

Молекулярные механизмы регуляции  
поведения  
Лекция 1  
Информационные биополимеры

# Поведение

- Одновременно и самое очевидное и самое сложное явление Природы.
- Результат естественного отбора, закрепленного в ДНК, и онтогенетического опыта индивидуума.
- Доказательства связи между молекулами и поведением
- Большинство психических и поведенческих характеристик находятся под значительным генетическим контролем, а, следовательно, связаны со структурой молекулы ДНК.
- Психотропный эффект некоторых соединений известен уже с доисторических времен.

# Проблема

- Накоплена огромная экспериментальная информация об ассоциации между мутациями в молекуле ДНК и наследственной изменчивостью поведения (генетика поведения), а также об эффектах различных соединений на поведение (психофармакология).
- Имеются значительные успехи в изучении молекулярных и биохимических процессах в нервных клетках (молекулярная нейробиология, нейрохимия).
- Каждое из этих двух направлений развивается по своим законам и их развитие только усиливает разрыв между ними.

# Цель и задачи

- Цель: Попытка обосновать связь между способностью молекул вступать в физико-химические взаимодействия с другими биологическими молекулами и их участием в регуляции поведения и психических процессов.
- Задачи:
  - Механизмы (интерфейсы), позволяющие молекулам воздействовать на поведение.
  - Возможность предсказания особенностей поведения индивидуума на основании сиквенса ДНК .
  - Возможность предсказания психотропной активности соединения на основании его взаимодействия с нейромолекулами.
- Сущности: молекулы, нейроны, поведение и молекулярные интерфейсы между нейронами.

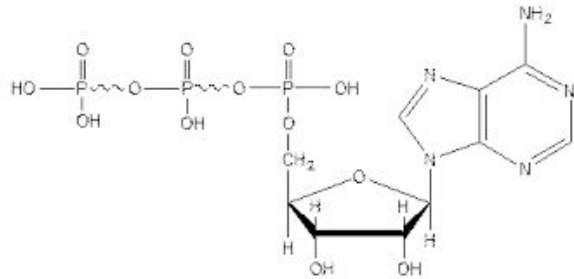
# Основные догмы

- Догма материальности: все проявления поведения являются функциями молекулярных процессов в центральной нервной системе.
- Догма физического основания: все процессы в мозге основаны на фундаментальных законах физики, в том числе законах термодинамики.
- Догма массовости (кооперативности): предсказуемые, воспроизводимые, управляемые процессы и явления являются результатом совместного действия большого количества молекул или нейронов.
- Догма (строгой, функциональной) причинности: все процессы в нервной системе (как и все в природе) – есть цепочки последовательных событий, в которых каждое последующее событие определяется только предыдущим событием в цепочке, тогда как последующие события не могут управлять предыдущими.

# ДНК и поведение

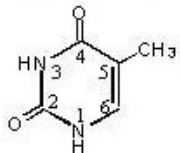
- Высокий (до 70%) вклад наследственных факторов в поведение.
- Поведение является продуктом длительной эволюции.
- ДНК – ключевая молекула в клетке: в каждой клетке эукариотического организма только две копии молекулы ДНК.
- В ДНК записана вся информация о структуре белков и о процессах в клетке.
- Наследственные особенности поведения могут быть сцеплены с определенными участками молекулы ДНК.

# Молекула ДНК. Принцип комплиментарности

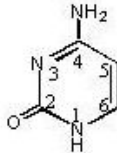


## АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ

### ПИРИМИДИНОВЫЕ

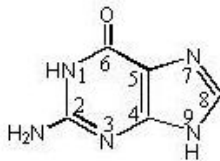


Тимин  
Т

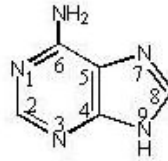


Цитозин  
С

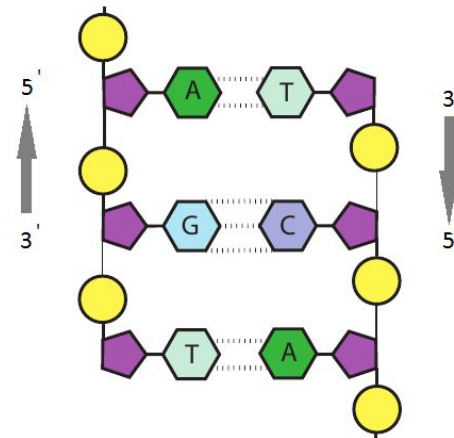
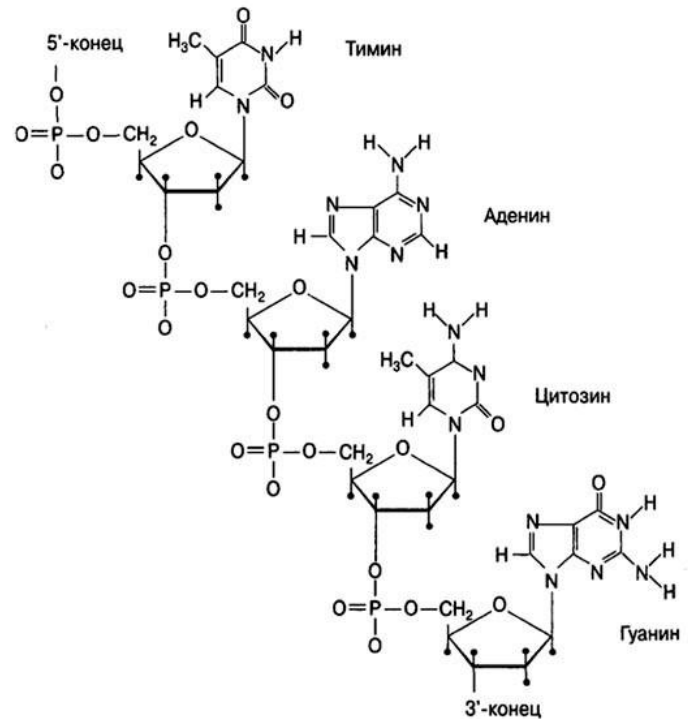
### ПУРИНОВЫЕ



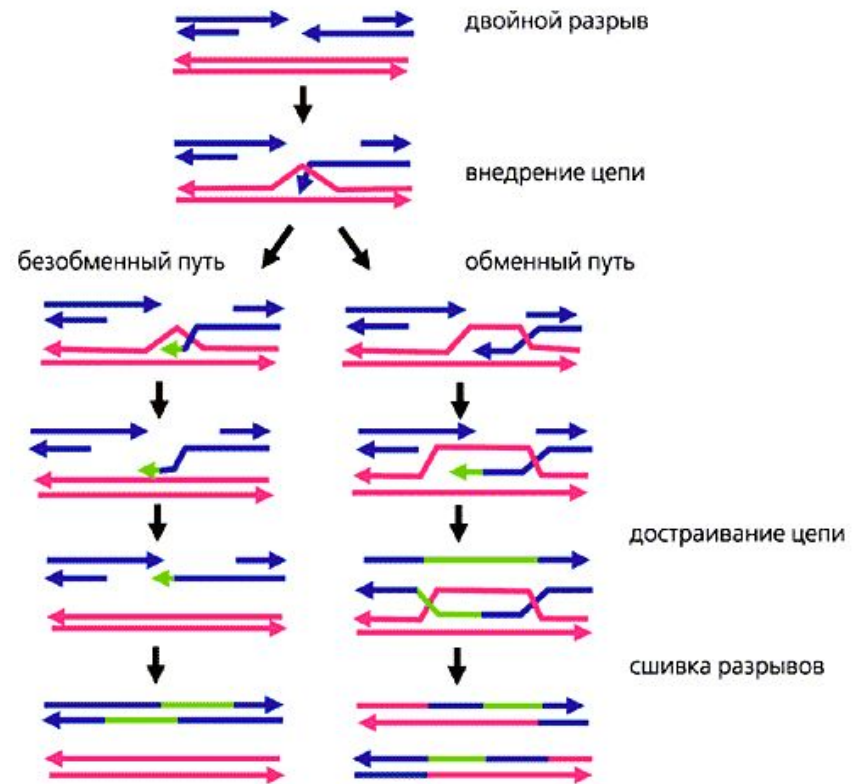
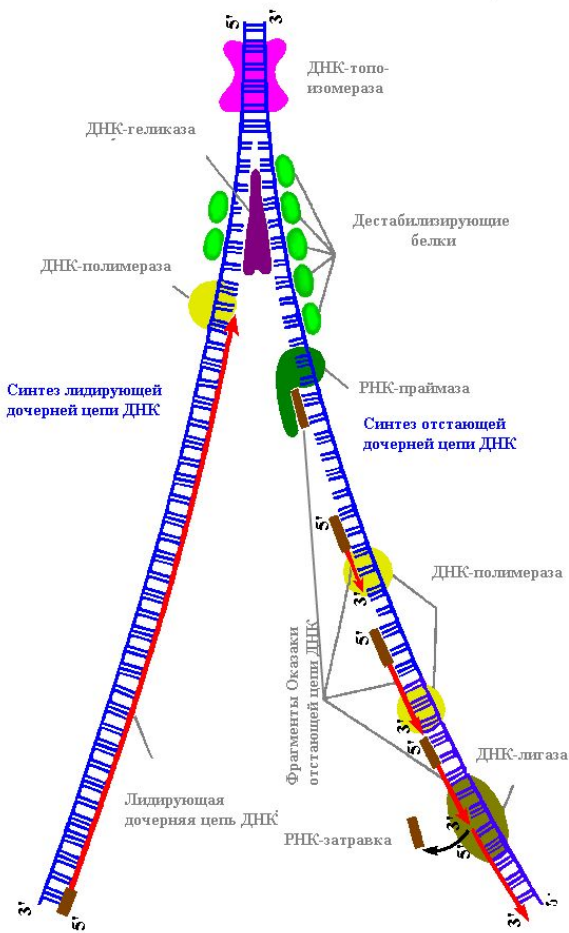
Гуанин  
G



