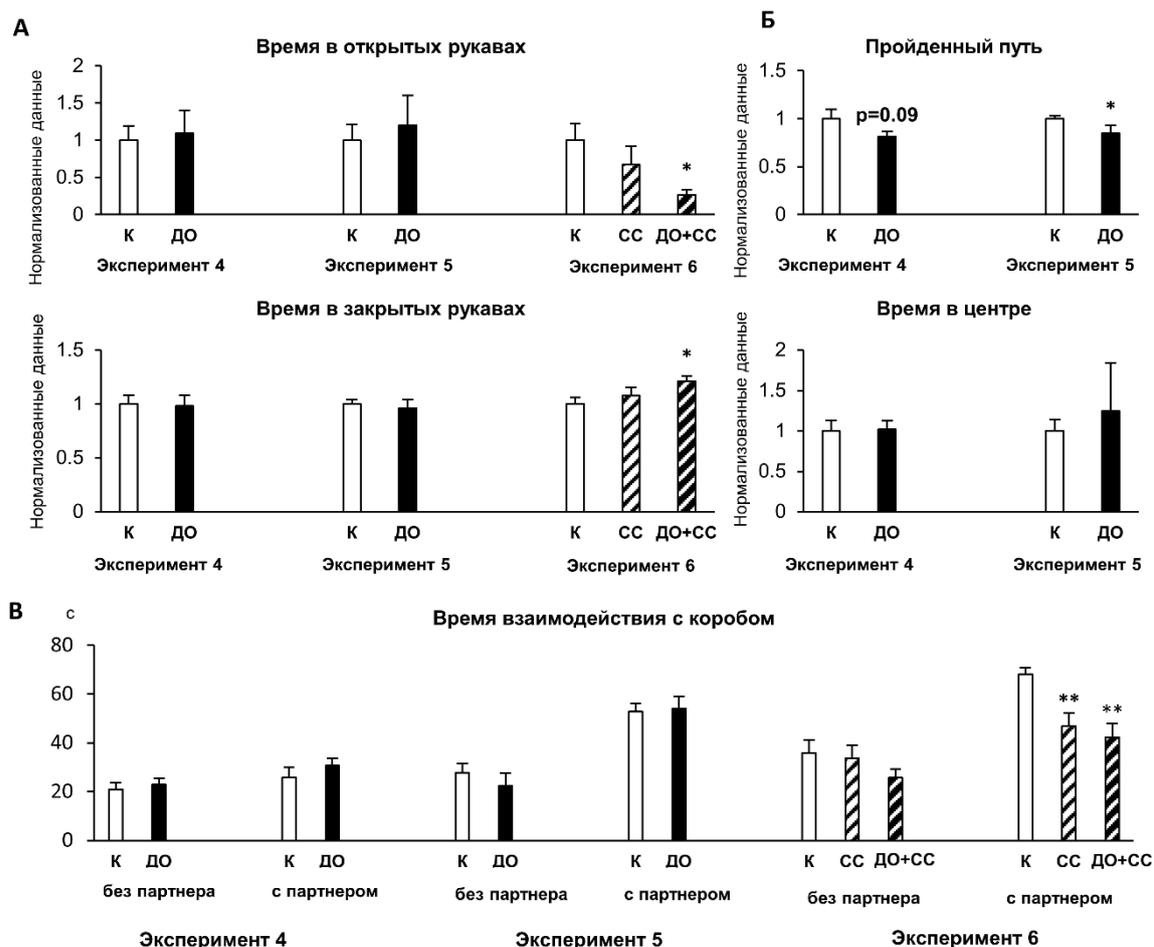


Рисунок 3. Оценка параметров индивидуального и социального поведения у взрослых самцов C57BL/6 историей раннего постнатального стресса. А. Результаты по времени нахождения животных в открытых и закрытых рукавах в тесте приподнятого крестообразного лабиринта; Б. Параметры теста «открытое поле»; В. Время взаимодействия с коробом с партнером и без партнера в тесте социального взаимодействия. На рисунках А-Б данные по каждой группе были нормализованы на среднее значение по контрольной группе. Данные представлены как нормализованные значения \pm ошибка среднего; На рисунке В представлены абсолютные значения в секундах (средние значения \pm ошибка среднего). К – контроль, ДО – группа с длительным отделением в детстве; СС – группа, подвергнутая стрессу социальных поражений в течение 10 дней; ДО+СС – группа с историей стресса в ранний постнатальный период и подвергнутая стрессу социальных поражений в течение 10 дней во взрослом возрасте. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ в сравнении с

контрольной группой (post hoc анализ с использованием критерия Fisher's LSD). В каждой группе было по 6-12 животных.

