



ЧАДАЕВА ИРИНА ВИТАЛЬЕВНА

**ПРОФИЛИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ОТДЕЛАХ
МОЗГА РУЧНЫХ И АГРЕССИВНЫХ СЕРЫХ КРЫС**

1.5.7 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Новосибирск 2024

Работа выполнена в лаборатории эволюционной биоинформатики и теоретической генетики и в лаборатории эволюционной генетики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск.

**Научный
руководитель:**

Маркель Аркадий Львович

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории эволюционной генетики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

**Официальные
оппоненты:**

Тихонова Мария Александровна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», г.Новосибирск

Марков Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, г.Новосибирск

**Ведущее
учреждение:**

ФГБНУ Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук (ИСиЭЖ СО РАН), г. Новосибирск

Защита диссертации состоится «___» _____ 2024 г. на заседании диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу: пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел: +7(383) 363-49-06 (1321); e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

факс: +7(383) 333-12-78

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

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

Хлебодарова Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Проблема агрессивности животных получила новый импульс в связи с изучением процесса их одомашнивания. Изучение многофакторной системы формирования паттернов агрессивного и ручного поведения животных в процессе их одомашнивания предполагает работу с удобными и надежными генетическими моделями, позволяющими минимизировать воздействия случайных факторов. Для этой цели оптимально использовать отловленных в природе и далее разводимых в течение 50 лет в виварии ИЦиГ СО РАН серых крыс (*Rattus norvegicus*), селекционированных в двух направлениях по агрессивной и спокойной реакции на человека (агрессивная и ручная линии). Этот модельный объект – две аутбредные линии серых крыс, в одной из которых искусственный отбор вели на отсутствие агрессивности по отношению к человеку (ручные крысы), а в другой на усиление агрессивных реакций (агрессивные крысы) (Беляев, Бородин, 1985; Plyusnina, Oskina, 1997; Плюснина и др., 2003) – дает уникальную возможность для анализа сложной архитектуры генетической детерминации исследуемого поведения. В представленной работе проведено исследование транскриптомов четырех отделов мозга серых крыс, селекционируемых по реакции на человека.

Цель работы: выявить и изучить молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе агрессивного или ручного поведения, у двух линий серых крыс (*Rattus norvegicus*), селекционированных по реакции на человека.

Задачи работы:

1. Провести полногеномное профилирование уровней транскрипции генов в четырех структурах головного мозга (гипоталамус, гиппокамп, серое вещество периакведуктума и покрышка среднего мозга) ручных и агрессивных серых крыс;
2. В исследованных структурах мозга ручных и агрессивных крыс идентифицировать дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) и верифицировать транскриптомные данные с помощью полуколичественной ПЦР в реальном времени;
3. Провести функциональную аннотацию полученного списка ДЭГ и описать основные биологические процессы, которые могут оказывать влияние на паттерны поведения крыс ручной и агрессивной линий;
4. Провести сравнительный анализ данных, полученных на ручных и агрессивных серых крысах, с профилями ДЭГ у разных видов домашних животных и их диких конспецификов.

Научная новизна работы. Секвенирование транскриптома в четырех отделах мозга ручных и агрессивных серых крыс позволило выявить группу ДЭГ, ассоциированных с ручным или агрессивным поведением. Впервые проведено сравнение профилей экспрессии генов между линиями ручных и агрессивных серых крыс в четырех отделах головного мозга – гипоталамусе, гиппокампе, сером веществе периакведуктума и покрышке среднего мозга. Поскольку структуры мозга выбраны в связи с их участием в непосредственном контроле

поведенческих реакций у млекопитающих, то те гены, экспрессия которых достоверно различается у крыс двух линий, являются наиболее важными генами-кандидатами, влияющими на выражение или подавление агрессивного по отношению к человеку поведения. Анализ транскриптома в отделах мозга серых крыс дополнил результаты аналогичных работ, проведенных на разных видах одомашненных (ручных) и диких животных, по профилю транскрипции генов в структурах мозга в связи с особенностями их поведения по отношению к человеку, а именно, ручного у одомашненных животных и настороженно-агрессивного у их диких конспецификов. Различия в профилях экспрессии ряда генов верифицированы с помощью полуколичественной ПЦР в реальном времени. Результаты, полученные на ручных и агрессивных серых крысах как лабораторной модели доместикации, представляют пример искусственного отбора по поведению как частного случая дестабилизирующего отбора, который действует при вовлечении в селекцию нейроэндокринных систем адаптации в процессе доместикации (Беляев, 1979).

Теоретическая и практическая значимость. В ходе исследования получены новые данные о генетических механизмах доместикации, связанных с преобразованием в результате отбора агрессивного («дикого») по отношению к человеку поведения в спокойное («ручное»): установлены дифференциально экспрессирующиеся гены в отделах головного мозга серых крыс с контрастными типами поведения по отношению к человеку. Проверена гипотеза формирования генетической базы доместикационного синдрома, общего для разных видов одомашненных животных. Проведен функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся в отделах мозга генов в связи с их возможной ролью в регуляции агрессивного и ручного поведения. Результаты данной работы представляют фактические данные о генах, изменяющих экспрессию в ответ на искусственный отбор по поведению, что может быть использовано при селекции животных в сельском хозяйстве и в ветеринарии.

Методология и методы диссертационного исследования. В данной работе для анализа профилей экспрессии генов в отделах мозга ручных и агрессивных серых крыс использован комплексный подход, который включал молекулярно-биологические методы и биоинформатический анализ полученных данных. Исследование проведено на самцах агрессивных и ручных крыс, полученных в результате многолетней селекции, начатой в Институте цитологии и генетики СО РАН в 1972 г. П.М. Бородиным и продолженной И.З. Плюсниной и Р.В. Кожемякиной. Для выполнения поставленных задач собран и подготовлен биологический материал – препарированы 4 структуры головного мозга агрессивных и ручных крыс, из образцов которых выделена и очищена мРНК. Полученные данные секвенирования мРНК (RNA-seq) верифицировали полуколичественной ПЦР в реальном времени и анализировали с применением методов биоинформатики.

Положения, выносимые на защиту:

1. Генетические эффекты искусственного отбора серых крыс по поведению достоверно связаны с различиями в уровнях экспрессии более 100 генов в гипоталамусе, гиппокампе, сером веществе периакведуктума и покрышке среднего мозга, среди которых повышенная экспрессия генов *Aox1*, *Ascl3*, *Bdkrb2*, *Cd22*, *Defb17*, *Fcgr2b*, *Lilrb3l*, *Liph*, *Morn1*, *Mpeg1*, *Pla2g2d*, *P2rx4*, *Rbm3*, *Sh3bgr*, *Slfn13* и *Tecta* достоверно ассоциирована с фенотипом ручного поведения, а генов *Fosb*, *Hbb-b1*, *Hspa1a*, *Hspa1b*, *Krt2*, *Mcm10*, *Mre11a*, *Pcdhb9*, *Retsat* и *Spint1* – с фенотипом агрессивного поведения.
2. В отбор серых крыс по поведению вовлечены молекулярно-генетические системы репарации и репликации ДНК (*Mre11a*, *Mcm10*), регуляции транскрипции (*Fosb*), передачи сигналов (*Slfn13*, *P2rx4*, *Rbm3* и *Sh3bgr*) и липидного метаболизма (*Aox1*, *Retsat*, *Pla2g2d* и *Liph*), а также иммунные процессы (*Defb17*, *Cd22* и *Fcgr2b*) и ответ на стресс (*Bdkrb2*, *Hspa1b* и *Hspa1a*).
3. Около 60% различий в экспрессии генов между домашними и дикими животными объясняются искусственным отбором при одомашнивании, а около 40% генетических различий – изменчивостью видоспецифичных признаков одомашниваемых животных.