Аденин  
А



# Репликация и рекомбинация





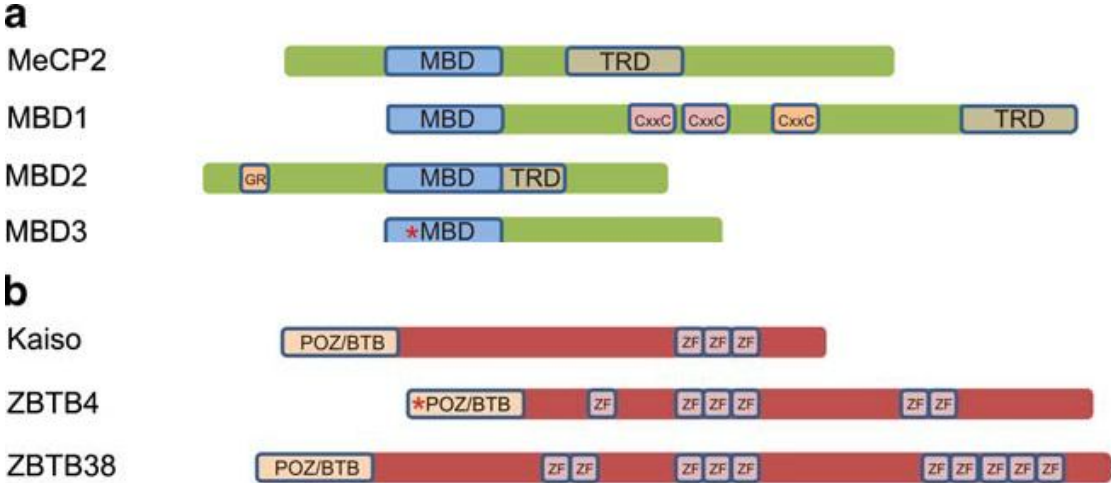
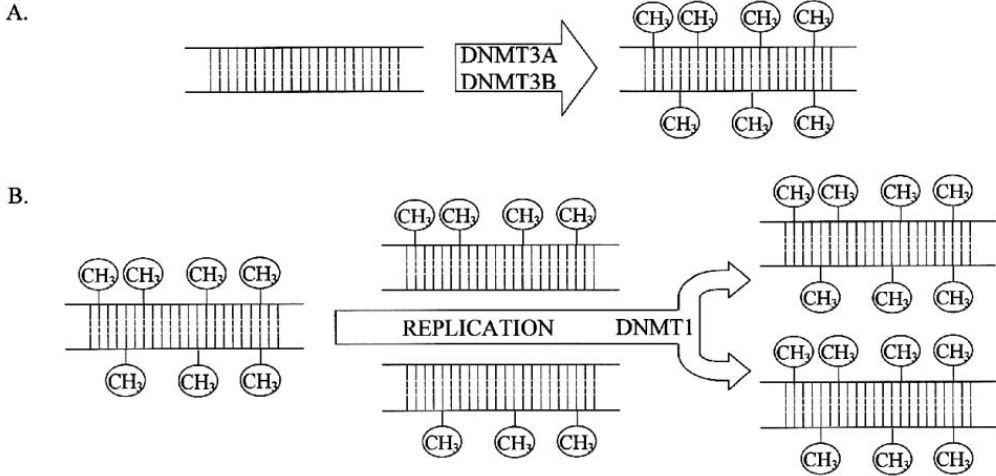
# Типы мутаций

Single nucleotide variant	ATTGGCCTTAACCCCGGATTATCAGGAT ATTGGCCTTAACCCCGGATTATCAGGAT
Insertion-deletion variant	ATTGGCCTTAACCCGATCCGATTATCAGGAT ATTGGCCTTAACCC---CCGATTATCAGGAT
Block substitution	ATTGGCCTTAACCCCGGATTATCAGGAT ATTGGCCTTAACAGTGGATTATCAGGAT
Inversion variant	ATTGGCCTTAAGGGGGGATTATCAGGAT ATTGGCCTTGGGGGGTATTATCAGGAT
Copy number variant	ATTGGCCTTAAGGCCTTAACCCCGATTATCAGGAT ATTGGCCTTA-----ACCTCCGATTATCAGGAT

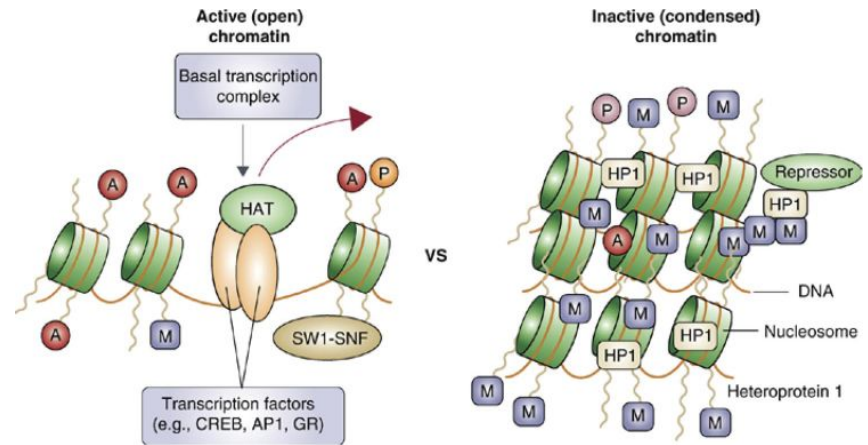
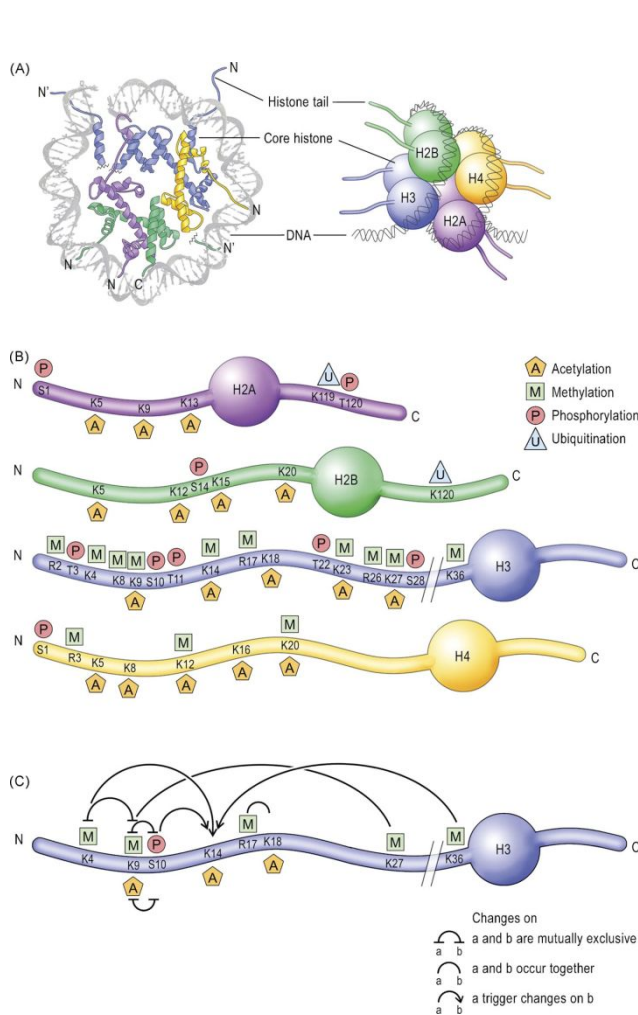
(Frazer et al., Nat Rev Genet 2009, 10:241-251)

- Признаки вероятных функциональных мутаций:
- нарушена рамка считывания,
- стоп-кодон в неположенном месте,
- крупная делеция в кодирующей части,
- изменение аминокислоты,
- затронуты промоторы и/или энхансеры.