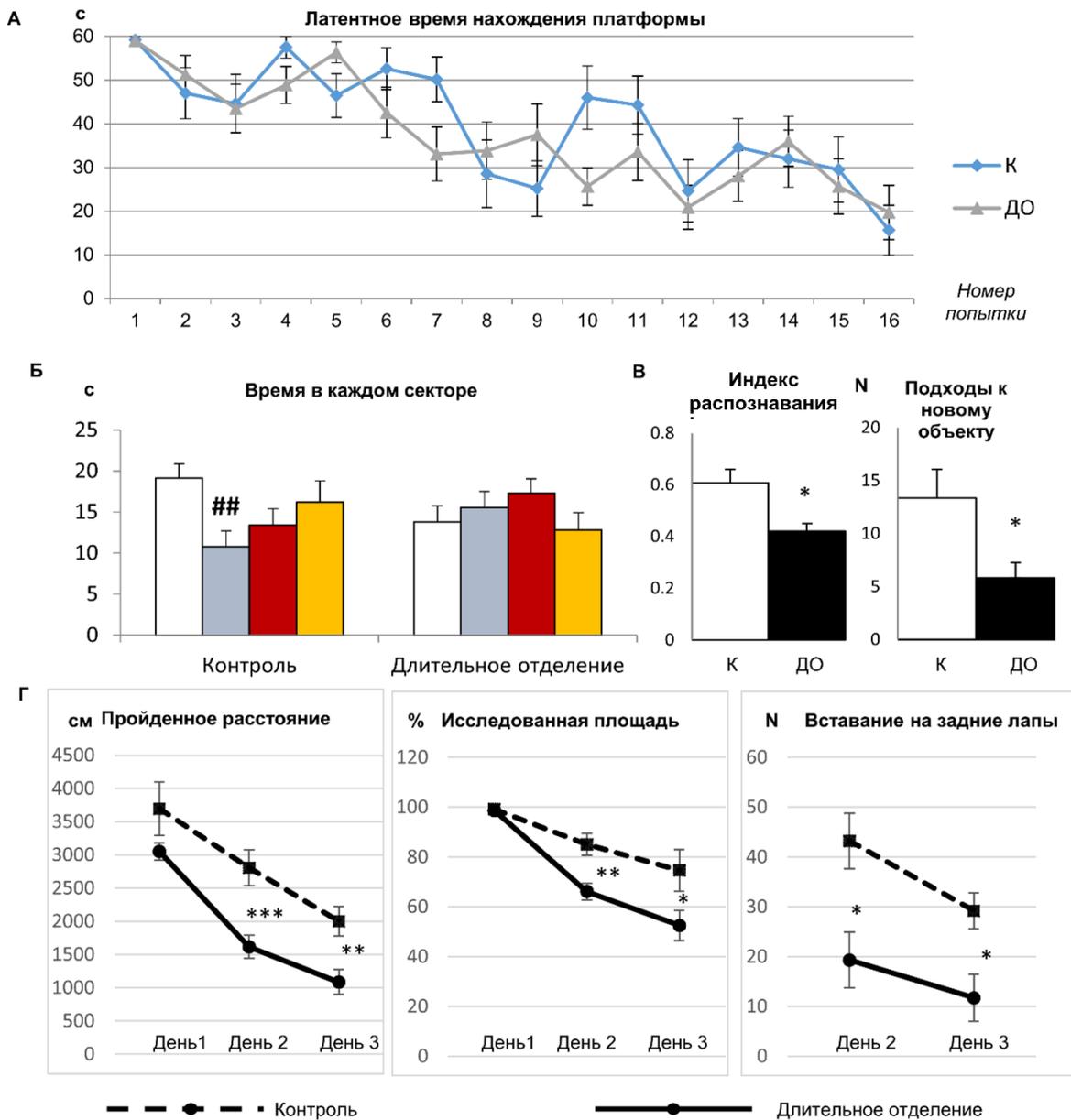


Рисунок 4. Результаты поведенческих тестов на обучение и память. А. Латентное время нахождения платформы в 16-ти последовательных сеансах в тесте водного лабиринта Морриса. Б. Время нахождения в каждом из секторов в итоговом тесте без платформы. Белым цветом указан целевой сектор; красным – противоположный; серым и желтым два других сектора. В. Индекс распознавания и количество подходов к новому объекту в тесте на распознавание нового объекта. Г. Параметры двигательной и исследовательской активности в тесте на распознавание нового объекта. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего; К – контроль, ДО – группа с длительным отделением от матерей в раннем возрасте. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ в сравнении с контрольной группой; ## - $p < 0.01$ по сравнению с целевым сектором. В группах было по 6-12 животных.

Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к выраженным изменениям в экспрессии генов и умеренным изменениям профиля H3K4me3 в префронтальной коре у взрослых самцов

Анализ транскриптома префронтальной коры головного мозга взрослых животных позволил нам выявить гены с измененным уровнем экспрессии у группы ДО по сравнению с контрольной группой. Мы обнаружили, что под влиянием раннего постнатального стресса изменяется экспрессия 648 генов. Среди дифференциально экспрессирующихся (ДЭ) генов были гены глутаматной (*Gria2*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Homer1*) и ГАМК-ергической (*Gabrb2*, *Gabarapl2*) нейромедиаторных систем. Кроме того, среди ДЭ были гены, связанные с регуляцией направления роста аксонов и клеточного распознавания (*Cdh23*, *Pcdh15*, *Cdh13*) и межклеточным сигналингом (*Efnb3*). Также в группе ДО мы обнаружили снижение экспрессии нейротрофического фактора мозга *Bdnf*. Помимо генов нейрональной пластичности, после ДО в раннем возрасте у взрослых животных наблюдалось усиление экспрессии различных генов рибосомальных белков (*Rplp1* и *Rplp2*, *Rpl10*, *Rpl4l*, *Rps3*, *Mrpl28*, *Mrpl52*, *Rps*, *Rpl*). По всей вероятности, это свидетельствует об интенсификации процессов трансляции. Несмотря на то, что эти процессы являются энергозатратными, их активация, по-видимому, необходима для адаптации на клеточном уровне. Другим большим кластером ДЭ генов были гены, связанные с процессами миелинизации. Мы нашли, что в ДО группе была повышена экспрессия генов *Mal*, *Pllp*, *Plp1*, *Mbp*, *Mag*, кодирующих белки, являющиеся структурными компонентами миелиновых оболочек, и генов *Cal3st11*, *Fa2h*, *Ugt8a*, кодирующие ферменты синтеза липидных компонентов миелиновой оболочки. Результаты по усилению экспрессии генов миелинизации у ДО группы являются неожиданным, поскольку обычно воздействие стресса ассоциировано со снижением процессов миелинизации (Antontseva et al., 2020).

Анализ профиля активного хроматина в префронтальной коре взрослых животных с историей раннего постнатального стресса выявил изменения только в 45 пиках H3K4me3, относящихся к 70-ти генам. Причем плотность распределения H3K4me3 во всех обогащенных пиках была выше в группе ДО. Среди генов, промоторные области которых оказались дифференциально обогащены пиками H3K4me3, несколько генов было связано с глутаматной системой (*Grm3*, *Sdf2*, *Pclo*, *Pip4k2a*). Среди других генов можно выделить гены *Arl6ip6*, *March1* и *Wasl*, белковые продукты которых регулируют формирование и поддержку дендритных шипиков (Jain et al., 2014; Li et al., 2013; Miyazaki et al., 2005), а также *Zfp608*, *Flrt2* и *Atad2b*, белковые продукты которых участвуют в аксоногенезе, дифференцировке и миграции нейронов (Ayoub et al., 2011; Jackson et al., 2015; Leachman et al., 2010). Среди 45 генов нами были выбраны 11 генов для анализа экспрессии методом ПЦР, и только 3 (*Pip4k2a*, *Ndr3* и *Ddias*) из 11 генов показали усиление экспрессии в ДО группе, что согласуется с увеличением плотности распределения H3K4me3 в их промоторных регионах.

Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что изменение профиля H3K4me3 в ДО группе носит не случайный характер, а наблюдается в промоторах генов, связанных между собой.

Сопоставление 649 ДЭ генов, полученных на основе анализа транскриптома, и 70 генов с измененными профилями H3K4me3 показало, что только 4 гена (*Tuba1a*, *Pclo*, *Rbm5*, *Cst3*) пересекаются между двумя этими списками генов. Интересно, что экспрессия 2 генов (*Tuba1a* и *Cst3*) была увеличена в группе ДО, так же, как и профиль H3K4me3 в их промоторном регионе. В то же время экспрессия *Pclo*, *Rbm5* была снижена в группе ДО, тогда как профиль H3K4me3 в их промоторном регионе увеличен (Рис 5).

Tuba1a кодирует α -тубулин, который играет ключевую роль в формировании микротрубочек аксонов и развитии нейронов (Aiken et al., 2017). *Cst3* кодирует секретлируемый белок массой 14 кДа цистатин С, который является ингибитором цистеиновых протеаз и ингибирует семейство лизосомальных протеаз (Deng et al., 2001). *Cst3* выполняет нейропротекторную функцию и участвует в восстановлении нервной системы при нейротоксических состояниях и нейродегенерации (Perez-Gonzalez et al., 2019). Изменения экспрессии и секреции *Cst3* в головном мозге наблюдались на моделях болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях (Gauthier et al., 2011; Korolenko, 2020).

