

**ГЕРБЕК Ю.Э., ОСЬКИНА И.Н., ГУЛЕВИЧ Р.Г., ПЛЮСНИНА И.З.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10, e-mail: herbek@bionet.nsc.ru*

### **ВЛИЯНИЕ ОТБОРА ПО ПОВЕДЕНИЮ И МЕТИЛОБОГАЩЁННОЙ ДИЕТЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В ГИППОКАМПЕ СЕРЫХ КРЫС**

Важную роль в эволюции высших позвоночных, по-видимому, играют изменения нейрогормональных регуляторных систем, связанных с поведением [1, 2]. Особое внимание привлекает гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГНС), обладающая широким регуляторным эффектом практически на все системы организма и являющаяся ключевой в развитии реакции на стресс. В результате исследований серых диких крыс, селекционируемых на доместикационное поведение, нами были установлены значительные изменения во всех звеньях ГГНС. Отбор по поведению по отношению к человеку фактически явился отбором на стресс-реактивность, так что ответ на стресс у ручных крыс оказался значительно слабее, чем у агрессивных [3]. Эти изменения во многом схожи с широкой модификационной изменчивостью, наблюдаемой в поведении и ГГНС вследствие раннего постнатального воздействия у различных млекопитающих [4, 5]. Логично было предположить, что схожи и механизмы, обеспечивающие эти изменения, а широкая модификационная изменчивость ГГНС при экстремальном давлении отбора может канализировать микроэволюционные изменения механизмов стресс-реакции [1, 6]. Группой канадских исследователей под руководством М. Мини был описан молекулярный механизм таких изменений, возникающих у крыс под воздействием раннего постнатального хэндлинга, при увеличении числа материнских контактов с детёнышами или при введении деметилирующих агентов в гиппокамп [7]. Рецепторы глюкокортикоидов (ГР) обеспечивают действие глюкокортикоидов, конечного звена ГГНС, на различные системы организма. ГР гиппокампа, в свою очередь, являются важной частью глюкокортикоидной отрицательной обратной связи, регулирующей ответ на стресс. Увеличение количества ГР в гиппокампе усиливало отрицательную обратную связь, значительно ослабляя ответ на стресс, и снижало эмоциональность крыс. Известно, что мРНК ГР транскрибируется в виде нескольких вариантов, отличных по нетранслируемому первому экзону. В гиппокампе же среди прочих вариантов выявляется мРНК, содержащая специфический экзон 1<sub>7</sub> [8]. Снижение экспрессии гена ГР в гиппокампе в описываемой модели происходило за счёт метилирования CpG-динуклеотида в сайте связывания фактора транскрипции NGFI-A, который расположен в промоторной области экзона 1<sub>7</sub>. Деметилирование, в свою очередь, приводило к повышению экспрессии. На нашей модели, наряду с другими схожими изменениями, было показано значительное превышение количества ГР в гиппокампе ручных крыс по сравнению с агрессивными.

Указанные выше соображения поставили нас перед необходимостью исследовать: 1) сопровождаются ли различия в количестве ГР в гиппокампе соответствующей разницей в уровне их мРНК; 2) обусловлена ли разница в общем количестве мРНК ГР соответствующими изменениями в мРНК, содержащей экзон 1<sub>7</sub>; 3) наблюдаются ли различия в паттерне метилирования промоторной области экзона 1<sub>7</sub> гена ГР между ручными и агрессивными крысами; 4) вызывает ли метилобогащённая материнская диета изменения в экспрессии гена ГР и паттерне метилировании экзона 1<sub>7</sub> ГР.

#### **Материалы и методы**

Эксперимент проводился на потомках серых диких крыс, селекционируемых на ручное и агрессивное поведение по отношению к человеку. Матери опытных потомков

содержались во время беременности на метилобогатой диете [9], а матери контрольных – на стандартном питании. После декапитирования у крыс извлекали мозг и отделяли гиппокамп. Суммарную РНК и ДНК выделяли с помощью “TRI Reagent” (Sigma, США). Общее количество мРНК ГР определили методом ОТ-ПЦР, амплифицируя фрагмент кДНК ГР и *grL19* (внутренний контроль экспрессии). Количество мРНК ГР, содержащую экзон 1<sub>7</sub>, устанавливали методом ПЦР-РВ [10] в тех же образцах, амплифицируя фрагменты кДНК экзона 1<sub>7</sub> ГР и  $\beta$ -III тубулина (внутренний контроль экспрессии). Для оценки метилирования промотора экзона 1<sub>7</sub> гена ГР в гиппокампе использовали метод бисульфитного секвенирования. Геномная ДНК обрабатывалась бисульфитом натрия по стандартной методике [11] и сразу использовалась в двухэтапной ПЦР с вложенными праймерами [12]. Нарботанный ПЦР-продукт клонировали и секвенировали с использованием BigDye Terminator v.3.1 Sequencing kit (Applied Biosystems, США).