# Метилирование ДНК

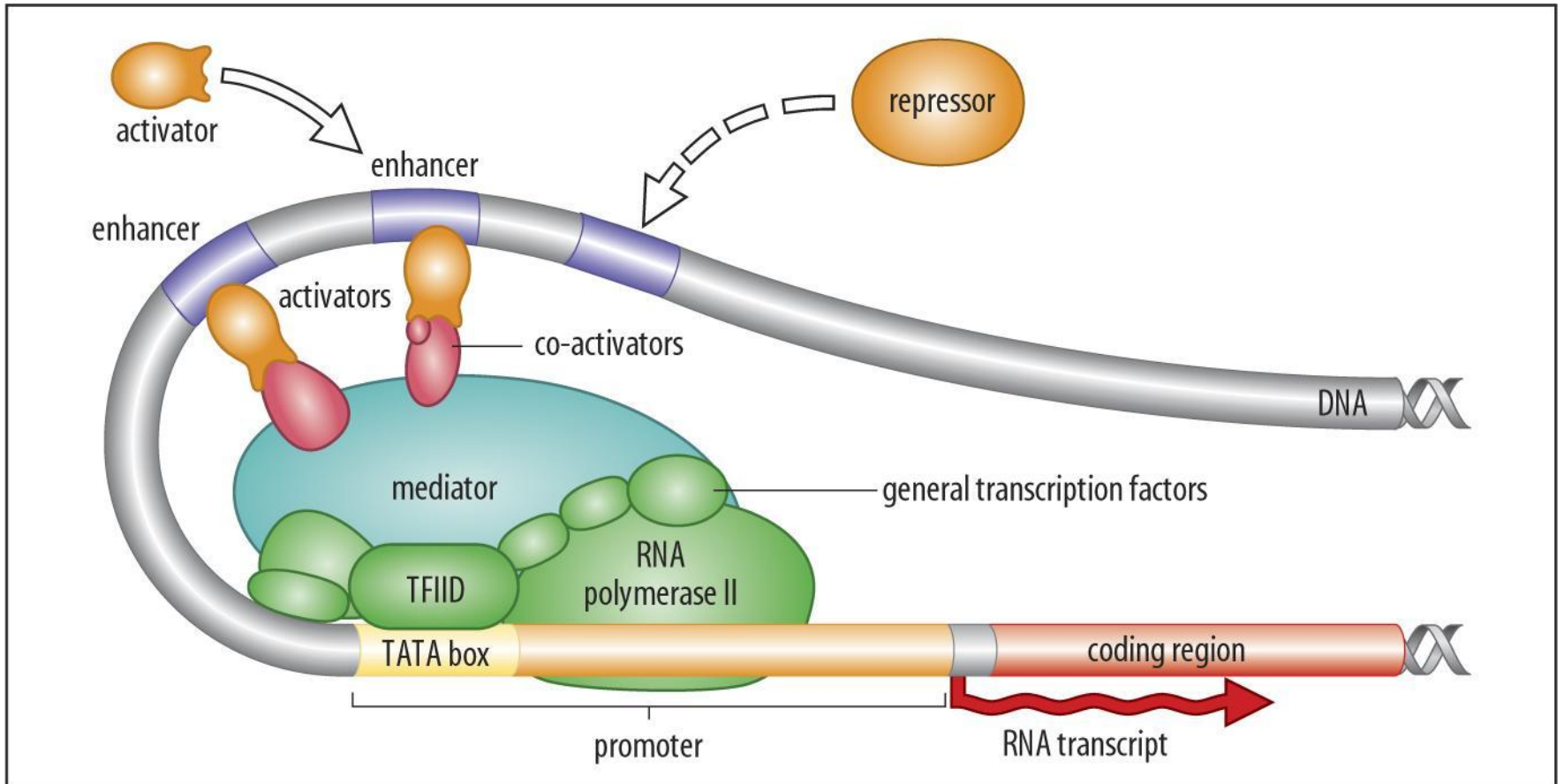


# Эпигенетическая регуляция транскрипции. Обратимое ацетилирование гистонов



Обратимое ацетилирование гистонов приводит к долговременной модификации экспрессии генов = память на геномном уровне

# Регуляция транскрипции



# Колинеарность ДНК и белков



ДНК (транскрипция) → мРНК (сплайсинг) → зрелая мРНК → белок

# Генетический код

Аминокислота	Кодирующие триплеты - кодоны
Аланин	GCT GCC GCA GCG
Аргинин	CGT CGC CGA CGG AGA AGG
Аспарагин	AAT AAC
Аспарагиновая кислота	GAT GAC
Валин	GTT GTC GTA GTG
Гистидин	CAT CAC
Глицин	GGT GGC GGA GGG
Глутамин	CAA CAG
Глутамат	GAA GAG
Изолейцин	ATT ATC ATA
Лейцин	CTT CTC CTA CTG TTA TTG
Лизин	AAA AAG
Метионин	ATG
Пролин	CCT CCC CCA CCG
Серин	TCT TCC TCA TCG AGT AGC
Тирозин	TAT TAC
Треонин	ACT ACC ACA ACG
Триптофан	TGG
Фенилаланин	TTT TTC
Цистеин	TGT TGC
Стоп кодоны	TGA TAG TAA

# Трансляция

- Трансляция белка:
- Связывание мРНК с рибосомой
- Трансляция начинается с кодона AUG и стартовой (метиониновой) транспортной РНК
- Присоединение аминокислот осуществляется с помощью транспортных тРНК, число которых соответствует числу кодирующих триплетов (61).
- Трансляция останавливается одним из стоп кодонов UAA, UAG UGA
- Белок принимает активную форму или самосборкой или с помощью шаперонов.

# Функции белков в клетке

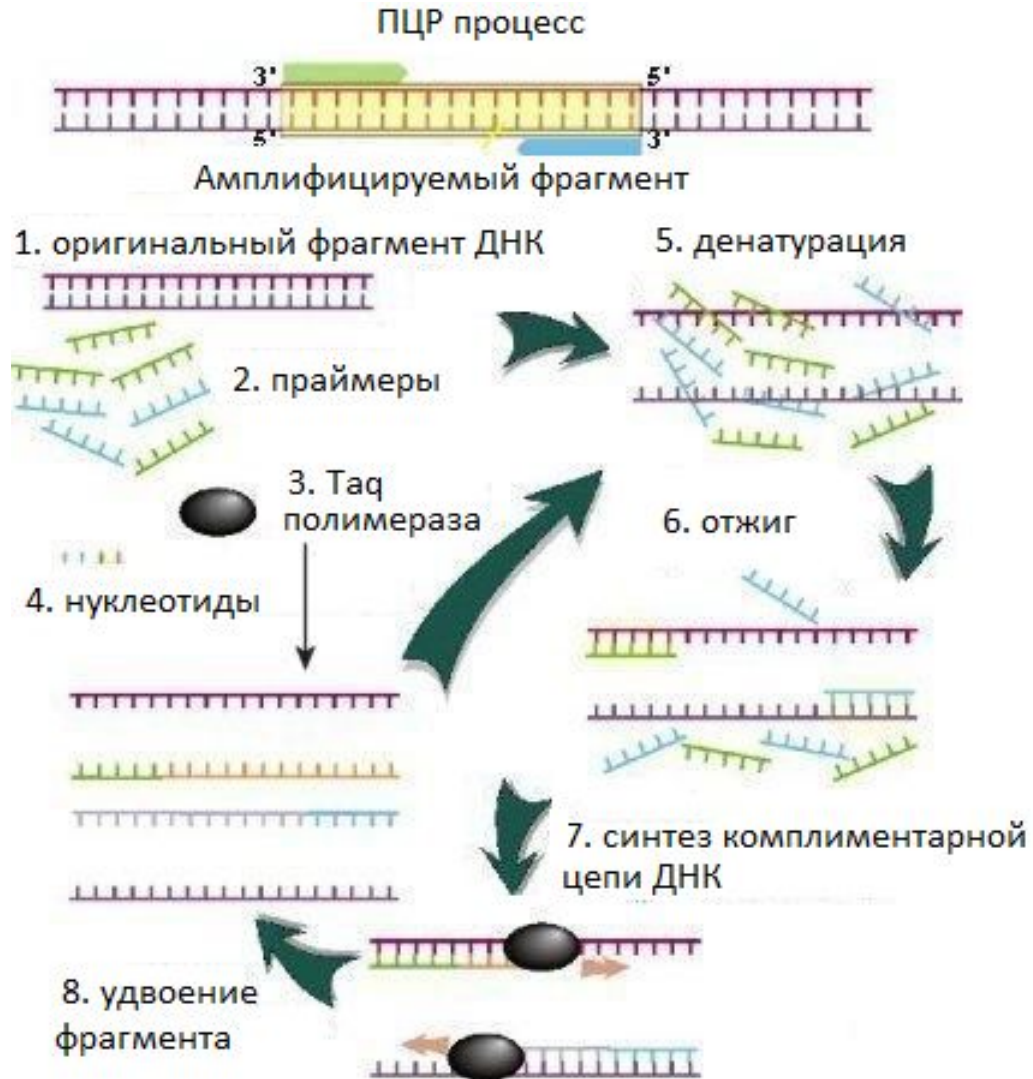
- Структурная (внутренний и внешний скелет, система микротрубочек).
- Механическая (комплексы актина и миозина).
- Транспортная (транспортеры, каналы, поры).
- Рецепторная (рецепторы).
- Каталитическая (ферменты).
- Регуляторная (транскрипционные факторы, регуляторные субъединицы).
- Информационная (белковые медиаторы).