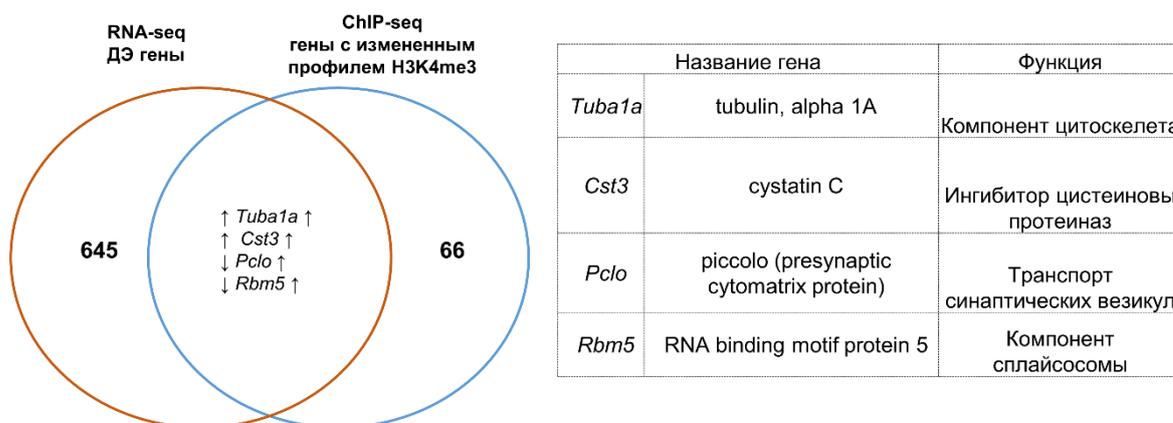


Рисунок 5. Сопоставление данных ChIP-seq и RNA-seq на префронтальной коре головного мозга.

Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к повышению чувствительности к хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте

В нашем исследовании мы обнаружили, что стресс в раннем возрасте модулирует эффекты хронического стресса социальных поражений во взрослом возрасте. У взрослых самцов мышей с историей стресса в ранний постнатальный период в ответ на дополнительный стресс наблюдается более выраженное повышение уровня кортикостерона и повышение уровня тревожности, чем у животных только с хроническим стрессом, а также специфические изменения в экспрессии генов, в альтернативном сплайсинге и в распределении модификации

хроматина H3K4me3 в префронтальной коре (Рис.6). Среди генов с повышенной экспрессией, которые показали изменения экспрессии только в группе ДО+СС, мы выявили гены *Ciart* и *Dbp*, кодирующие факторы транскрипции из семейства ключевых регуляторов циркадианного ритма (Takahashi, 2017). В настоящее время общепризнано, что многие психические расстройства, вызванные стрессом, характеризуются нарушениями циркадных ритмов, поскольку циркадные часы и система реакции на стресс тесно взаимосвязаны и реципрокно регулируются (Landgraf et al., 2014; Rao and Androulakis, 2019). Учитывая, что экспрессия генов, кодирующих ключевые компоненты, регулирующие циркадный ритм, не изменилась в группе ДО без предъявления дополнительного стресса, наблюдаемая повышенная экспрессия *Ciart* и *Dbp* у мышей с ДО+СС вероятно связана именно с хроническим стрессом социальных поражений и может свидетельствовать о нарушениях гомеостаза циркадианных ритмов.

Кроме того, в группе ДО+СС, как и в группе ДО, была снижена экспрессия гена сортилин-родственного рецептора (*Sorcs3*), который вместе с *Homer1* является регулятором функций рецептора глутамата (Christiansen et al., 2017). Исследования на людях показали, что однонуклеотидные полиморфизмы в генах *HOMER1* и *SORCS3* коррелируют с предрасположенностью к депрессии и другим психопатологиям (Howard et al., 2019; Rietschel et al., 2010). Кроме того, отмечено снижение экспрессии генов, продукты которых связаны с регуляцией концентрации кальция в цитозоле и эндоплазматическом ретикулуме (*Smoc1* и *Stim2*).