Структура и объем работы. Работа изложена на 181 странице и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы, включающий 236 источников. Диссертация содержит 17 рисунков, 11 таблиц и Приложение.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано семь работ в журналах, входящих в список ВАК. Из них 2 статьи в российском журнале, 5 – в зарубежных.

Личный вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно: постановка цели и задач исследования; планирование, дизайн и проведение всех экспериментов; выделение и очистка РНК из образцов головного мозга серых крыс; получение кДНК, подбор праймеров и проведение полуколичественной ПЦР для выбранных генов; получение и статистический анализ экспериментальных данных, а также интерпретация и обобщение полученных результатов. Сбор образцов мозга исследуемых животных проведен в сотрудничестве с к.б.н. н.с. Шихевич С.Г. (обе – сотрудники лаборатории Эволюционной генетики).

Работа по диссертации была проведена при полной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, №18-34-00496 мол_а «Анализ дифференциальной экспрессии генов в отделах головного мозга крыс, селекционированных по агрессивности», руководитель Чадаева И.В.).

Апробация результатов. Основные результаты работы представлены на российских и международных конференциях: Беляевские чтения – Международная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения

академика АН СССР Д.К. Беляева (Россия, г. Новосибирск, 2017 г.); на 11-ой Международной мультikonференции «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» (Россия, г. Новосибирск, 2018 г.); на VII съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященном 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и на ассоциированных симпозиумах (Россия, г. Санкт-Петербург, 18-22 июня 2019 г.); на 13-ой Международной мультikonференции «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» (Россия, г. Новосибирск, 2022 г.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Глава включает в себя пять разделов, в которых приведены общие сведения о доместикации животных (раздел 1.1) и полногеномные исследования в этой области (раздел 1.2), рассмотрены модельные объекты в исследованиях по доместикации животных (раздел 1.3). Охарактеризованы серые крысы как модельный объект доместикации, проводимой путем генетической селекции по уровню агрессивности/толерантности по отношению к человеку (раздел 1.4), включая физиологические, поведенческие и генетические различия изучаемых животных. Рассмотрена роль структур мозга в контроле поведения у млекопитающих (раздел 1.5).

Глава 2. Материалы и методы

Работа выполнена на самцах 90-го поколения разведения серых крыс (*Rattus norvegicus*) двух аутбредных линий, ручной и агрессивной. Исследовано по 11 самцов крыс каждой линии в возрасте 2-х месяцев, из которых биологические образцы структур мозга трех крыс ручной линии и трех крыс агрессивной использованы для РНК-секвенирования, а образцы восьми ручных и восьми агрессивных крыс – для верификации данных методом полуколичественной ПЦР в реальном времени. В соответствии с критерием отбора (баллы реакции в тесте на перчатку) у агрессивных крыс, взятых для исследования, агрессивно-оборонительная реакция соответствовала –3,5 баллам, что соответствует наивысшему показателю агрессивности, а поведение ручных крыс оценено наивысшим баллом «одомашненности» +3,5. После декапитации животных препарированы следующие структуры головного мозга: гипоталамус, гиппокамп, серое вещество периакведуктума (СВП) и покрышка среднего мозга (ПСМ). Из полученных образцов, масса которых составляла приблизительно по 100 мг, выделена РНК для проведения полногеномного секвенирования и для получения кДНК с последующим проведением полуколичественной ПЦР в реальном времени. Секвенирование РНК выполнено у 6-ти животных (по 3 от каждой линии), соответственно, подготовлены 24 образца структур мозга: от каждой крысы по 4 образца 4-х отделов головного мозга. Для проведения полуколичественной ПЦР в реальном времени выделены РНК из образцов соответствующих структур головного мозга других 16-ти крыс (по 8 от каждой

линии, всего 64 образца). Измерения относительного количества мРНК нескольких генов проведены с помощью полуколичественной ПЦР в реальном времени, которую проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями. Значения экспрессии исследуемых генов нормировали на среднее геометрическое из данных по двум генам сравнения, стабильность экспрессии которых предварительно проверена для каждого из 4-х отделов мозга и каждой из двух групп крыс. По результатам этой проверки в качестве генов сравнения для образцов гипоталамуса и гиппокампа выбраны гены *Ppia* и *Rpl30*; для структур среднего мозга СВП и ПСМ – гены *Hprt1* и *B2m*.

Функциональную аннотацию ДЭГ – выявление обогащенных терминов Gene Ontology (GO) и метаболических путей, – провели с помощью веб-сервиса DAVID. Построение генных сетей на основе взаимодействий между полученными ДЭГ выполнено с помощью веб-сервиса STRING с заданными по умолчанию настройками программы.

Глава 3. Результаты

Анализ секвенирования транскриптомов в структурах головного мозга ручных и агрессивных крыс. Результаты полногеномного секвенирования мРНК в 4-х структурах мозга ручных и агрессивных крыс выявили достоверные различия между линиями крыс по экспрессии 44-х генов в гипоталамусе, 42-х в гиппокампе, 39-ти в СВП и 32-х генов в ПСМ.