# Цель и задачи генетики поведения

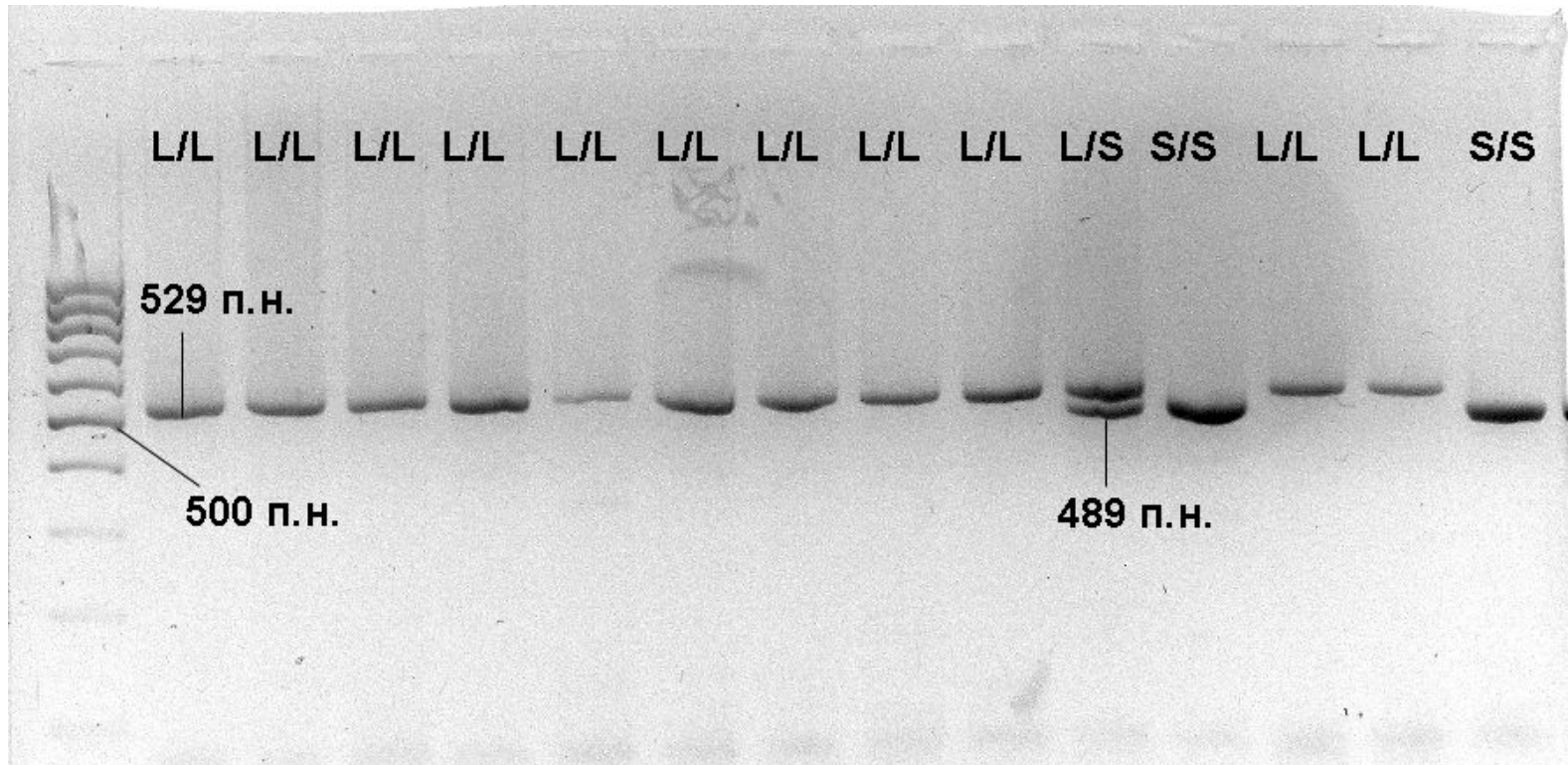
- Цель: Изучение природы связи между поведением и нуклеотидной последовательностью молекулы ДНК.
- 1. Связь мутаций в отдельных генах с выраженностью поведения (прямая задача).
- 2. Предсказание особенностей поведения и чувствительности к фармакологическим препаратам по сиквенсу ДНК (обратная задача).

# Амплификация - ПЦР



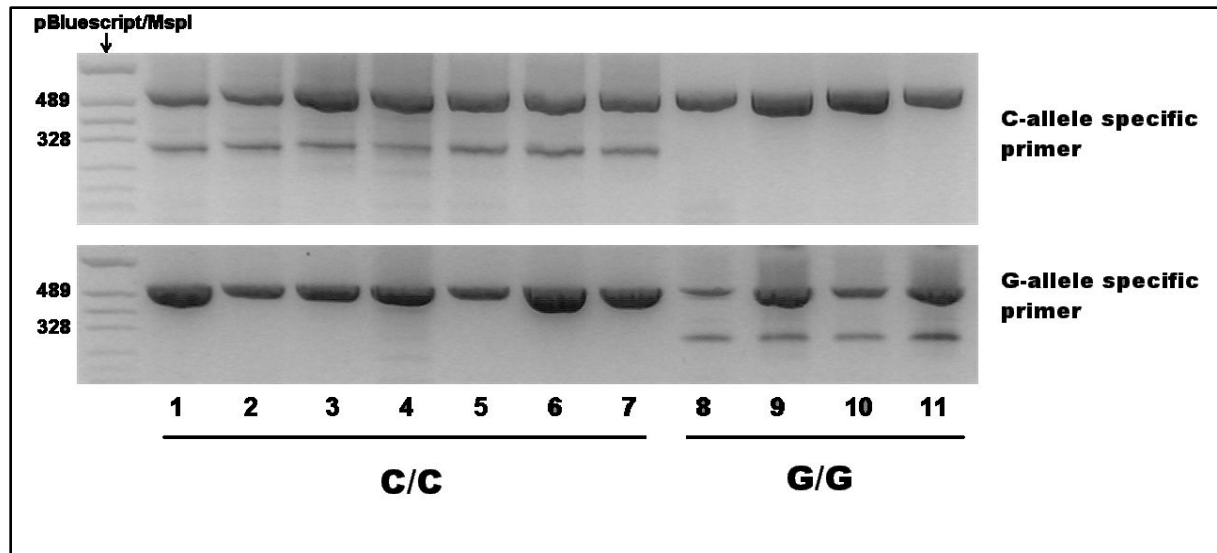
# Выявление 5HTLR<sub>2</sub> полиморфизма

L – 529 п.н., S – 489 п.н.