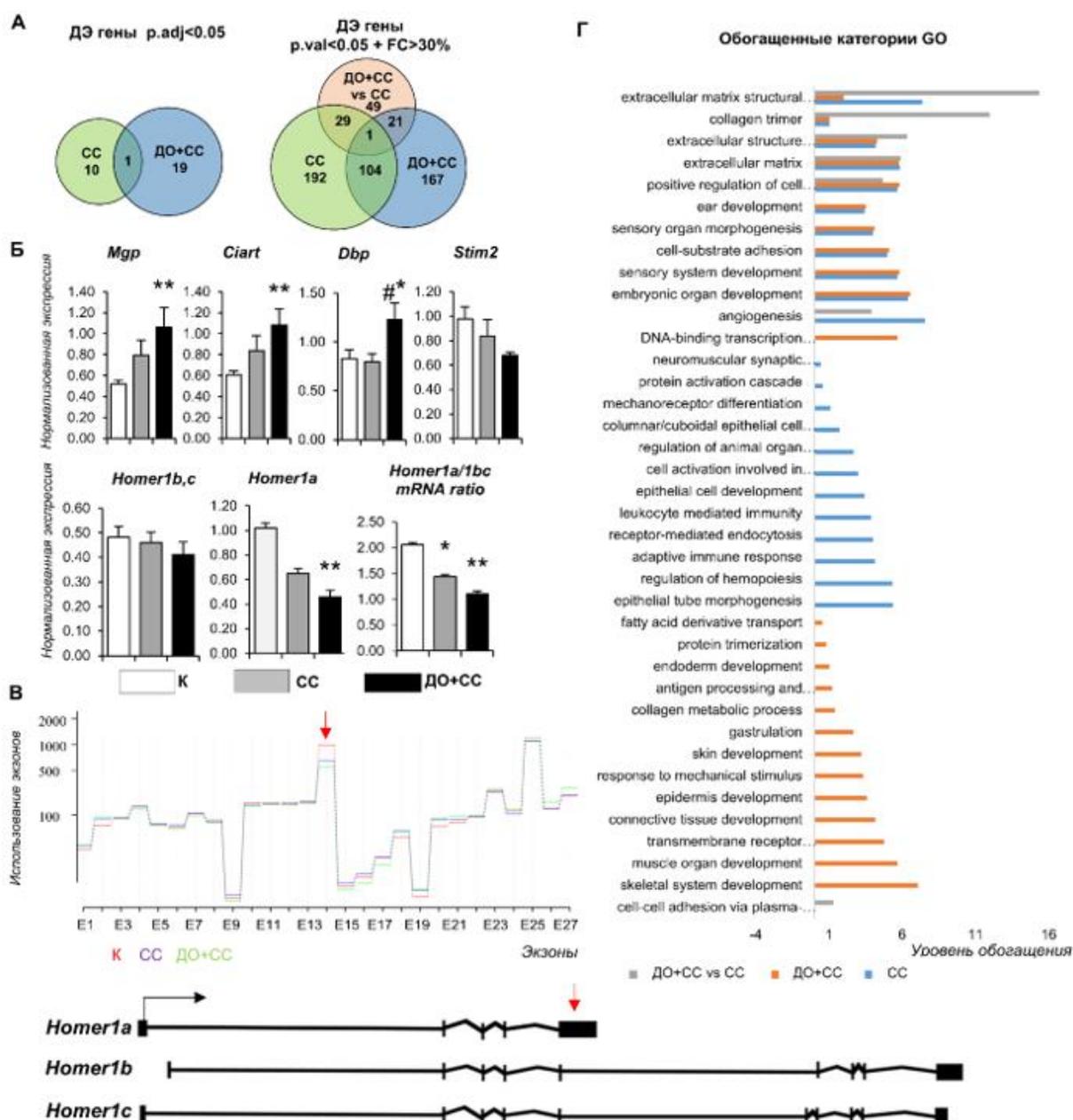


Рисунок 6. Влияние стресса социальных поражений на экспрессию генов. А. Диаграммы Венна для ДЭ генов с порогом ($p_{adj} < 0,05$) и ДЭ генов с порогом ($p < 0,05$ и $FC > 30\%$). Б. Результаты количественного ПЦР-анализа генов *Mgp*, *Ciart*, *Dbp* и *Stim2* и транскриптов *Homer1*. Данные по экспрессии генов были оценены как $\Delta\Delta Ct$, в качестве гена домашнего хозяйства был использован ген *Actb*. Данные по каждой группе были нормализованы на среднее значение по контрольной группе. Данные представлены как нормализованные значения \pm ошибка среднего. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; # $p < 0,05$ по сравнению с группой СС. По 7-8 животных в группе. В. Представленность экзонов *Homer1* в различных группах на основе анализа DEXSeq. По оси абсцисс показаны названия фрагментов экзонов, а по оси ординат – среднее нормализованное количество каждого фрагмента по группе. Красная стрелка указывает на фрагмент экзона (расположенный в 5-м экзоне), который дифференциально представлен в разных группах. Г. Анализ обогащения ДЭ генов в разных группах в категориях GO.