### **Результаты и обсуждение**

Регуляция экспрессии генов многих нейропептидов и нейромедиаторов, связанных с поведением, происходит при участии ГР головного мозга и, в частности, гиппокампа. Поэтому изучение экспрессии гена ГР при отборе по поведению представляет особый интерес. В настоящем исследовании показано, что количество мРНК ГР в гиппокампе ручных крыс почти в 2 раза выше, чем у агрессивных, что хорошо соответствует полученным ранее данным об уровне цитозольного ГР [3].

Из литературы известно, что мРНК ГР транскрибируется в виде нескольких вариантов, отличных по 5'-нетранслируемой области, однако идентичных по белок-кодирующим экзонам. Механизм альтернативной транскрипции гена ГР связан с возможностью инициации транскрипции с нескольких различных промоторов и последующим альтернативным сплайсингом [8]. Исследованиями группы под руководством М. Мини был вскрыт эпигенетический механизм изменений, во многом схожих с различиями, наблюдаемыми на нашей модели [7]. Описываемые изменения связаны с повышенной частотой материнских контактов с крысятами в ранний постнатальный период. У крыс, воспитанных такими матерями, во взрослом состоянии наблюдается пониженная эмоциональность, сниженный уровень глюкокортикоидов в крови и повышенное количество ГР и их мРНК в гиппокампе по сравнению с крысами, воспитанными матерями с более низким числом контактов с детёнышами. По мнению Вивера с соавт., это обусловлено повышением количества специфичной для гиппокампа мРНК, содержащей нетранслируемый альтернативный экзон 1<sub>7</sub>. При исследовании образцов ДНК, выделенной из гиппокампа, показано, что более высокий уровень транскрипции мРНК ГР под контролем промотора экзона 1<sub>7</sub> в гиппокампе таких крыс связано с меньшей частотой метилирования CpG-динуклеотида на 5'-конце сайта связывания фактора транскрипции NGFI-A, находящегося в промоторной области экзона 1<sub>7</sub> гена ГР (16-ый CpG-динуклеотид в исследованной области). У крыс же, воспитанных матерями с низким числом контактов с детёнышами, частота метилирования этого CpG-динуклеотида достигает 100% [12].

Мы предположили, что различия в количестве мРНК ГР в гиппокампе ручных и агрессивных крыс обусловлено подобным же механизмом. Однако данные, полученные в настоящем исследовании, не подтвердили наше предположение. Нами не было найдено достоверных различий в количестве мРНК ГР, содержащей экзон 1<sub>7</sub>, в гиппокампе ручных и агрессивных крыс. Из литературы известно, что содержание беременных крыс на метилобогатой диете влияет на паттерн метилирования и экспрессию некоторых генов [13]. Однако метилобогатая материнская диета также не повлияла на количество в гиппокампе мРНК ГР с экзоном 1<sub>7</sub> ни у ручных, ни у агрессивных крыс. Исследования образцов ДНК, выделенных из гиппокампа, показали, что паттерн метилирования промоторной области экзона 1<sub>7</sub> достоверно не различается у ручных и агрессивных крыс и не изменяется под влиянием метилобогатой

материнской диеты. Более того, частота метилирования 16-ого CpG-динуклеотида была крайне низкой.

И, тем не менее, общее количество мРНК ГР у ручных крыс достоверно снижается под влиянием метилобогатённой материнской диеты почти до уровня агрессивного контроля, тогда как снижение уровня мРНК ГР у агрессивных крыс недостоверно. Из этого можно заключить, что метилирование ДНК, по-видимому, вносит определённый вклад в различия в количестве мРНК ГР в гиппокампе ручных и агрессивных крыс, однако механизм этих изменений, по-прежнему, остаётся неясным.

Исследования, проведённые на пациентах, с заболеваниями, вызывающими изменения в ГГНС, также не показали отличий в паттерне метилирования гомологичного экзона ГР, хотя этот участок является высоко консервативным у крысы, мыши, человека и некоторых других млекопитающих. Частота же метилирования 16-ого CpG-динуклеотида оказалась ничтожно мала [14]. Известно, что мРНК ГР, содержащая экзон 1<sub>7</sub>, составляет лишь 8% от общего количества мРНК этого рецептора [8], и, вероятно, механизм изменения количества ГР нужно искать в изменении уровня транскрипции мРНК ГР под контролем более сильных промоторов. В недавних работах К. Лилликроп с соавт. показано, что транскрипция с промотора экзона 1<sub>10</sub> в тканях печени при белково-дефицитной материнской диете также повышается, вероятно, вследствие изменения паттерна метилирования этого промотора [15]. В промоторе экзона 1<sub>10</sub> также есть консенсусная последовательность транскрипционного фактора NGFI-A, а количество мРНК ГР с экзоном 1<sub>10</sub> составляет более 60% от общего уровня мРНК этого рецептора как в печени, так и в гиппокампе [8]. Не исключено также, что метилобогатённая диета влияет на экспрессию транскрипционных факторов регулирующие транскрипцию мРНК ГР. Кроме того, насколько нам известно, до сих пор не проводилось исследований механизма изменений экспрессии гена ГР в гиппокампе, возникающих вследствие пренатального стрессирования [5]. Вероятно, они также не связаны с изменениями транскрипции с промотора экзона 1<sub>7</sub>.