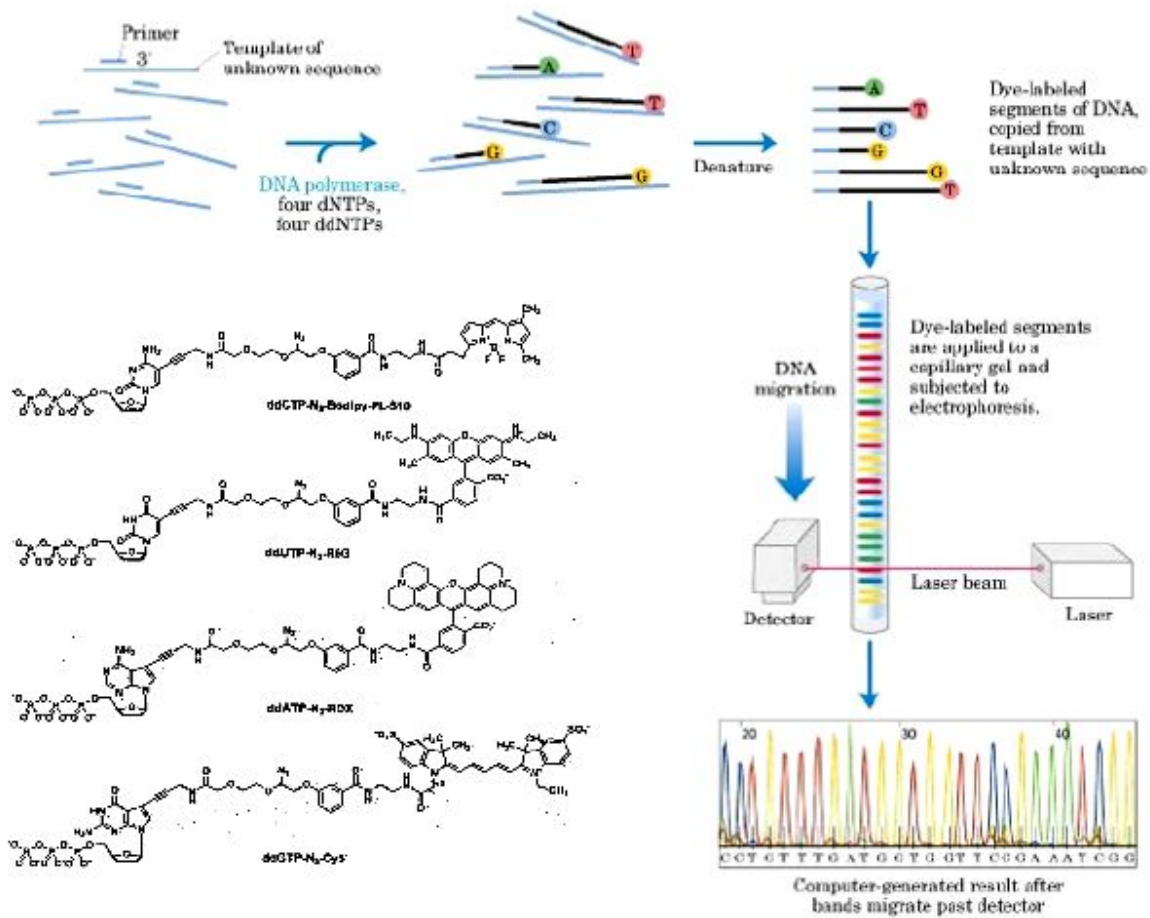
# C1473G в генеТРН-2 мыши

Праймер	Сиквенс
Прямой внешний	5'-TTTGACCCAAAGACGACCTGCTTGCA
Обратный внешний	5'-TGCATGCTТАCTAGCCAACCATGACA
C-специфический	5'-CAGAATTTCAATGCTCTGCGTGTGG <b>G</b>
G-специфический	5'-CAGAATTTCAATGCTCTGCGTGTGG <b>C</b>



- Линии: 1-СВА, 2-РТ, 3-С57ВL/6, 4-С3Н/He, 5-АКR, 6-УТ, 7-DD, 8-BALB/c, 9-A/He, 10-CC57BR, 11-DBA/2

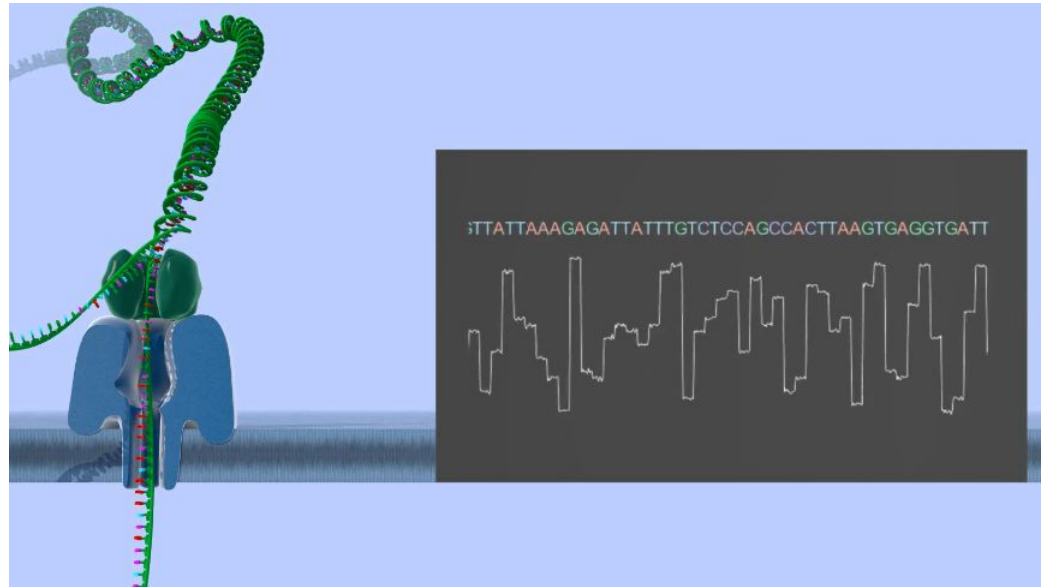
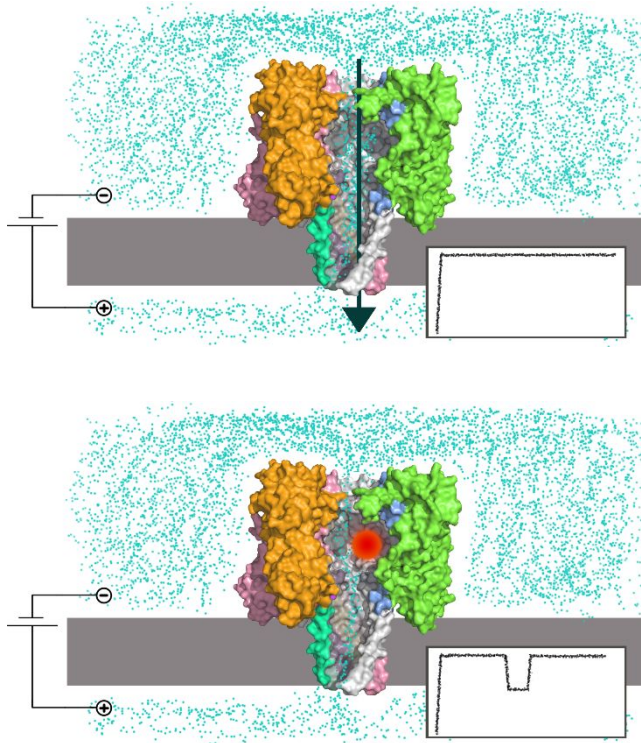
# Секвенирование по Сэнгеру



# Полногеномное секвенирование

- Позволяет установить полную нуклеотидную последовательность всего генома.
- Разбивание генома на небольшие фрагменты около 100 нуклеотидов.
- Лигирование фрагментов с универсальными праймерами – создание библиотеки.
- Одновременное секвенирование библиотеки на одной из платформ.
- Сборка генома на основе стандартного шаблона.

