УДК 611.813.14.018: 599.323.4

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО ДНК – ЛОКУСА 256А/G ГЕНА ПЕРЕНОСЧИКА ДОФАМИНА SLC6A3 И УРОВНЕЙ ДОФАМИНА С ПОВЫШЕННОЙ ТРЕВОЖНОСТЬЮ

Леушкина Н.Ф., Ханнанова А.Я., Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б.

Башкирский государственный университет, Уфа, e-mail: leona55@mail.ru

В работе впервые приведены сведения об ассоциации полиморфного ДНК – локуса 256A/G гена переносчика дофамина SLC6A3 и уровней дофамина с повышенной тревожностью крыс с генотипом A_2/A_2 по локусу TAG 1A DRD2.

Ключевые слова – локус 256A/G гена переносчика дофамина SLC6A3, катехоламины, миндалевидный комплекс мозга

ASSOCIATION OF POLYMORPHIC DNA LOCUS 256A/G SLC6A3 GENE AND DOPAMINE LEVELS INCREASED LEVEL OF ANXIETY

Leushkina N.F., Khannanova A. Ja, Akhmadeev A.V., Kalimullina L.B.

The Bashkir state university, Ufa, e-mail: leona55@mail.ru

For the first time provides information about the association of polymorphic DNA locus 256A / G gene SLC6A3 dopamine transporter and dopamine levels increased level of anxiety in rats with A2/A2 genotype at locus TAG 1A DRD2

Keywords: Locus 256A/G gene dopamine transporter dopamine gene SLC6A3, catecholamines, amygdaloid complex of the brain

По данным семейных и близнецовых исследований генетические факторы играют важную роль в развитии депрессивных и тревожных расстройств. Исследователи в области молекулярно-генетических механизмов депрессивных и тревожных расстройств, определили, что тревожность и склонность к депрессии на 33-46% определяются наследственностью [4, 8]. Однако механизм такой предрасположенности остается неясным. Это обосновывает правомерность поиска молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к повышенной тревожности.

На современном этапе одним из наиболее перспективных направлений при исследовании патогенетических механизмов тревожных расстройств является изучение животных, которые имеют генетические различия в характере ответа на эмоционально – стрессовые воздействия [1].

В ранее проведенных исследованиях [2] на основании сравнительного анализа поведения двух групп крыс линии WAG/Rij, гомозиготных (A_1/A_1 и A_2/A_2) по локусу $TAG\ IA$ гена рецептора второго типа (DRD2) в условиях новизны обстановки, было установлено наличие значимых межгрупповых различий. Крысы с генотипом A_1/A_1 (далее A1A1) по сравнению с крысами с генотипом A_2/A_2 (далее A2A2) проявляли большую двигательную активность и более выраженную исследовательскую деятельность. На основании этих результатов было высказано предположение, что крысы A2A2 имеют больший уровень тревожности и

проявляют пассивную стратегию приспособительного поведения в отличие от другой группы, паттерн поведения которой может быть охарактеризован как активная стратегия поведения.

Анализ ежедневной (на протяжении всех десяти дней) динамики поведенческих реакций позволил углубить эти представления, показав, что крысы А1А1 в первые пять дней тестирования проявляли неадекватную в условиях новизны обстановки реакцию в форме гиперактивности [3]. У крыс А2А2, ни со стороны двигательной активности, ни со стороны исследовательской деятельности не отмечалось значимых изменений. Крысы во время всех посещений «открытого поля» мало передвигались, часто застывая на месте, совершая единичные стойки, количество которых в первый день эксперимента было вдвое меньше, чем у крыс А1А1. Эти данные показали, что крысы А2А2 имеют высокую базовую тревожность. У крыс А2А2 выявлена ассоциация локуса NcoI гена DRD2 с повышенной тревожностью [5].

Известно, что переносчик дофамина играет ключевую роль в процессе регуляции дофаминергической трансмиссии посредством обратного захвата дофамина из синаптической щели и доставке его обратно в пресинаптический терминал. У человека ген переносчика дофамина (SLC6A3) локализован на хромосоме 5 в области p15.3, содержит 12 экзонов и имеет длину 4,2 тысяч п.о. У крысы данный ген расположен на коротком плече 1 хромосомы (1p11) и со-

стоит из 15 экзонов. Известно, что у крысы (Rattus norvegicus) ген переносчика дофамина *SLC6A3* локализован во втором экзоне и на 94% гомологичен с геном переносчика дофамина человека [9].