Наиболее интересный результат был получен по гену *Homer1*. Анализ экспрессии его различных транскриптов позволяет предположить, что группа

ДО+СС характеризуется более низкой экспрессией *Homer1* из-за специфического подавления транскрипта *Homer1a*. Увеличение экспрессии *Homer1a* приводит к подавлению long-term potentiation, (LTP), *Homer1a*-опосредованные изменения (downscaling) являются обратимыми и менее выраженными с точки зрения подавления синаптической передачи, чем long-term depression (LTD) или депотенциация (Jones, 2017). Таким образом, по всей видимости, именно возможность быстрой адаптации синапсов благодаря *Homer1a*-зависимому ремоделингу постсинаптической плотности в ответ на различные стимулы обеспечивает устойчивость к стрессовым воздействиям. Это происходит за счет синаптической реорганизации и предотвращения более сильного ингибирования синаптической передачи в нейронных сетях (Рис. 7), которые участвуют в ответе на стресс или ответственны за психоэмоциональное состояние. Этот механизм может быть нарушен у группы ДО+СС, у которой показано снижение экспрессии *Homer1a* и, по всей видимости, именно это может быть причиной, наблюдаемой у них повышенной чувствительности к социальному стрессу.

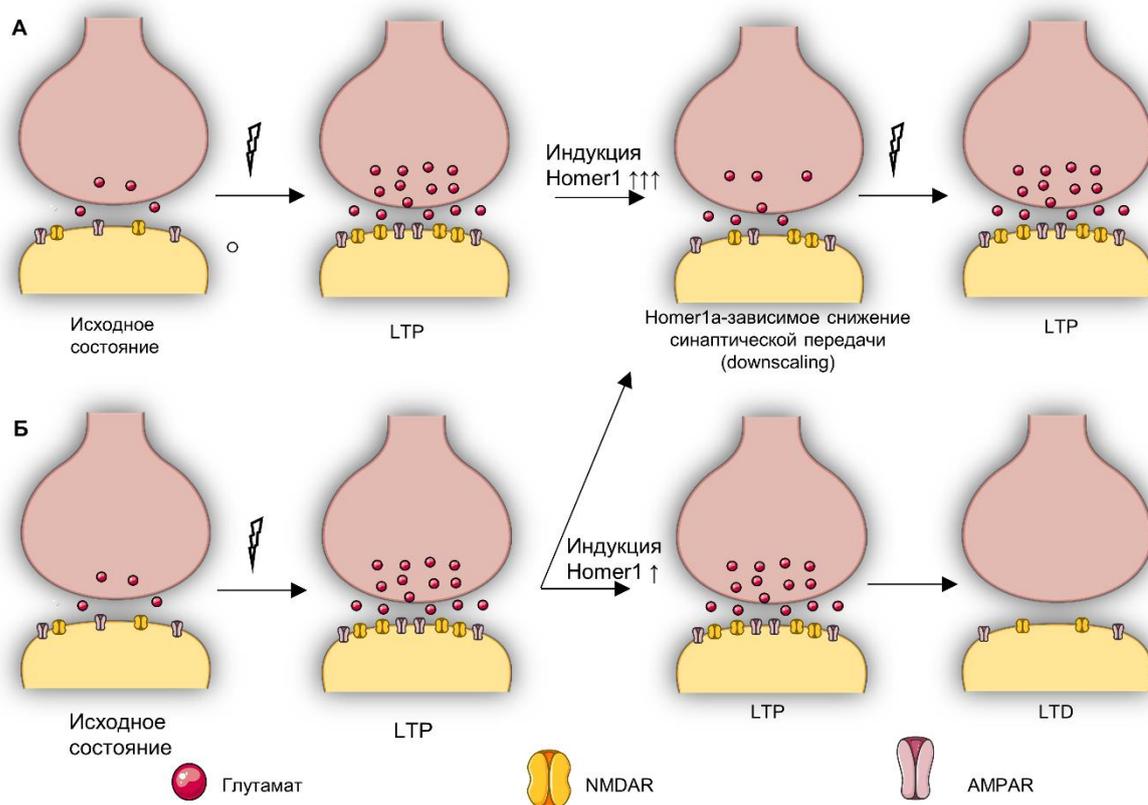


Рисунок 7. Предполагаемая роль *Homer1a* зависимого ремоделинга в устойчивости к стрессу и синаптической передачи

А. При высоком уровне индукции *Homer1a* (↑↑↑) в ответ на долговременную потенциацию (long-term potentiation, LTP) происходит обратимое подавление синаптической передачи (downscaling) необходимое для защиты клетки от чрезмерной активации глутаматергической передачи и адаптации клетки для последующей LTP. Эта модель характерна для устойчивых индивидуумов или непродолжительного стрессового воздействия. **Б.** При низком уровне индукции *Homer1a* (↑) в ответ на LTP лишь в части синапсов наблюдается *Homer1a* зависимое подавление активности (downscaling), другие синапсы продолжают находиться в состоянии LTP, после чего неизбежно наступает фаза

долговременной депрессии (long-term depression, LTD), которая сопровождается более глубоким ингибированием синаптической передачи. Эта модель характерна для чувствительных индивидуумов или ситуации хронического стресса.