### **Выводы**

Таким образом, нами показано, что различия в количестве ГР в гиппокампе сопровождаются соответствующей разницей в уровне их мРНК. Однако количество мРНК ГР, содержащей экзон 1<sub>7</sub>, не отличается ни у ручных, ни у агрессивных крыс и не изменяется вследствие кормления матерей метилобогатёнными добавками. Не обнаружено также различий в паттерне метилирования промоторной области экзона 1<sub>7</sub> гена ГР в образцах ДНК, выделенных из гиппокампа ручных и агрессивных крыс ни в норме, ни при кормлении матерей метилсодержащими добавками. Однако установлено, что метилобогатённая материнская диета вызывает достоверное снижение общего количества мРНК ГР в гиппокампе ручных крыс по сравнению с контролем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №08-04-01412).

### **Литература**

1. Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции. – М.- 1968.- 452 с.
2. Беляев Д.К., Бородин П.М. Влияние стресса на наследственную изменчивость и его роль в эволюции // Эволюционная генетика. – Л.- 1982.- С.35-59.
3. Оськина И.Н., Плюснина И.З. Гипофизарно-надпочечниковая система при отборе животных на доместикационное поведение // Сб. науч. тр. / ИЦиГ СО РАН – Новосибирск.- 2000. - С.327-333.
4. Levine S. Infantile experience and resistance to physiological stress // Science.- 1957.- vol. 126, № 3270.- P.405.
5. Seckl J.R. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms // Mol. Cell. Endocrinol.- 2001. - vol. 185, № 1-2.- P.61-71.
6. Науменко Е.В., Попова Н.К., Иванова Л.Н. Нейроэндокринные и нейрохимические механизмы доместикации животных // Генетика.- 1987. - Т. 23, № 6.- С.1011-1025.

7. Meaney J.M., Szyf M. Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? // Trends Neurosci.- 2005.- vol. 28, № 9.- P.456-463.
8. McCormick J.A., Lyons V., Jacobson M.D., Noble J., Diorio J., Nyirenda M., Weaver S., Ester W., Yau J.L., Meaney M.J., Seckl J.R., Chapman K.E. 5'-heterogeneity of glucocorticoid receptor messenger RNA is tissue specific: differential regulation of variant transcripts by early-life events // Mol. Endocrinol.- 2000.- vol. 14, № 4.- C.506-517.
9. Прасолова Л.А., Трут Л.Н., Оськина И.Н., Гулевич Р.Г., Плюснина И.З., Всеволодов Э.Б., Латыпов И.Ф. Влияние метилсодержащей диеты в период беременности крыс (*Rattus norvegicus*) на фенотипическую модификацию агути окраса у их потомков // Генетика.- 2006.- Т. 42, № 1.- С.78-83.
10. Weaver I.C., D'Alessio A.C., Brown S.E., Hellstrom I.C., Dymov S., Sharma S., Szyf M., Meaney M.J. The transcription factor nerve growth factor-inducible protein a mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. // J Neurosci.- 2007.- vol. 27, № 7.- C.1756-1768.
11. Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. // Nucleic Acids Res.- 1994.- vol. 22, № 15.- P.2990-2997.
12. Weaver I.C., Champagne F.A., Brown S.E., Dymov S., Sharma S., Meaney M.J., Szyf M. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. // J Neurosci.- 2005.- vol. 25, № 47.- P.11045-11054.
13. Cooney, C.A., Dave, A.A., and Wolff, G.L, Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. // J. Nutr.- 2002.- vol. 132, №8 Suppl.- P.2393S-2400S.
14. Moser D, Molitor A, Kumsta R, Tatschner T, Riederer P, Meyer J. The glucocorticoid receptor gene exon 1-F promoter is not methylated at the NGFI-A binding site in human hippocampus. // World J Biol Psychiatry.- 2007.- vol. 8, № 4.-P.262-268.
15. Lillycrop K.A., Slater-Jefferies J.L., Hanson M.A., Godfrey K.M., Jackson A.A., Burdge G.C. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. // Br J Nutr.- 2007.- vol. 97, № 6.- P.1064-1073.

### **Резюме**

Исследования, проведённые на серых крысах, селекционируемых по поведению, показали значительное превышение мРНК рецептора глюкокортикоидов в гиппокампе ручных крыс по сравнению с агрессивными. Установлено достоверное снижение уровня мРНК ГР у потомков ручных крыс, содержащихся во время беременности на метилобогатой диете.

Here we report that selection for behaviour and maternal methyl-supplemented diet alter rat hippocampus glucocorticoid receptor (GR) mRNA expression. Tame selection is associated with increased GR mRNA expression as compared with aggressive rats, whereas maternal methyl-supplemented diet inhibits tame rat GR gene activity.