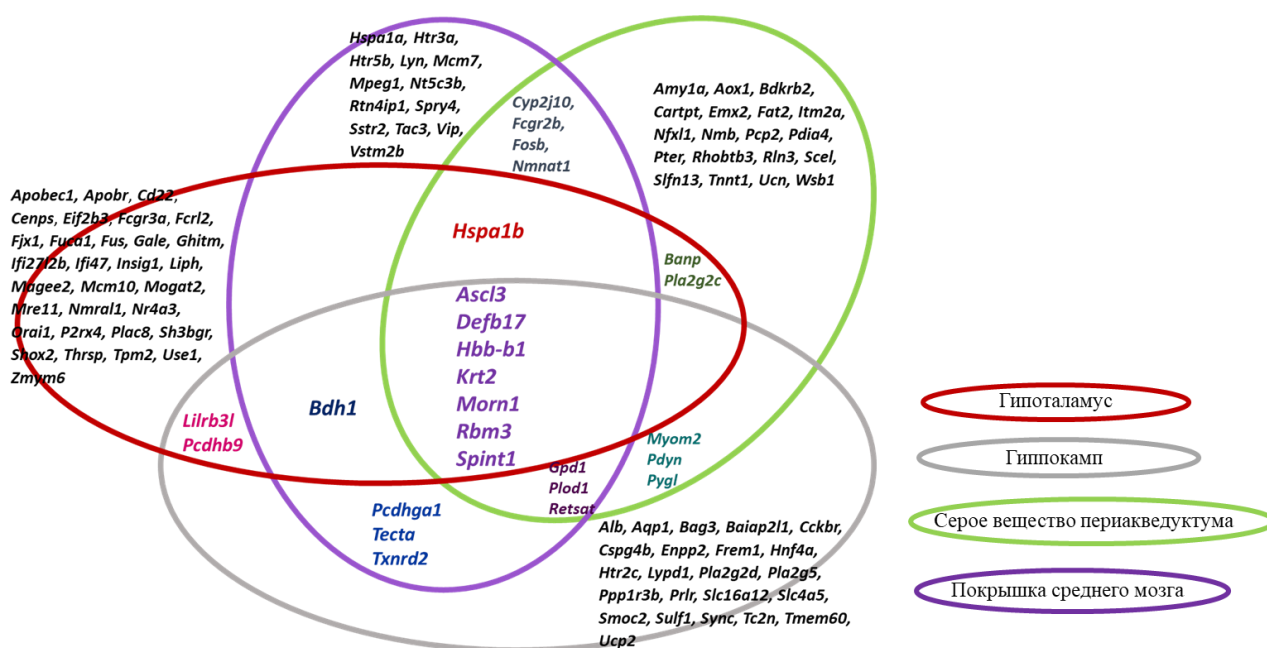


Рисунок 1. Распределение списков ДЭГ в 4-х исследованных структурах головного мозга ручных и агрессивных крыс. Цветовое обозначение генов использовано для удобства восприятия рисунка

Уровни экспрессии 7-ми генов статистически значимо и однонаправленно различаются между агрессивными и ручными крысами во всех четырех исследуемых структурах мозга: уровни экспрессии генов *Ascl3*, *Defb17*, *Morn1* и *Rbm3* выше у животных ручной линии, а генов *Hbb-b1*, *Krt2* и

Spint1 – выше у агрессивных крыс. На диаграмме Венна (Рисунок 1) представлено распределение списков дифференциально экспрессирующихся генов в разных отделах мозга ручных и агрессивных крыс. Совпадения в направленности различий по дифференциальной активности генов в разных отделах мозга указывают на их связь с осуществлением однонаправленной регуляции поведения крыс на генетическом уровне. Полученные данные по дифференциальной экспрессии генов в структурах мозга ручных и агрессивных крыс проанализированы методом главных компонент: первая главная компонента объясняет 29% изменчивости по экспрессии генов в структурах мозга, а вторая – 17% (Рисунок 2).