В нашей работе мы обнаружили, что хронический стресс социальных поражений вызывает лишь незначительные изменения в распределении H3K4me3 в промоторах генов в рамках всего генома. Кроме того, в большинстве промоторов изменения профиля распределения H3K4me3 затрагивали только пики в одиночных нуклеосомах. Функциональное значение такого изменения остается неясным, поскольку изменения уровней H3K4me3 в промоторах генов слабо коррелировало с их экспрессией. Данные по умеренному влиянию социального стресса на распределение плотности H3K4me3 совпадали с результатами, полученным на префронтальной коре взрослых животных с опытом раннего постнатального стресса без предъявления дополнительного стресса во взрослом возрасте.

Мы обнаружили, что среди всех выявленных пиков H3K4me3 с дифференциальной плотностью распределения ($p < 0.05$, $FC > 1.3$) только 25 пиков находились в промоторных регионах ДЭ генов хотя бы в одной из исследуемых групп, причем профиль H3K4me3 в этих пиках изменяется в одном направлении с транскрипцией гена. Мы полагаем, что изменение уровней H3K4me3 в промоторной области этих генов связано с уровнем их экспрессии. Тем не менее, эти гены не образуют единой функциональной сети. Следует отметить, что среди этих генов есть два (*Dbp* и *Sorcs3*), которые специфически изменяли экспрессию только в группе ДО+СС. Продукты этих генов участвуют в регуляции циркадных ритмов и передаче сигналов глутамата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые была произведена комплексная оценка молекулярных изменений в рамках всего генома в префронтальной коре взрослых самцов мышей, как только с опытом раннего постнатального стресса, так и после предъявления дополнительного хронического стресса социальных поражений во взрослом возрасте. Проведенный анализ транскриптомных изменений позволил выявить отставленные во времени эффекты раннего постнатального стресса на гены синаптической пластичности, глутаматной, ГАМКэргической систем и процессы миелинизации. Анализ профиля H3K4me3 позволил выявить отставленные во времени эпигенетические эффекты раннего постнатального стресса. И хотя количество генов с измененной плотностью распределения H3K4me3 было небольшим, в сочетании с транскриптомным анализом эти данные позволяют сопоставить молекулярные изменения с наблюдаемыми поведенческими нарушениями. Проведенные в нашей работе несколько независимых поведенческих экспериментов позволили установить, что взрослые самцы мышей с историей раннего постнатального стресса демонстрируют снижение двигательной, исследовательской активности, а также нарушение пространственной памяти и памяти распознавания нового объекта.

Предъявление дополнительного стресса во взрослом возрасте животным с историей раннего постнатального стресса привело к усилению тревожности, а также к более сильному подъему уровня кортикостерона. У животных с комбинацией стрессов наблюдались специфические изменения в транскриптом и профиле H3K4me3. В частности, только у животных с комбинацией стрессов была изменена экспрессия ключевых генов глутаматной системы *Homer1*, *Sorcs3* и циркадных ритмов – *Ciart*, *Dbp*. Кроме того, в промоторах генов *Dbp* и *Sorcs3* также был изменен профиль H3K4me3.

Таким образом, проведенный нами анализ позволил установить гены, генные сети и эпигенетические изменения профиля H3K4me3 в промоторных регионах, связанные с ранним постнатальным стрессом и хроническим стрессом социальных поражений.