Целью данного сообщения является изложение результатов сравнительной оценки частот генотипов и аллелей полиморфного локуса 256A/G гена SLC6A3 в двух группах крыс линии WAG/Rij, различающихся по уровню базовой тревожности, и сопоставление полученных результатов с содержанием дофамина (ДФ) и его метаболита 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в центре афферентного синтеза — миндалевидном комплексе мозга (МК).

Все эксперименты проведены с соблюдением норм биомедицинской этики. Исследование полиморфного локуса 256A/G SLC6A3 проведено на 90 крысах (по 45 крыс в группах), содержание ДФ и ДОФУК в МК определяли, используя 70 крыс (по 35 в группе), методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для генетического анализа ДНК была выделена из лимфоцитов периферической крови с использованием метода Мэтью [11]. Амплификацию локуса 256A/G гена SLC6A3 проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции синтеза ДНК (ПЦР) на амплификаторе «Терцик» производства г. Пущино с использованием ДНК-полимеразы Тегтив aguaticus производства фирмы «Биотекс» (Москва). Праймеры

5'-AGC AAA GCC GAT GAC TGA TAG CAG GAA TC-3'

5'-ATT TTC TTG CTC CAG GTC TCC CGC TCT GA-3'

были подобраны с помощью программы Primer3 (http://frodo.wi.edu/primer3) с.н.с. отдела геномики человека (зав. – проф. Э.К.Хуснутдинова) Института биохимии и генетики УНЦ РАН Казанцевой А.В. Для определения нуклеотидных замен использовали метод анализа ПЦР-ПДРФ. После денатурации (4 мин при 94°) выполняли 35 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 30 сек при 94°, синтез ДНК 1,5 мин – при 56°, денатурация – 30 сек – при 72°, затем пробы выдерживали 10 мин – при 72°, охлаждали. Для выявлених полиморфизма, 10 мкл реакционной смеси обрабатывали 3 единицами рестриктазы *TaqI*. В результате реакции аллель А локуса длиной 212 пар оснований оставался интактным, а G подвергался ферментативному гидролизу. Длины фрагментов G были равны 180 и 32 пар оснований. Результаты рестрикционного анализа оценивали при проведении электрофореза в 7% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Содержание ДФ и ДОФУК в МК определяли на высокоэффективном жидкостном хроматографе (Аквилон, Россия) со спектрофотометрическим детектором (UVV-104 М). Область МК выделяли из нативного мозга и гомогенизировали в 20 объемах холодной 0,1 M перхлорной кислоты (Sigma, USA) и 1 пг/50 мкл дигидроксибензиламина гидробромида (ДГБА, Sigma, USA) в качестве внутреннего стандарта. Гомогенизат центрифугировали (при-20 °C) в течение десяти минут при 6000 оборотов в минуту. Супернатант подвергали микрофильтрации с помощью специальных наборов фирмы «Биохром» (Россия). После повторного центрифугирования пробы анализировали. Статистическую обработку проводили в программном пакете Statistica 5,5.

Результаты оценки распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса 256A/G SLC6A3 в группах крыс линии WAG/Rij (A1A1 и A2A2), представлены в таблице.

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного маркера *256A/G* SLC6A3 крыс линии WAG/Rij (A1A1 и A2A2)

Крысы WAG/Rij	Генотипы			Аллели	
	A/A	A/G	G/G	A	G
A1A1	0,41	0,44	0,15	0,64	0,36
A2A2	0,65	0,32	0,03	0,82	0,18

Мы провели анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного маркера 256A/G гена SLC6A3 внутри популяции крыс A1A1 и A2A2 и обнаружили три генотипа: A/A, A/G, G/G. Распределение частот генотипов и аллелей локуса 256A/G гена SLC6A3 соответствует распределению Харди-Вайнберга (p=0.913 для крыс A1A1 и p=0.784 для крыс A2A2).

В группе крыс, характеризующихся повышенным уровнем тревожности (A2A2), преобладает генотип A/A (с частотой 0,65), следующим по частоте является генотип A/G (0,32), а частота генотипа G/G составляет 0,03. Частота встречаемости аллелей составляет 0,82 (A) и 0,18 (G).

В группе крыс, гомозиготных по аллелю A_1 локуса Taq1A гена DRD2 (характеризующихся пониженным уровнем тревожности), генотипы имеют следующую частоту: $A/A-0,41,\ A/G-0,44,\$ наиболее редкий генотип G/G-0,15. Частота встречаемости аллелей составляет 0,64 (A) и 0,36 (G).