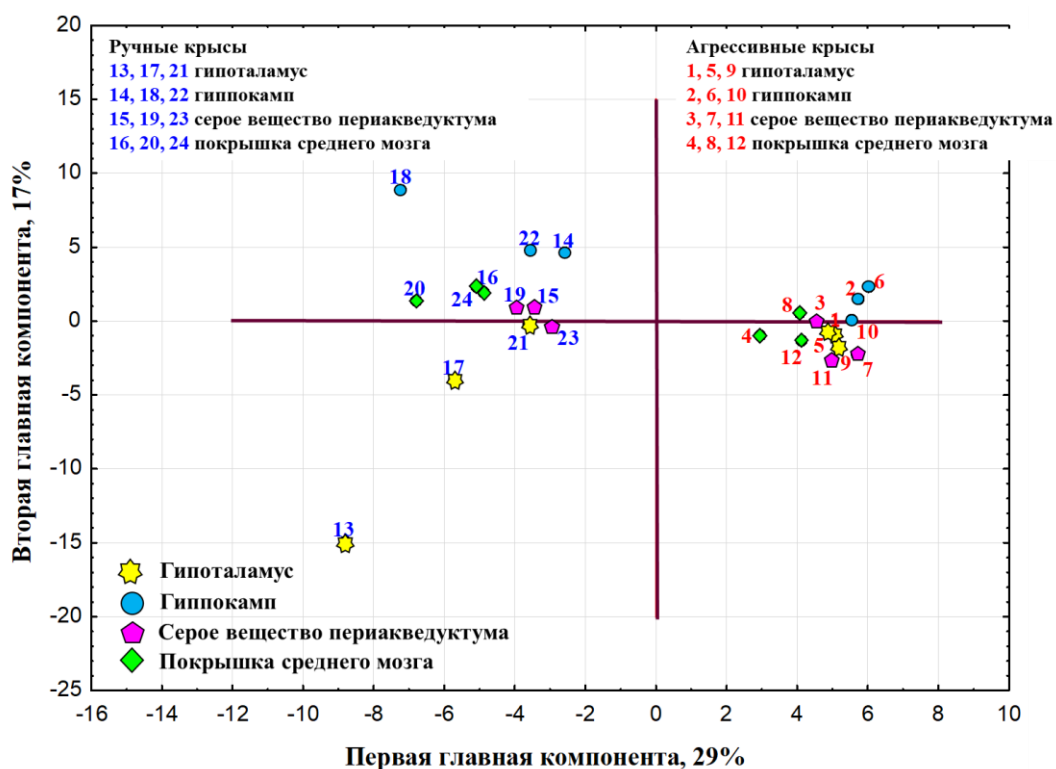


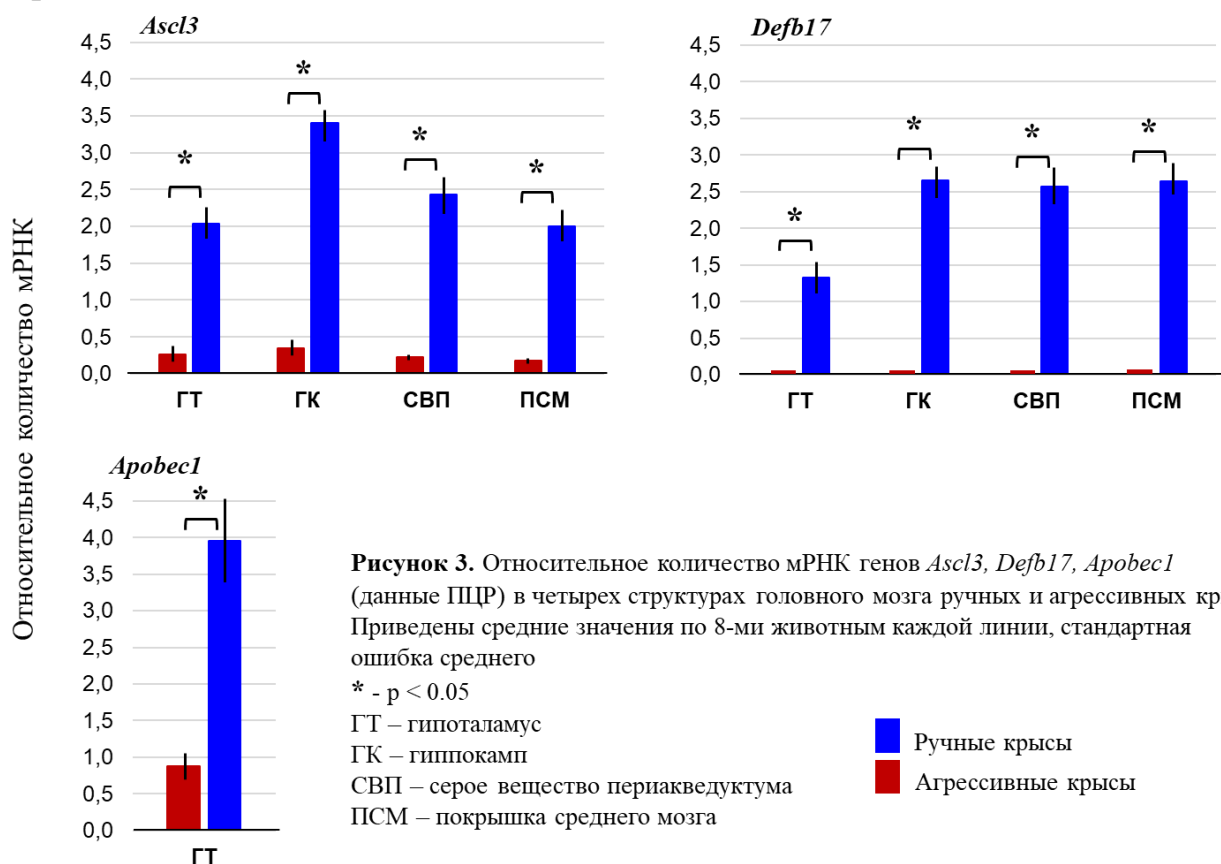
Рисунок 2. Распределение образцов структур мозга ручных и агрессивных крыс в зависимости от экспрессии ДЭГ в этих образцах (112 генов) в координатах первой и второй главных компонент. В левом кластере графика объединились структуры мозга трех ручных крыс (№№ 13-24), а в правом кластере – структуры мозга трех агрессивных крыс (1-12).

По первой главной компоненте (**tame/aggressive rats PC1 – atPC1**) происходит разделение ручных и агрессивных крыс на две группы по экспрессии 26-ти ДЭГ (из 112) в структурах мозга. Из них 16 генов имели повышенную экспрессию у ручных крыс и 10 – у агрессивных. atPC1 отражает изменения экспрессии генов, вызванные искусственным отбором по поведенческой реакции крыс на человека (тест на перчатку). При этом положительная корреляция atPC1 с дифференциальной экспрессией 16-ти генов (*Ascl3*, *Defb17*, *Fcgr2b*, *Morn1*, *Pla2g2d*, *Mpeg1*, *Aox1*, *Lilrb3l*, *Cd22*, *Bdkrb2*, *P2rx4*, *Liph*, *Slfn13*, *Sh3bgr*, *Rbm3*, *Tecta*) соответствует фенотипу ручного поведения, а отрицательная корреляция atPC1 с дифференциальной экспрессией других 10-ти генов (*Fosb*, *Mre11a*, *Retsat*, *Mcm10*, *Hspa1a*, *Spint1*,

Krt2, *Hspa1b*, *Pcdh9*, *Hbb-b1*) соответствует агрессивному поведению крыс. Таким образом, первую главную компоненту можно обозначить как «Генетическая детерминация поведения». Вторая главная компонента (atPC2) коррелирует с величинами экспрессии генов *Lypd1*, *Htr5b*, *Myom2*, *Nr4a3* и *Emx2* – только в гиппокампе. Изменения экспрессии этих пяти генов обусловлены особенностями функционирования гиппокампа животных обеих линий, поэтому вторую компоненту можно обозначить как «Структура мозга». Для трех других исследованных отделов мозга ручных и агрессивных крыс корреляций с atPC2 не выявлено.

Таким образом, проведено сравнительное полногеномное профилирование уровней транскрипции генов в четырех структурах головного мозга (гипоталамус, гиппокамп, СВП и ПСМ) ручных и агрессивных серых крыс и выявлены группы дифференциально экспрессирующихся генов, позволяющие разделить ручных и агрессивных крыс по генетическим детерминантам их поведения.

Верификация дифференциальной экспрессии генов в образцах головного мозга ручных и агрессивных крыс методом полуколичественной ПЦР в реальном времени. Экспериментальное подтверждение данных РНК-секвенирования проведено методом полуколичественной ПЦР в реальном времени для дифференциально экспрессирующихся генов *Ascl3*, *Defb17*, *Apobec1* у 8 ручных и 8 агрессивных крыс.



Уровни мРНК перечисленных ДЭГ действительно достоверно выше у ручных крыс по сравнению с агрессивными (t-тест $p < 0.05$; Рисунок 3). Результаты определения содержания мРНК нескольких генов в образцах 4-х структур головного мозга 8 ручных и 8 агрессивных взрослых самцов крыс в целом подтверждают данные по дифференциальной экспрессии генов, полученные при секвенировании РНК.

Функциональная аннотация ДЭГ в структурах головного мозга ручных и агрессивных крыс. Список ДЭГ проанализирован в базе данных DAVID Bioinformatics Resources (Рисунок 4).

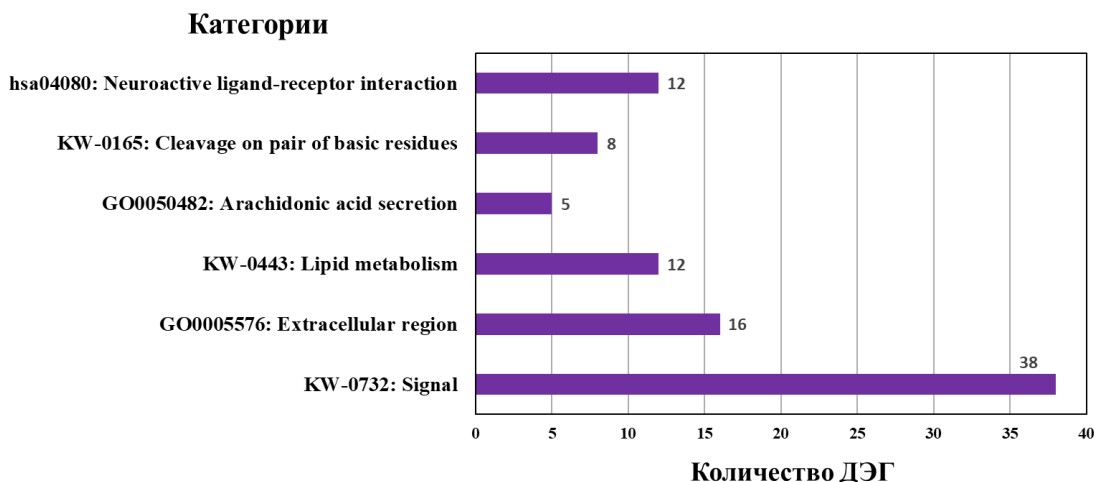


Рисунок 4. Функциональная аннотация ДЭГ в структурах мозга ручных и агрессивных крыс в базе данных DAVID. Показаны категории, достоверно обогащенные ДЭГ у ручных и агрессивных крыс ($p < 0.05$)