# Нанопоровое секвенирование

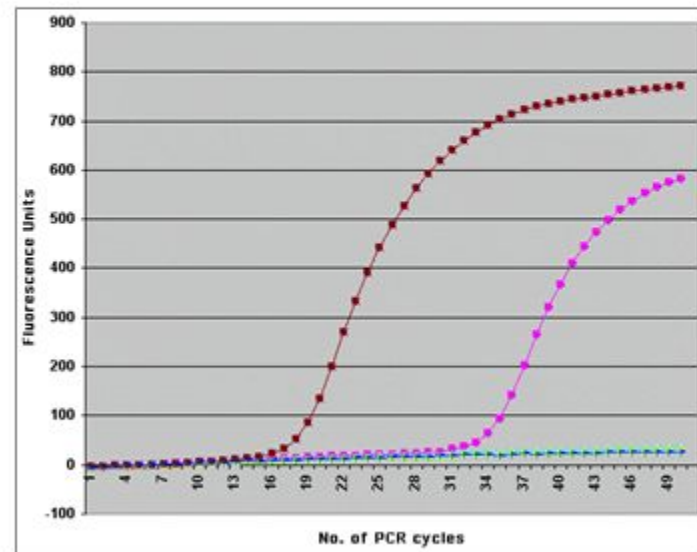
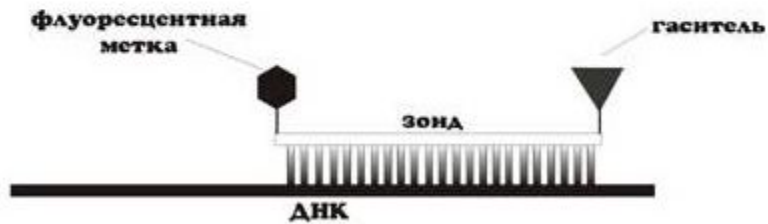


- Возможно только для одноцепочечных молекул.
- В отсутствие молекулы ток ионов через нанопору максимальный.
- Молекула нуклеиновой кислоты под действием поля протаскивается через пору и частично снижает проходимость ионов.
- Снижение тока зависит от размера фрагмента молекулы.

# Количественная ОТ-ПЦР



**SYBR Green I**



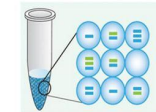


# Цифровая ПЦР



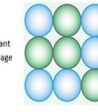
## Partition

The mixture of PCR reaction is distributed randomly in ~20000 droplets. Each constitutes an independent microreactor



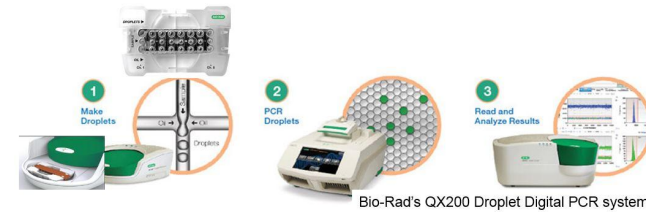
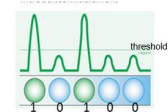
## PCR amplification

as in standard PCR



## Detection

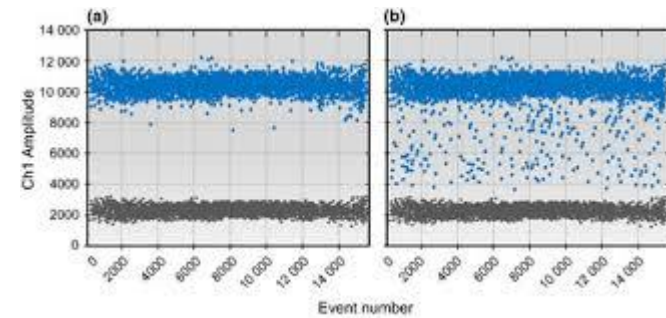
All droplets were counted. Fluorescence upper the threshold is considered as a positive PCR, whereas under it's negative.



Bio-Rad's QX200 Droplet Digital PCR system

$$p = \frac{\mu^k}{k!} * e^{-\mu}$$

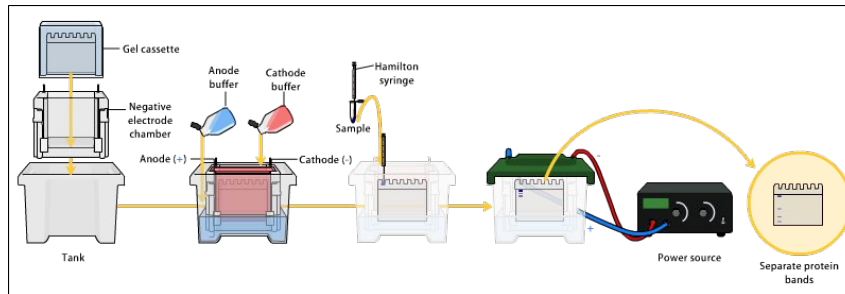
$$k = 0; p = e^{-\mu}; \mu = -\ln(p)$$



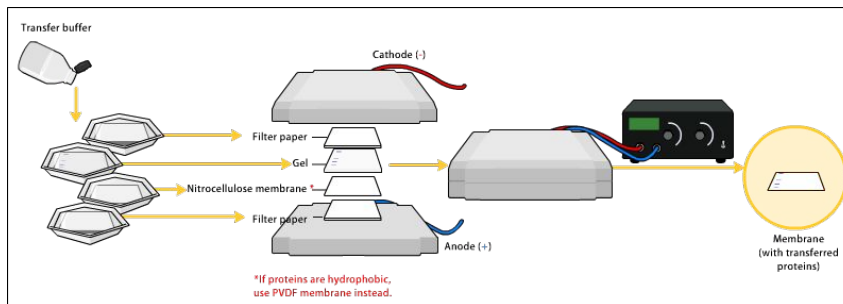
# Транскриптомный анализ

- Определяет частоту всех транскриптов в образце.
- Выделение общей РНК.
- Удаление рибосомальной и транспортной РНК.
- Синтез кДНК.
- Фрагментация кДНК на фрагменты около 100 п.о.
- Создание библиотеки фрагментов.
- Секвенс библиотеки фрагментов.
- Идентификация и определение относительной частоты экзонных фрагментов генов.

# Исследование белковых продуктов

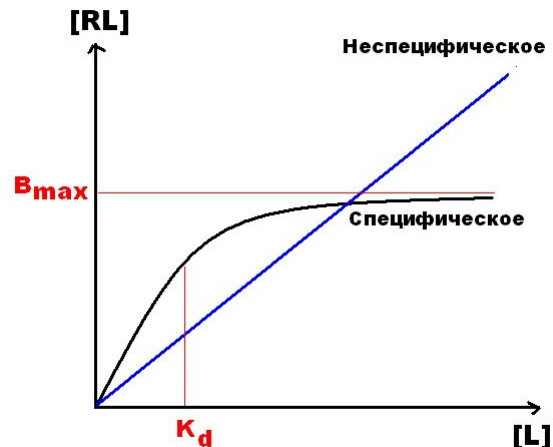
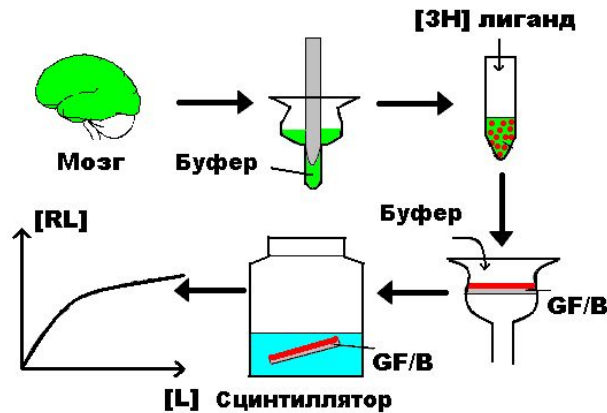


- Качественное и количественное определение белков основано на разделении их по массе в ПААГ с последующем переносом на нейлоновую мембрану, связыванием с меченными пероксидазой хрена специфическими антителами и фотометрии полос.