В результате сравнительного анализа выявлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов маркера 256A/G гена SLC6A3 между группами крыс – носителями генотипа А,/А, и генотипа A_{γ}/A_{γ} ($\chi^2 = 6.87$, df = 2, p = 0.032), хотя в распределении частот аллелей статистически значимых различий обнаружено не было ($\chi^2 = 3.05$, $d\hat{f} = 1$, p = 0.081). Дальнейший анализ показал, что в группе крыс с повышенным уровнем тревожности (А2А2) выявлено статистически значимое увеличение частоты генотипа A/A гена SLC6A3 $(\chi^2 = 4.01, df = 2, p = 0.0445)$ по сравнению с группой крыс, гомозиготных по аллелю А, DRD2. Таким образом, нами установлено, что маркером повышенного риска развития тревожности является генотип А/А локуса 256A/G гена SLC6A3 (OR = 2,77, 95 %CI 1,02-7,64).

Анализ содержания ДФ, ДОФУК в МК показал, что при почти равных количествах содержания в ткани МК ДОФУК (p>0,05), содержание ДФ значимо больше у крыс A1A1 (p<0,01). Соотношение ДОФУК/ДФ вдвое меньше $(0,17\pm0,03)$ против $(0,39\pm0,03)$ у крыс A1A1, что указывает на его ускоренный метаболизм. Эти результаты показывают, что тревожность крыс A2A2 связана со сниженным содержанием ДФ и замедленным его метаболизмом в МК, который является ведущей структурой мозга в определении стратегии поведения.

Итак, результаты исследования показывают, что у крыс A2A2 пассивная стратегия поведения, обусловленная высокой базовой тревожностью, связана с генотипом A/A локуса локуса 256A/G гена SLC6A3 и сниженным содержанием дофамина, замедленным его метаболизмом в ключевой структуре лимбической системы — МК. Роль МК в формировании тревожности показана различными методами в многочисленных исследованиях на человеке и животных [6, 7].

На основании полученных нами данных можно предполагать, что между двумя изученными полиморфными локусами гена DRD2 – *TAG 1A* и локуса *256A/G* гена SLC6A3 – существует связь, и гаплотип DRD2×N2/×N2 – SLC6A3×A/×A предопределяет повышенную тревожность крыс A2A2. Но подобный вывод можно будет сделать после анализа ассоциаций по сочетани-

ям генотипов генов DRD2 и SLC6A3 с тревожным поведением у крыс линии WAG/Rij.

В данной работе была продемонстрирована вовлеченность локуса 256А/G, находящегося в втором экзоне гена SLC6A3 с тревожным поведением у крыс линии WAG/ Rij. К настоящему моменту, не существует опубликованных литературных данных о функциональной значимости данного полиморфного локуса. Возможно, что крысы A2A2, имеющие генотип А/А обладают повышенной экспрессией гена SLC6A3, а, следовательно, область распространения и время нахождения дофамина в синаптической щели у них меньше. При интерпретации данных также следует учитывать, что в исследованиях, проведенных на добровольцах с помощью метода позитронно-эмиссионной томографии с введением ([18F] FDOPA), радиоактивного аналога предшественника дофамина L-DOPA, показано, что у носителей аллеля А2 (с генотипом А2/ А2 и А1А2) снижена активность ДОФА-декарбоксилазы, конечного энзима в синтезе дофамина [10].

Авторы приносят благодарность заведующему отделом геномики человека Института биохимии и генетики УНЦ РАН заслуженному деятелю науки РФ, профессору, доктору биологических наук Хуснутдиновой Эльзе Камильевне за консультативную помощь.

Список литературы

- 2. Леушкина Н.Ф., Калимуллина Л.Б. // Успехи современного естествознания. 200810. C. 18.
- 3. Леушкина Н.Ф., Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. // Успехи современного естествознания. 2011.
- 4. Рогаев Е.И., Боринская С.А. // Химия и жизнь. XXI век. -2000.-№3.-C.~20.
- 5. Ханнанова А.Я., Леушкина, Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. // Успехи современного естествознания. 2011.
- 6. Bremner J. // Expert Rev Neurother. 2004. Vol. 4, Nº2. 275 p.
- 7. Charney D. // Acta Psychiatr Scand. 2003 Suppl. Vol. 417. 38 p.
- 8. Grataca M., Sahum J., Callago X., Dierseen M. // Genes Brain Behav. 2007. Vol. 6. P. 2.
- 9. Jonathan M., Sagvolden T. // Behav and Brain Function. 2005. Vol. 24. P. 112.
- 10. Laakso A., Pohjalainen T., Bergman J. et al. // Pharmacogenet Genomics. 2005. Vol. 15, Ne6. P. 387.
- 11. Mathew C.C. Methods in Molecular Biology / Ed. Walker J.M. New York: Human Press, 1984. Vol. 2. P. 31-34.