Функциональная аннотация включала анализ биологических процессов как относительно полученных нами данных по транскриптому ручных и агрессивных крыс, так и относительно генома серых крыс, установленного в DAVID по умолчанию; получены идентичные результаты. Это позволило выявить основные процессы, которые могли привести к изменениям поведенческой реакции по отношению к человеку у крыс двух линий, ручной и агрессивной. Определены следующие категории биологических процессов: «Сигнальный путь взаимодействия нейронных рецепторов с лигандами» (hsa04080), «Расщепление по паре основных остатков» (KW-0165), «Контролируемое высвобождение арахидоновой кислоты» (GO0050482), «Метаболизм липидов» (KW-0443), «Внеклеточный матрикс» (GO0005576), «Сигналинг» (KW-0732).

Ассоциативная генная сеть построена в программе STRING на основе взаимодействий (таких как ко-экспрессия, взаиморегуляция и участие в детерминации взаимосвязанных процессов) между заданными дифференциально экспрессирующимися генами. В полученной генной сети несколько кластеров соответствуют группам генов, объединенных по биологическим процессам в базе данных DAVID; всего 77 генов из 112 ДЭГ связаны такими взаимодействиями. Анализ генных сетей свидетельствует о

важности взаимодействия между генами по образцу комплексного генетического регулятора в детерминации сложных форм контрастного поведения у сравниваемых линий крыс. Очевидно, что не все эти гены вносят равноценный вклад в формирование изучаемого поведения, поэтому важно отметить связь с фенотипом ручного/агрессивного поведения тех ДЭГ, которые коррелируют с atPC1 «Генетическая детерминация поведения». Так, взаимодействия в этой группе показаны для генов транскрипционного фактора (*Fosb*) и ингибитора серинпептидазы (*Spint1*); генов, ответственных за стресс-ответ (*Bdkrb2*, *Hspa1b* и *Hspa1a*); генов-регуляторов нейрорхимических (*Slfn13*, *P2rx4*, *Rbm3* и *Sh3bgr*) и иммунных процессов (*Defb17*, *Cd22* и *Fcgr2b*), липидного метаболизма (*Aox1*, *Retsat*, *Pla2g2d* и *Liph*), а также репарации (*Mre11a*) и репликации (*Mcm10*) ДНК.

Таким образом, проведена функциональная аннотация ДЭГ в четырех структурах мозга; описаны основные биологические процессы, которые могут оказывать влияние на паттерны поведения ручной и агрессивной линий серых крыс. Показано, что в статистически значимо обогащенные категории GO согласно базе данных DAVID попали 53 ДЭГ из 112, что в целом подтверждается результатом анализа в STRING (77 из 112).

Сравнение ДЭГ в образцах гипоталамуса ручных и агрессивных крыс с ДЭГ других домашних и диких животных. В работе впервые проведен сравнительный анализ ДЭГ ручных и агрессивных крыс с их известными генами-гомологами, уровни экспрессии которых достоверно различаются между домашними животными и их дикими конспецификами. Поскольку анализ такого рода является биоинформатической задачей, которая в настоящий момент находится на стадии разработки, в рамках представленной работы апробирован алгоритм сопоставления различий экспрессии генов у крыс только в гипоталамусе с различиями экспрессии гомологичных генов у нескольких видов домашних и диких животных (собака – волк; ручные – агрессивные лисицы; курица – банкивский петух; морская свинка – бразильская морская свинка; домашние – дикие кролики). На основании опубликованных списков ДЭГ проанализированы 2347 генов в различных тканях семи пар видов домашних и диких животных, которые соотнесены с 44-мя ДЭГ гипоталамуса крыс наших двух линий. При совмещении списков генов получены 54 пары гомологичных дифференциально экспрессирующихся генов, где один ген определен в нашей работе у крыс, а пару ему составляет гомолог из работ других авторов, выполненных на других видах животных.

На один ген крысы таких гомологов (паралоги и ортологи) может быть несколько от разных видов животных, поэтому список общих ДЭГ состоит из 54 гомологов для 25 из 44 ДЭГ гипоталамуса ручных и агрессивных крыс. В список этих 25 генов вошли несколько генов, объединенных в кластер по первой главной компоненте atPC1 «Генетическая детерминация поведения». Семи генам крыс (*Eif2b3*, *Ghitm*, *Mre11a*, *Orai1*, *Sh3bgr*, *Shox2* и *Spint1*) соответствовало только по одному **ортологичному** гену, отмеченному как ДЭГ при сравнении между собой нескольких пар домашних и диких видов

животных. Четыре ДЭГ крыс (*Banp*, *Cd22*, *Hbb-b1* и *Nr4a3*) имели по несколько **ортологов** в списках ДЭГ домашних и диких животных. Причем у генов *Hbb-b1* и *Nr4a3*, в отличие от генов *Banp* и *Cd22*, наравне с ортологами есть и гены-паралоги. Остальные 14 из 25 ДЭГ ручных и агрессивных крыс имели среди опубликованных списков ДЭГ других животных только паралоги.