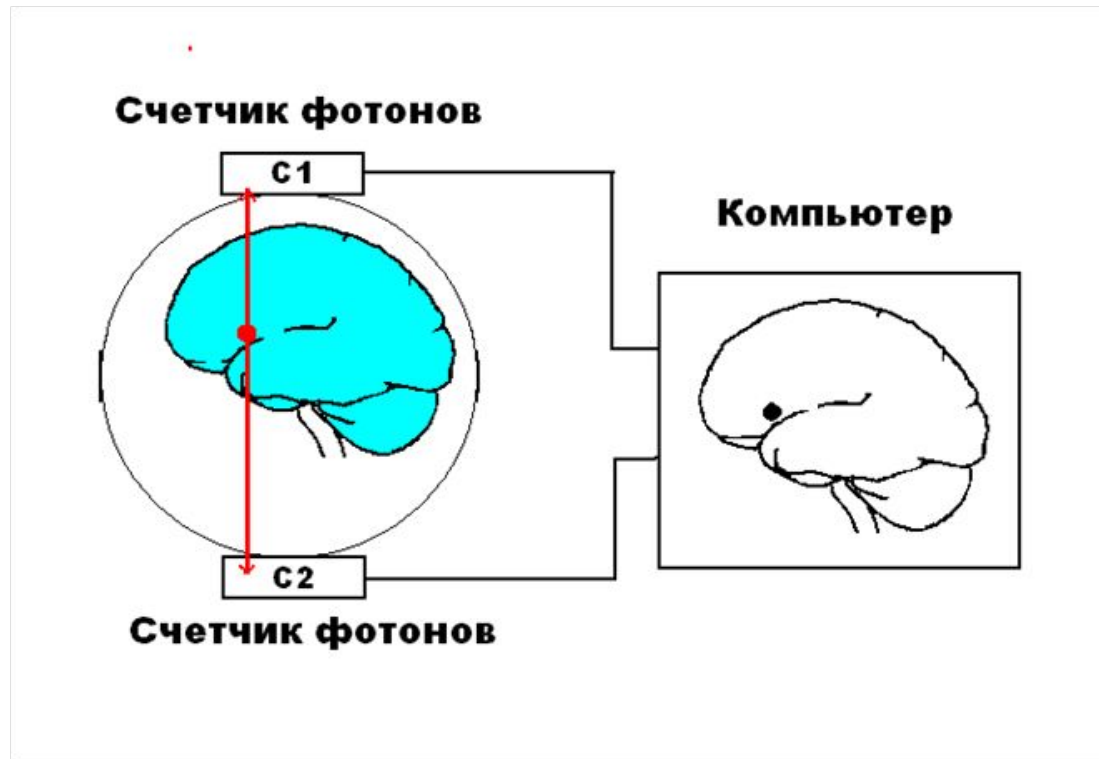
Wester-blot gp130 из стриатума мышей четырех линий

# Радиолигандное связывание (binding)



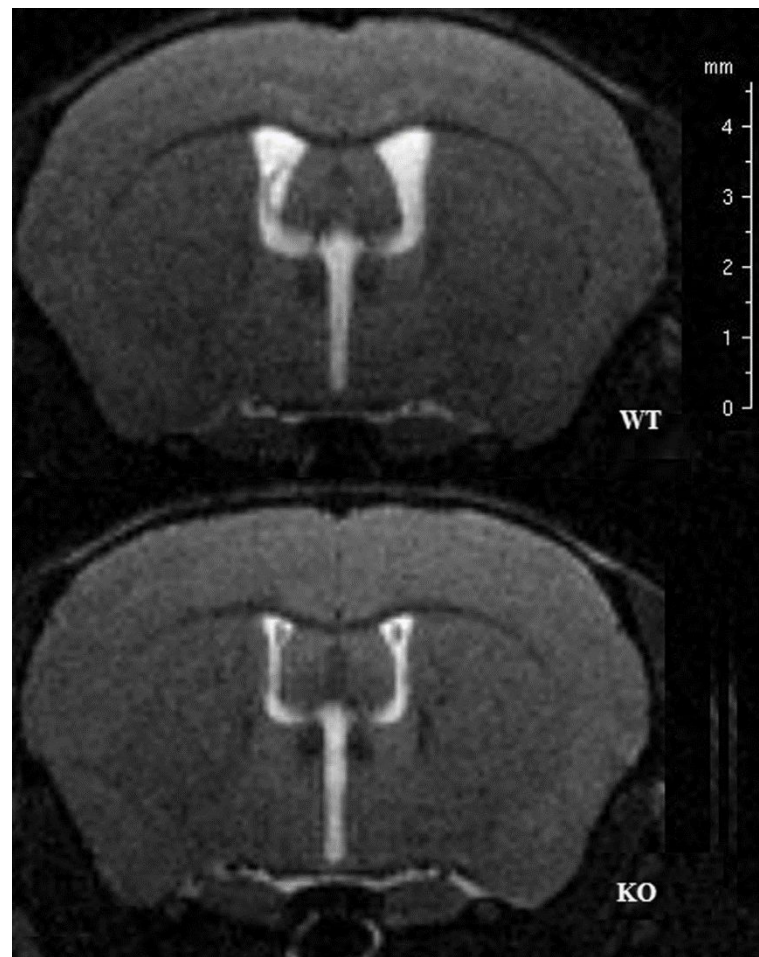
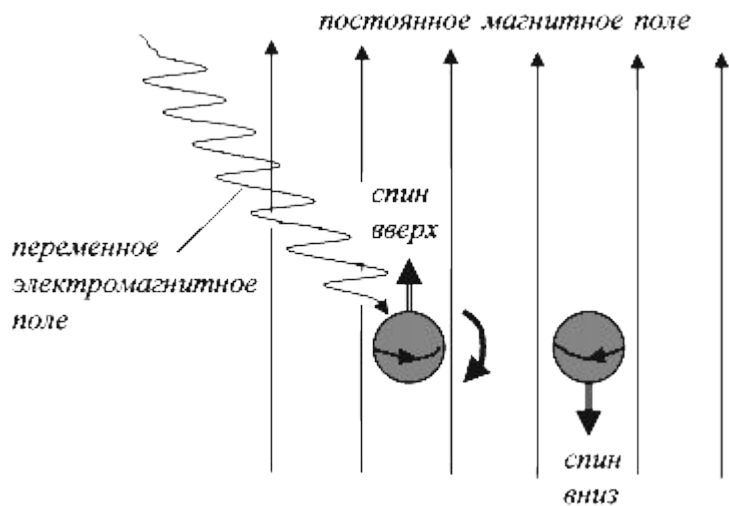
- Равновесное связывание лиганда L с рецептором R подчиняется закону действия масс. Наиболее часто используется следующая модель:
- $R + L \rightleftharpoons RL$
- $K_d \times [RL] = [R_0 - RL] \times [L]$
- $[RL] = [R_0] \times [L] / (K_d + [L])$
- $R_0 = B_{max}$
- $[RL] = B_{max} \times [L] / (K_d + [L])$
- $B_{max}$  - отражает концентрацию, а  $K_d$  - сродство рецептора.
- Неспецифическое связывание ( $K_d > 10^{-6}$  М) определяется при избытке немеченого лиганда – вытеснителя. Насыщения не наступает. Кривая линейно увеличивается с ростом концентрации.

# Позитронная эмиссионная томография

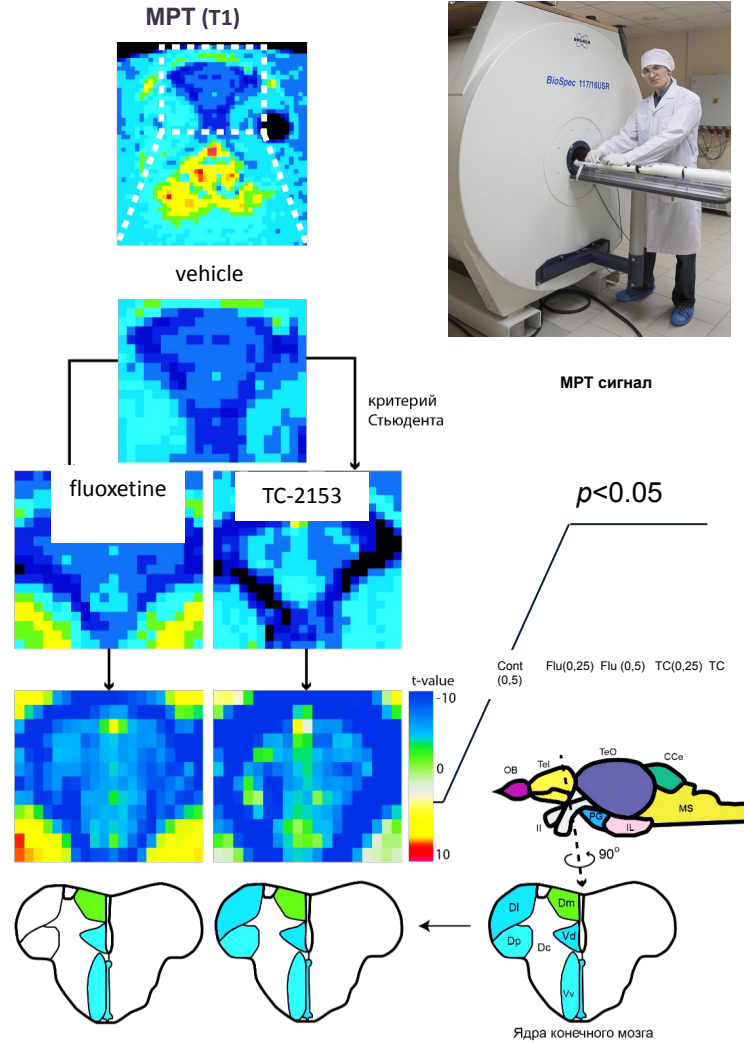
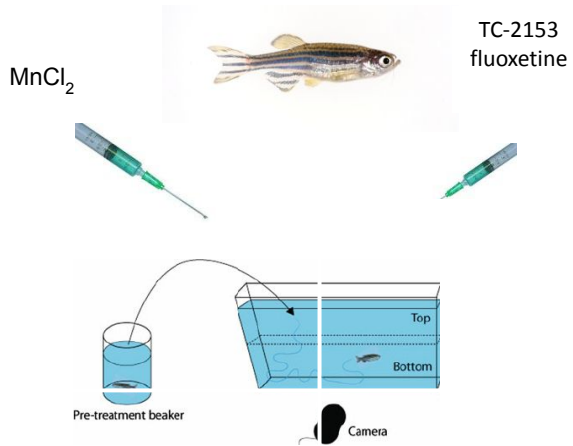
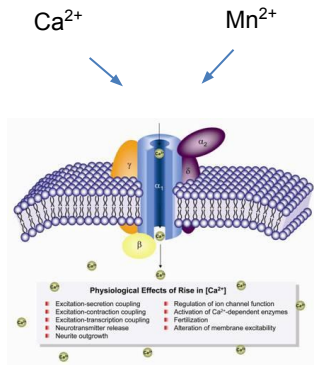