ВЫВОДЫ

1. Ранний постнатальный стресс у самцов мышей C57BL/6 привел к поведенческим нарушениям и вызвал изменения экспрессии 648 генов в префронтальной коре взрослых животных, в том числе связанных с глутаматной системой, синаптической пластичностью и процессами миелинизации.
2. Ранний постнатальный стресс у самцов мышей C57BL/6 привел лишь к небольшим изменениям в уровне гистоновой модификации H3K4me3 в отдельных районах генома в префронтальной коре взрослых животных и эти изменения не были связаны с выявленными изменениями в экспрессии генов.
3. Ранний постнатальный стресс у самцов мышей C57BL/6 привел к повышенной чувствительности к хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте и измененному профилю транскрипции ключевых генов циркадных ритмов *Ciart*, *Dbp* и гена скаффолда – *Homer1* в префронтальной коре.
4. Сочетание стресса в ранний постнатальный период и стресса социальных поражений во взрослом возрасте у самцов мышей C57BL/6 приводит к изменению в плотности распределения гистоновой модификации H3K4me3 в промоторных регионах небольшого количества генов, среди которых важную роль играют гены циркадных ритмов *Per1*, *Dbp*, *Nr1d1*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Reshetnikov, V. V.**, Ayriyants, K. A., Ryabushkina, Y. A., Sozonov, N. G., & Bondar, N. P. (2021). Sex-specific behavioral and structural alterations caused by early-life stress in C57BL/6 and BTBR mice. *Behavioural Brain Research*, 414, 113489. (IF=3.32)
2. **Решетников В.В.**, Бондарь Н.П. Роль изменений экспрессии *Homer1* в чувствительности к стрессу. *Биохимия* 2021. – Т. 86. – №. 6. – С. 755-770. Перевод: **Reshetnikov V. V.**, Bondar N. P. The Role of Stress-Induced Changes of *Homer1* Expression in Stress Susceptibility // *Biochemistry (Moscow)*. – 2021. – Т. 86. – №. 6. – С. 613-626. (IF=2.48)

3. **Reshetnikov, V. V.**, Kisaretova, P. E., Ershov, N. I., Merkulova, T. I., & Bondar, N. P. (2021). Social defeat stress in adult mice causes alterations in gene expression, alternative splicing, and the epigenetic landscape of H3K4me3 in the prefrontal cortex: an impact of early-life stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 106, 110068. (IF=5.06)
4. **Reshetnikov, V.**, Ryabushkina, Y., Kovner, A., Lepeshko, A., & Bondar, N. (2020). Repeated and single maternal separation specifically alter microglial morphology in the prefrontal cortex and neurogenesis in the hippocampus of 15-day-old male mice. *NeuroReport*, 31(18), 1256-1264. (IF=1.83)
5. **Reshetnikov, V. V.**, Kisaretova, P. E., Ershov, N. I., Merkulova, T. I., & Bondar, N. P. (2020). Data of correlation analysis between the density of H3K4me3 in promoters of genes and gene expression: Data from RNA-seq and ChIP-seq analyses of the murine prefrontal cortex. *Data in brief*, 33, 106365.
6. Antontseva, E., Bondar, N., **Reshetnikov, V.**, & Merkulova, T. (2020). The effects of chronic stress on brain myelination in humans and in various rodent models. *Neuroscience*, 441, 226-238. (IF=3.59)
7. Bondar, N., Bryzgalov, L., Ershov, N., Gusev, F., **Reshetnikov, V.**, Avgustinovich, D., Tenditnik, M., Rogaev E. & Merkulova, T. (2018). Molecular Adaptations to Social Defeat Stress and Induced Depression in Mice. *Molecular neurobiology*, 55(4), 3394-3407. (IF=5.59)
8. Bondar, N. P., Lepeshko, A. A., & **Reshetnikov, V. V.** (2018). Effects of early-life stress on social and anxiety-like behaviors in adult mice: sex-specific effects. *Behavioural neurology*, 1538931 (IF=3.34)
9. Ershov, N. I., Bondar, N. P., Lepeshko, A. A., **Reshetnikov, V. V.**, Ryabushkina, J. A., & Merkulova, T. I. (2018). Consequences of early life stress on genomic landscape of H3K4me3 in prefrontal cortex of adult mice. *BMC genomics*, 19(3), 93. (IF=3.96)
10. **Reshetnikov, V. V.**, Studenikina, A. A., Ryabushkina, J. A., Merkulova, T. I., & Bondar, N. P. (2018). The impact of early-life stress on the expression of HPA-associated genes in the adult murine brain. *Behaviour*, 155(2-3), 181-203.
11. **Решетников В. В.**, Лепешко, А. А., Рябушкина, Ю. А., Студеникина, А. А., Меркулова, Т. И., Бондарь, Н. П. Отсроченные эффекты раннего постнатального стресса на когнитивные способности и экспрессию генов глутаматергической системы у мышей // *Нейрохимия*. – 2018. – Т. 35. – №. 2. – С. 140-150. Перевод: **Reshetnikov, V. V.**, Lepeshko, A. A., Ryabushkina, Y. A., Studenikina, A. A., Merkulova, T. I., & Bondar, N. P. (2018). The long-term effects of early postnatal stress on cognitive abilities and expression of genes of the glutamatergic system in mice. *Neurochemical Journal*, 12(2), 142-151.