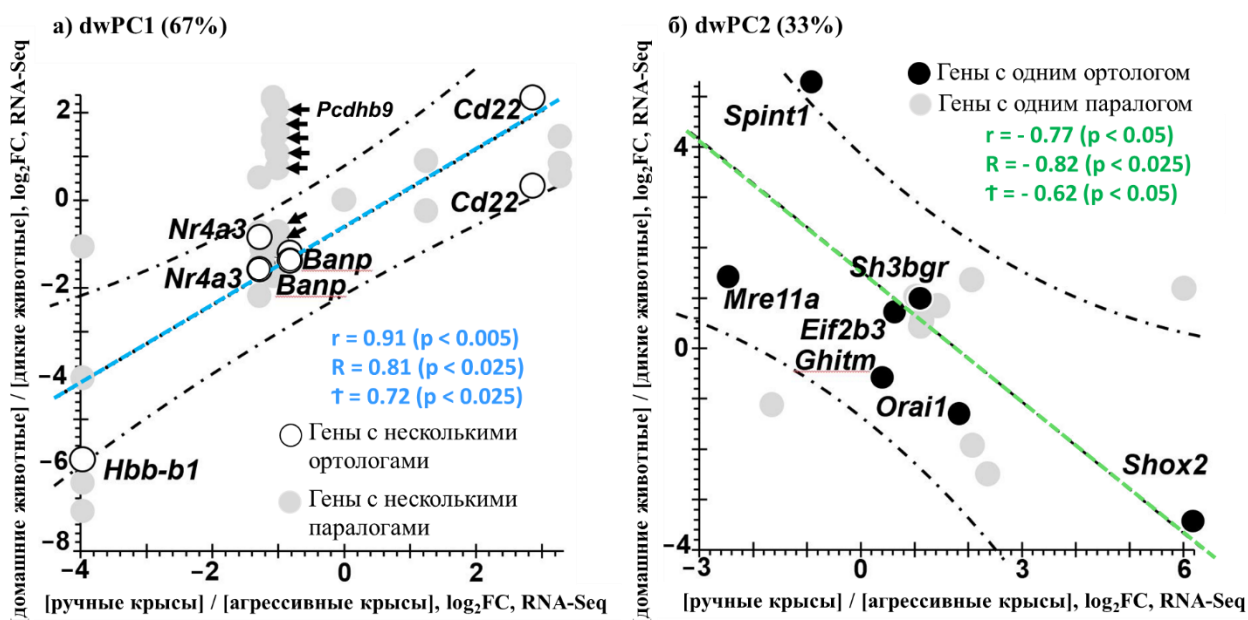


Рисунок 5. Корреляции между значениями $\log_2FC$ (отношение уровня экспрессии гена между сравниваемыми группами животных) ДЭГ в гипоталамусе ручных и агрессивных крыс и значениями $\log_2FC$ гомологичных ДЭГ у домашних и диких животных. Примечания: белые кружки – 4 гена ручных и агрессивных крыс *Banp*, *Cd22*, *Hbb-b1* и *Nr4a3* и их гомологи у других видов животных; черные кружки – 7 генов крыс (*Eif2b3*, *Ghitm*, *Mre11a*, *Orai1*, *Sh3bgr*, *Shox2* и *Spint1*), пару которым составляют единичные ортологи у других видов животных; серые кружки – ДЭГ других видов животных, паралогичные ДЭГ серых крыс ручной и агрессивной линий; (а) гены, связанные с dwPC1 и имеющие по несколько гомологов; стрелки ($\rightarrow$) указывают на ген *Pcdh9* и семь его паралогов; (б) гены, связанные с dwPC2 и имеющие по одному гомологу.

Сравнение наших данных и данных по домашним и диким животным выполнено с помощью метода главных компонент: по первой главной компоненте (**domestic/wild animals – dwPC1**) определено 67% исследуемой дисперсии дифференциальной экспрессии генов домашних и диких животных. На Рисунке 5а представлен график корреляции этих генов (ортологов и паралогов) с dwPC1 (линейная корреляция Пирсона r и ранговые корреляции Спирмена R и Кендалла τ). Гены *Banp*, *Cd22*, *Hbb-b1* и *Nr4a3*, коррелирующие с dwPC1, имеют по несколько ортологов. В парах этих генов и их ортологов изменение экспрессии у разных видов животных однонаправленное. Например, у двух ортологов гена *Banp* уровень экспрессии выше и у агрессивных крыс, и у диких кроликов по сравнению с ручными крысами и домашними кроликами соответственно. Т.е. уровень

экспрессии генов-ортологов *Banp* у крыс и кроликов в процессе их доместикации снизился. Следовательно, dwPC1 отражает общее для разных видов изменение экспрессии генов в ответ на действие искусственного отбора при одомашнивании, поэтому эту компоненту можно условно обозначить как «Доместикация».

Вторая компонента, dwPC2, показывает 33% дисперсии дифференциальной экспрессии генов у ручных/агрессивных крыс и домашних/диких животных. На Рисунке 5б показаны гены, коррелирующие с dwPC2 (*Eif2b3*, *Ghitm*, *Mre11a*, *Orai1*, *Sh3bgr*, *Shox2* и *Spint1*). В данном случае произошли разнонаправленные изменения экспрессии генов. Например, у ручных крыс ген *Ghitm* экспрессируется выше, чем у агрессивных, а у домашней морской свинки ниже – чем у диких свинок. dwPC2 отражает те изменения, которые происходят в ответ на искусственный отбор по определенному признаку, поэтому вторую компоненту можно обозначить как «Видоспецифичные изменения».

Серыми кружками на обоих графиках показаны 14 ДЭГ серых крыс и их паралоги, соответственно более одного паралога – на графике Рисунка 5а, и единичные паралоги – на графике Рисунка 5б. Паралогичные гены возникли в результате дупликации общего предкового гена, при этом в ходе эволюции у паралогов могут измениться биологические функции. Поэтому наблюдаемое количество генов-паралогов вне доверительного интервала соответствует ожидаемому. Так, например, стрелками на Рисунке 5а указаны 7 паралогов дифференциально экспрессирующегося гена *Pcdhb9* ручных/агрессивных крыс. Два паралога из 7 соответствуют 95%-му доверительному интервалу, а 5 оставшихся паралогов в этот интервал не входят.

Таким образом, в нашей работе проанализированы не только пересечения списков ДЭГ у домашних и диких животных, но и проведено сравнение изменения экспрессии у ДЭГ, совпадающих между разными видами, что позволило выявить общие генетические механизмы процесса одомашнивания.

Глава 4. Обсуждение

Характеристика ДЭГ ручных и агрессивных крыс. Представленные ДЭГ в исследованных структурах головного мозга ручных и агрессивных серых крыс 90-го поколения селекции связаны с осуществлением различных биологических процессов, что свидетельствует о широкой генетической базе различий изучаемых поведенческих фенотипов у сравниваемых групп животных. Статистически значимая разница в уровнях экспрессии выявленной нами всей совокупности ДЭГ в исследованных отделах мозга свидетельствует о биохимических и метаболических перестройках в работе центральной нервной системы, что прямо или косвенно связано с различиями поведенческого репертуара ручных и агрессивных крыс. Из всех 112-ти ДЭГ у ручных и агрессивных крыс уровни экспрессии семи ДЭГ значимо различаются между двумя группами животных во всех четырех исследованных структурах мозга. Этот результат можно сопоставить с результатом, полученным Sato *et al.*, 2020 на домашних и диких кроликах, где

было обнаружено 27 из 612 ДЭГ, изменения экспрессии которых оказались общими для выбранных отделов мозга (височно-теменная область, миндалина, гипоталамус и гиппокамп). Это выглядит весьма убедительно для объяснения различий в поведенческих реакциях по отношению к человеку и для фенотипа в целом у исследуемых животных с учетом недавней (в масштабах эволюции) истории одомашнивания кроликов. Относительно ручных и агрессивных крыс очевидно, что искусственный отбор в течение еще более короткого времени (45 лет) не вызвал у них пока столь глубоких генетических различий. Но тем не менее этого временного отрезка хватило для формирования достоверных отличий на генетическом уровне.