- Позволяет определять плотность рецепторов в мозге живых людей.
- В вену вводят лиганды, помеченные короткоживущими изотопами  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ .
- Лиганды концентрируются на рецепторах и распадаются с испусканием  $e^+$ .
- Позитрон аннигилирует и испускает два фотона в детекторы. Положение точки распада определяют по разнице времени регистрации фотонов разными счетчиками.
- Компьютер восстанавливает картину распределения лиганда.

# Ядерная магнитно-резонансная томография

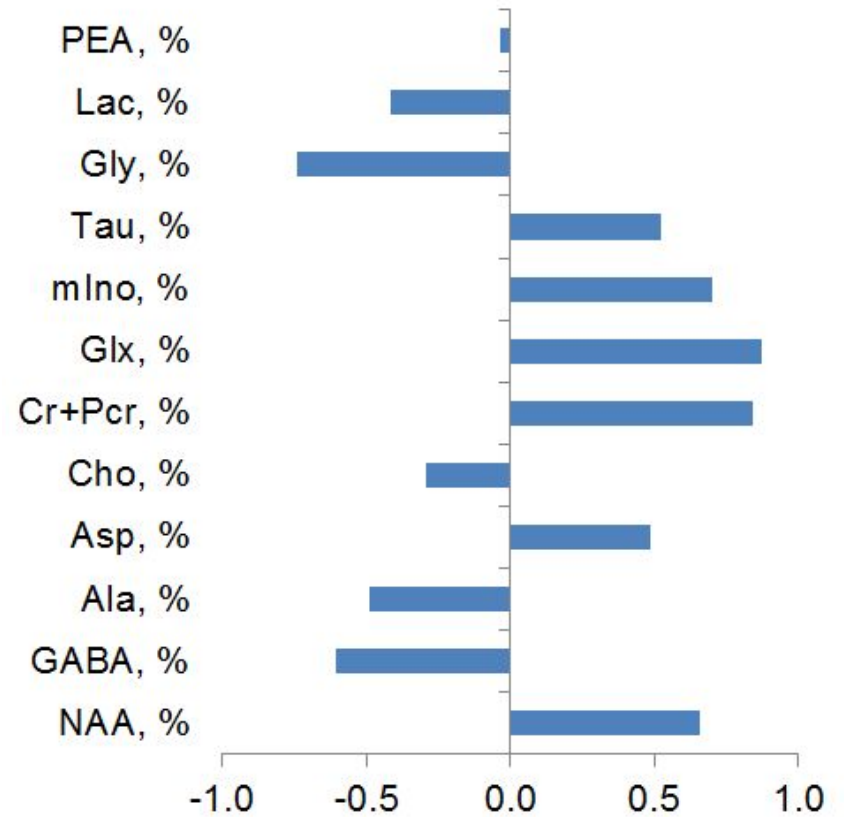
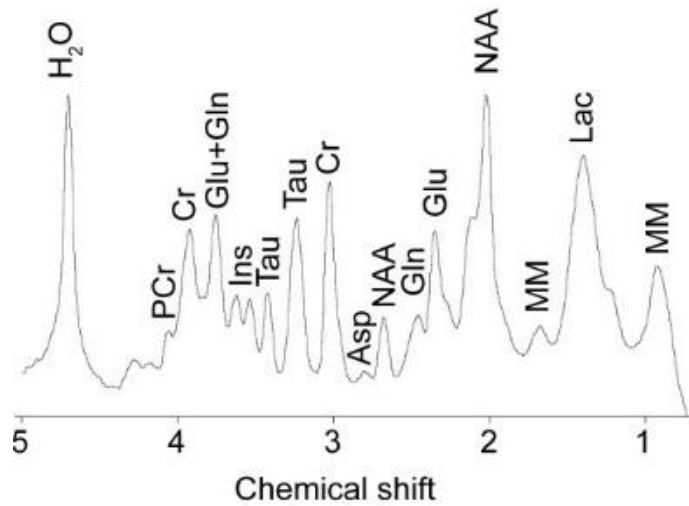


# Усиленная ионами $Mn^{2+}$ МРТ



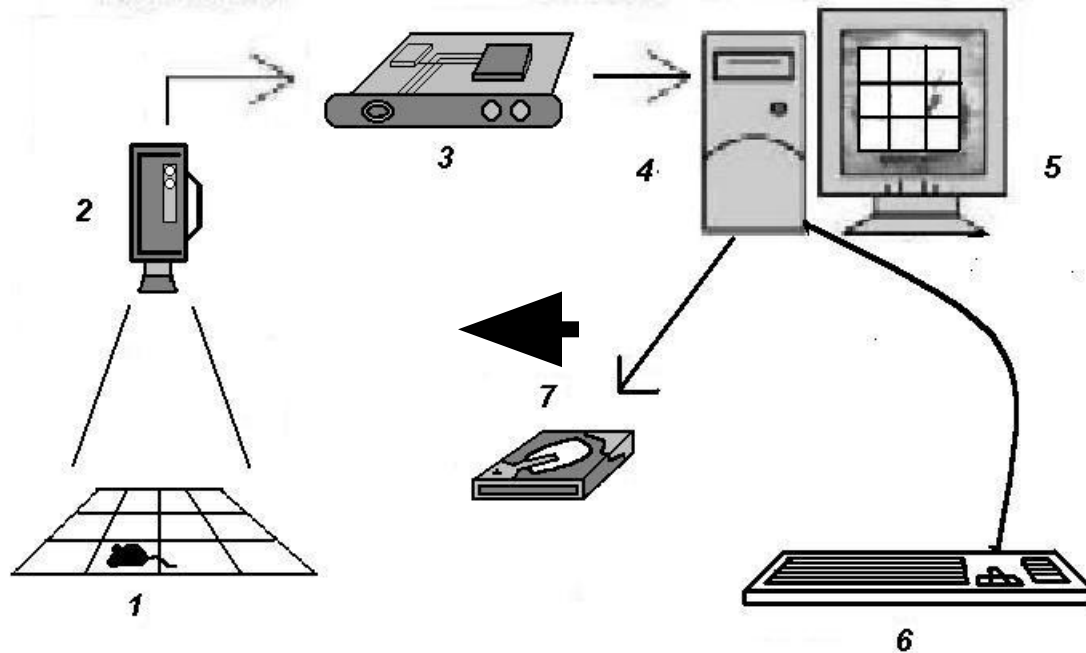
MPT сигнал

# ЯМР спектроскопия





# Регистрация поведения ETHOSTUDIO



- Установка включает арену, видеокамеру, компьютер и клавиатуру.
- Изображение арены захватывается видеокамерой с частотой 10-25 к/с, оцифровывается, передается в память компьютера и сохраняется на диске.
- Проводится покадровый компьютерный анализ положения животного в координатах арены.

# Оцениваемые параметры



- Путь, пройденный геометрическим центром животного.
- Вероятность появления животного в выделенных областях арены.