ДЭГ в отделах головного мозга ручных и агрессивных крыс в терминах генной онтологии по базам данных DAVID и STRING. Идентифицированные термины генной онтологии (GO) включали широкий спектр биологических категорий, таких как внеклеточный матрикс, сигнальный путь взаимодействия нейронных рецепторов с лигандами, липидный метаболизм, контролируемое высвобождение арахидоновой кислоты из клетки, сигнальные белки и др. Многие гены попали одновременно в несколько категорий. Это объясняется принципами разделения на категории: одни из них объединяют гены по функциям продуктов экспрессии генов, другие – по структурным особенностям белков, третьи – по их локализации в ткани. При построении ассоциативной генной сети в программе STRING показано, что чуть менее половины генов объединены в один кластер, в котором «узловыми точками» выступают гены *Alb* (альбумин), *Pygl* (гликогенфосфорилаза L), *Nr4a3* (ядерный рецептор, транскрипционный фактор), *Eif2b3* (эукариотический фактор инициации трансляции 2В субъединица γ), *Pdyn* (продинарфин) и *Pcp2* (белок-2 клеток Пуркинье). Отдельными группами обособлены гены семейства фосфолипаз A2 (*Pla2g2c*, *Pla2g2d*, *Pla2g5*) и гены семейства серотонинового рецептора (*Htr2c*, *Htr3a* и *Htr5b*). Гены *Htr3a* и *Htr2c* сильнее экспрессируются у ручных крыс в покрышке среднего мозга и гиппокампе соответственно, а ген *Htr5b* – в покрышке среднего мозга агрессивных крыс. По данным Ensembl у серых крыс в семействе серотонинового рецептора 14 генов, но дифференциальная экспрессия определена только для трех из них, для остальных генов этого семейства различия не обнаружены даже на уровне тенденции.

Некоторые ДЭГ не вошли ни в одну из категорий базы данных DAVID (59 из 112 ДЭГ) и не связались ни с какими другими ДЭГ в ассоциативной сети STRING (33 ДЭГ из 112). Отсутствие взаимодействий с другими ДЭГ указывает на тот факт, что они не являются прямыми партнерами друг друга ни по каким критериям в данной генной сети. В целом генная сеть (STRING) хорошо согласуется с объединением генов в категории (DAVID). Поскольку целью анализа в данных программах было найти взаимодействия именно между ДЭГ, полученными на нашем модельном объекте, вполне ожидаемо, что не все гены попали в статистически значимо обогащенные категории GO согласно DAVID и STRING. Например, ген пролактинового рецептора *Prlr* хорошо изучен и имеет широкую сеть взаимодействий и представленности в

биологических процессах в терминах ГО, но в связи с другими генами. Построение генных сетей по каждому гену представляет собой перспективную и интересную задачу для последующих исследований. Однако, на наш взгляд, более ценно определить наличие взаимодействий именно между ДЭГ крыс с тем, чтобы определить потенциальный механизм генетической регуляции различных поведенческих фенотипов – ручного и агрессивного. Эти результаты могут послужить существенным заделом для дальнейших исследований генетических факторов регуляции агрессивного поведения и доместикации.

Полученные данные в совокупности указывают на специфические изменения в функционировании нейронов в исследуемых структурах мозга ручных и агрессивных крыс. Продукты дифференциально экспрессирующихся генов задействованы в различных биологических процессах, что в результате формирует многофакторную систему детерминации признаков, а именно выраженности доместикационного поведения и его антагониста – агрессивного поведения, по которым ведется искусственный отбор серых крыс.

Выявление закономерностей доместикации животных на основе полногеномных данных. В список из 25 генов (*Banp*, *Cd22*, *Defb17*, *Eif2b3*, *Fcgr3a*, *Fcrl2*, *Ghitm*, *Hbb-b1*, *Hspa1b*, *Ifi27l2b*, *Krt2*, *Liph*, *Mogat2*, *Morn1*, *Mre11a*, *Nr4a3*, *Orai1*, *Pcdh9*, *Pla2g2c*, *P2rx4*, *Rbm3*, *Sh3bgr*, *Shox2*, *Spint1*, *Tpm2*), которым соответствуют дифференциально экспрессирующиеся гены-гомологи домашних и диких животных, вошли несколько генов (они выделены жирным шрифтом), объединенных в кластер по atPC1 («Генетическая детерминация поведения»). Тот факт, что эти ДЭГ оказались таковыми не только у селекционированных крыс, но и у других животных (кролики, лисицы, собаки и волки, морские свинки, курицы и банкивский петух), свидетельствует о некой общей схеме изменения их экспрессии. Между тем, сравнивая данные Albert *et al.* (2012) на крысах 5-го поколения т.н. лейпцигской популяции с нашими, мы можем констатировать отсутствие значимых совпадений. В образцах фронтальной коры головного мозга (Albert *et al.*, 2012) и в образцах гипоталамуса серых крыс в нашей работе (Chadaeva *et al.*, 2021) экспрессия всего трех генов (*Alb*, *Aqp1* и паралог гена *Pcdh9*, – *Pcdhga1*) изменилась схожим образом. Расхождение наших данных с данными Albert *et al.* (2012) объясняется рядом причин, среди которых тканеспецифичность экспрессии генов, разница применяемых методов как содержания, так и тестирования крыс, и др.

В нашей работе проанализированы не только пересечения списков ДЭГ у домашних и диких животных, но и проведено сравнение изменений экспрессии ДЭГ, совпадающих между разными видами. Нами показаны те ДЭГ (*Eif2b3*, *Ghitm*, *Mre11a*, *Orai1*, *Sh3bgr*, *Shox2* и *Spint1*), изменения экспрессии которых связаны с искусственным отбором по какому-либо специфичному признаку (например, показатели продуктивности сельскохозяйственных животных), и ДЭГ (*Banp*, *Cd22*, *Hbb-b1* и *Nr4a3*), вектор изменения экспрессии которых однонаправлен у сравниваемых видов

(морская свинка, курица, собака, свинья, кролик, лисица и крыса) и отражает общую приспособленность к антропогенной среде.

Проведенный в работе сравнительный анализ транскриптомов разных видов домашних и диких животных в совокупности с данными по нашей доместикационной модели на серых крысах выявил общие закономерности генетической основы одомашнивания. Результаты, полученные на ручных и агрессивных серых крысах как лабораторной модели доместикации, являются численным выражением искусственного отбора как частного случая отбора дестабилизирующего, эффекты которого проявляются при вовлечении в селекционный процесс нейроэндокринной системы и адаптации к изменившимся условиям жизни вида (Беляев, 1979), что несомненно имеет фундаментальное значение для биологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена исследованию профилей транскриптомов четырех отделов головного мозга ручных и агрессивных серых крыс как модельного объекта доместикации. Полученные в работе результаты по статистически значимой разнице в уровнях экспрессии выявленных нами генов между ручными и агрессивными крысами свидетельствуют о генетически детерминированных биохимических и физиологических перестройках в работе ЦНС, которые ассоциированы с изменениями поведенческого репертуара при взаимодействии животного с человеком. Продукты дифференциально экспрессирующихся генов отличаются как по функциям кодируемых ими белков, так и по связанным с ними нейромедиаторным механизмам, что в результате формирует многофакторную систему детерминации признаков, а именно выраженности доместикационного или, напротив, агрессивного, поведения, сформировавшихся в результате искусственного отбора исследуемых линий серых крыс. Обогащение ДЭГ по терминам Генной Онтологии и объединение их в генную сеть представляет перспективное направление для дальнейшего изучения процесса доместикации на модельных объектах. Наши данные свидетельствуют о мультилокусной детерминации фенотипического проявления агрессивного и ручного поведения крыс. В этой системе гены действуют не изолированно, а образуют функционально связанные ансамбли, характерные для определенного (агрессивного или ручного) типа поведения. Проанализированы пересечения списков ДЭГ крыс двух линий с ДЭГ домашних и диких животных других видов и проведено сравнение экспрессии и ее изменения у ДЭГ, совпадающих между разными видами. В результате выявлены такие ДЭГ, у которых уровень экспрессии изменяется в ответ на искусственный отбор по какому-либо специфичному признаку, и ДЭГ, вектор изменения экспрессии которых однонаправлен у исследованных видов и, следовательно, отражает общую приспособленность доместизируемых животных к антропогенной среде.

Все полученные результаты по транскриптомным данным, а также все ДЭГ серых крыс ручной и агрессивной линий, документированы в базе данных

RatDEGdb «База данных дифференциально экспрессирующихся генов крыс как модельных объектов заболеваний человека» (свидетельство о государственной регистрации базы данных №2023623888 от 10 ноября 2023 г.).

ВЫВОДЫ

1. Впервые получены профили экспрессии генов в структурах мозга двух линий крыс, селекционируемых по поведению, ручному и агрессивному. Анализ транскриптома в 4-х структурах мозга выявил достоверные различия между ручными и агрессивными крысами в уровнях экспрессии 112 генов, из них 44 гена в гипоталамусе, 42 – в гиппокампе, 39 – в сером веществе периакведуктума и 32 – в покрышке среднего мозга. Полученные данные верифицированы с помощью полуколичественной ПЦР в реальном времени
2. Уровни экспрессии 26-ти ДЭГ в гипоталамусе, гиппокампе, сером веществе периакведуктума и покрышке среднего мозга ручных и агрессивных крыс значимо коррелируют с поведенческой реакцией: с фенотипом ручного поведения ассоциированы 16 ДЭГ, с фенотипом агрессивного поведения – 10 ДЭГ.
3. Изменение экспрессии генов *Emx2*, *Htr5b*, *Lypd1*, *Myom2* и *Nr4a3* значимо связано со спецификой функции гиппокампа, общей для ручных и агрессивных крыс.
4. Анализ обогащения ДЭГ по терминам генной онтологии (Gene Ontology) выявил следующие статистически значимо представленные категории: «Сигнальный путь взаимодействия нейронных рецепторов с лигандами», «Внеклеточный матрикс», «Высвобождение арахидоновой кислоты», «Липидный метаболизм», «Сигнал», которые влияют на поведенческие реакции серых крыс двух линий.
5. Построена ассоциативная генная сеть, в которой ДЭГ связаны с ответом на стресс, сигнальной функцией нейропептидов, рецепторов нейронов и иммуноглобулинов, регуляцией поведения, метаболизмом липидов и высвобождением арахидоновой кислоты. Отдельным блоком выделяется группа из 7 ДЭГ, в состав которой входят гены серотониновых рецепторов.
6. При сравнении профилей ДЭГ ручных и агрессивных крыс с профилями ДЭГ других видов домашних животных и их диких сородичей показано, что гены *Eif2b3*, *Ghitm*, *Mre11a*, *Orai1*, *Sh3bgr*, *Shox2* и *Spint1* изменяют экспрессию в ответ на искусственный отбор по какому-либо специфичному для вида признаку. Вектор изменения экспрессии генов *Banp*, *Cd22*, *Hbb-b1* и *Nr4a3* однонаправлен у разных видов и отражает общую приспособленность к антропогенной среде.

Публикации по теме диссертации

1. Климова Н.В., **Чадаева И.В.**, Шихевич С.Г., Кожемякина Р.В. Дифференциальная экспрессия 10 генов, ассоциированных с агрессивным поведением, в гипоталамусе двух поколений крыс, селекционируемых по реакции на человека. // ВЖГиС. 2021. 1(1). 1–8.
2. **Chadaeva I.**, Ponomarenko P., Kozhemyakina R., Suslov V., Bogomolov A., Klimova N., Shikhevich S., Savinkova L., Oshchepkov D., Kolchanov N.A., Markel A., Ponomarenko M. Domestication explains two-thirds of differential gene expression variance between domestic and wild animals; the remaining one-third reflects intraspecific and interspecific variation. *Animals* 2021. 11. 2667. <https://doi.org/10.3390/ani11092667>
3. Oshchepkov D., **Chadaeva I.**, Kozhemyakina R., Zolotareva K., Khandaev B., Sharypova E., Ponomarenko P., Bogomolov A., Klimova N.V., Shikhevich S., Redina O., Kolosova N.G., Nazarenko M., Kolchanov N.A., Markel A., Ponomarenko M. Stress reactivity, susceptibility to hypertension, and differential expression of genes in hypertensive compared to normotensive patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23(5):2835. doi: 10.3390/ijms23052835
4. Oshchepkov D., **Chadaeva I.**, Kozhemyakina R., Shikhevich S., Sharypova E., Savinkova L., Klimova N.V., Tsukanov A., Levitsky V.G., Markel A.L. Transcription factors as important regulators of changes in behavior through domestication of gray rats: quantitative data from RNA sequencing. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23(20):12269. <https://doi.org/10.3390/ijms232012269>
5. Shikhevich S., **Chadaeva I.**, Khandaev B., Kozhemyakina R., Zolotareva K., Kazachek A., Oshchepkov D., Bogomolov A., Klimova N.V., Ivanisenko V.A., Demenkov P., Mustafin Z., Markel A., Savinkova L., Kolchanov N.A., Kozlov V., Ponomarenko M. Differentially expressed genes and molecular susceptibility to human age-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. 24(4):3996. doi: 10.3390/ijms24043996
6. **Чадаева И.В.**, Филонов С.В., Золотарева К.А., Хандаев Б.М., Ершов Н.И., Подколотный Н.Л., Кожемякина Р.В., Рассказов Д.А., Богомолов А.Г., Кондратюк Е.Ю., Климова Н.В., Шихевич С.Г., Рязанова М.А., Федосеева Л.А., Редина О.Е., Кожевникова О.С., Стефанова Н.А., Колосова Н.Г., Маркель А.Л., Пономаренко М.П., Ощепков Д.Ю. База знаний RatDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам крысы как модельного объекта биомедицинских исследований. // ВЖГиС. 2023. 1(1). 1–8.
7. **Chadaeva I.**, Kozhemyakina R., Shikhevich S., Bogomolov A., Kondratyuk E., Oshchepkov D., Orlov Yu., Markel A. A principal components analysis and functional annotation of differentially expressed genes in brain regions of gray rats selected for tame or aggressive behavior. *Int. J. Mol. Sci.* 2024. 25(9):4613. <https://doi.org/10.3390/ijms25094613>