НЕЙРОХИМИЯ, 2020, том 37, № 4, с. 338–349

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.21,577.25,575.162

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛАСТИЧНОСТИ СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ, НЕСУЩИХ 1473G-АЛЛЕЛЬ ГЕНА ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ-2 И РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ДИСТАЛЬНЫМ ФРАГМЕНТОМ ХРОМОСОМЫ 13, СОДЕРЖАЩИМ ГЕН, КОДИРУЮЩИЙ 5-HT_{1A} РЕЦЕПТОР

© 2020 г.
А. Я. Родный[1, *], И. И. Белокопытова[1], Е. В. Антонов[1], В. С. Науменко[1], Е. М. Кондаурова [1]

[1]*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук", Новосибирск, Россия*

Поступила в редакцию 26.03.2020 г.
После доработки 09.06.2020 г.
Принята к публикации 11.06.2020 г.

Для исследования влияния дистального фрагмента (103.9–112.4 м.п.н.) хромосомы 13, содержащего ген 5-HT_{1A} рецептора каталептической линии CBA на серотониновую (5-HT) систему мозга у мышей, несущих 1473G-аллель гена ключевого фермента биосинтеза 5-HT в мозге – триптофангидроксилазы-2 (ТПГ-2), были созданы новые рекомбинантные линии мышей B6-1473GG.CBA-CD13Mit76C (1473GG-76C) и B6-1473GG.CBA-D13Mit76B (1473GG-76B) на основе генома линии C57BL/6. Линии 1473GG-76C и 1473GG-76B несут фрагмент хромосомы 13, содержащий ген *Htr1a* от линии CBA и линии C57BL/6 соответственно. Обе линии гомозиготны по 1473G-аллелю, понижающему активность ТПГ-2. В результате исследования обнаружено, что линия 1473GG-76C характеризуется повышением уровней мРНК генов *Htr1a, Htr2a* и гена *Maoa* (моноаминооксидазы типа А – основного фермента разрушения 5-HT) в среднем мозге, гена *Htr1a* в коре, генов *Htr1a* и *Htr2a* в гиппокампе по сравнению с 1473GG-76B. Кроме того, у линии 1473GG-76C повышена экспрессия генов, кодирующих ключевые регуляторы гена *Htr1a* – FREUD-1 и FREUD-2. Уровень мРНК гена *Cc2d1a*, кодирующего FREUD-1, повышен в коре, а экспрессия гена *Cc2d1b*, кодирующего FREUD-2, изменена в среднем мозге. Также у линии 1473GG-76C повышен уровень 5-HT в среднем мозге, гипоталамусе и гиппокампе. В то же время в среднем мозге и коре этих мышей снижен уровень основного метаболита серотонина – 5-ГИУК. Отношение 5-ГИУК/5-HT, отражающее интенсивность метаболизма 5-HT, у линии 1473GG-76C снижено во всех исследованных структурах. Таким образом, у 1473GG-76C мышей, гомозиготных по G-аллелю гена *Tph2* и несущих ген *Htr1a* от линии CBA, обнаружены существенные отличия в уровне мРНК ключевых генов 5-HT системы и метаболизме 5-HT в мозге по сравнению с мышами линии 1473GG-76B, гомозиготных по G-аллелю гена *Tph2* и несущих ген *Htr1a* от линии C57BL/6.

Ключевые слова: полиморфизм C1473G, ген Tph2, ген Htr1a, рекомбинантные мыши, серотонин, триптофангидроксилаза-2, 5-HT_{1A} рецептор

DOI: 10.31857/S102781332004007X

ВВЕДЕНИЕ

Множество фактов убедительно указывает на участие серотонина (5-HT) во многих периферических и центральных физиологических функциях. Такая полифункциональность 5-HT системы основана на большом количестве различных рецепторов, опосредующих действие серотонина. 5-HT нейроны в мозге и других тканях используют только один путь синтеза серотонина, где посредством триптофангидроксилазы-2 (ТПГ-2) из L-триптофана образуется 5-гидрокситриптофан, из которого с помощью триптофандекарбоксилазы получается серотонин. При передаче сигнала 5-HT секретируется в синаптическую щель, где оказывает действие на различные 5-HT рецепторы. Серотониновый транспортер (5-HTT), структура которого является высоко гомологичной у разных видов, в первую очередь ответственен за прекращение действия 5-HT в мозге и многих других тканях посредством обратного захвата высвобожденного серотонина. Метаболическая дегра-

* Адресат для корреспонденции: 630090 Россия, Новосибирск, пр-кт Академика Лаврентьева, 10; тел.: (383)3636187; e-mail: aleksandr1994rodny@gmail.com.

дация серотонина в нейронах происходит, главным образом, с помощью фермента моноаминоксидазы типа А (МАО А) [1].

Одним из основных факторов, определяющих уровень серотонина в мозге, является активность лимитирующего фермента его биосинтеза – ТПГ-2 [2]. На сегодняшний день известно по меньшей мере девять миссенс-мутаций в гене *Tph2* человека (*hTPH2*), и было показано, что некоторые из них изменяют активность, растворимость или стабильность фермента. Имеются доказательства связи между функциональными мутациями в гене *hTPH2* и психическими заболеваниями: S41Y, P206S и биполярное аффективное расстройство, R441H и униполярная депрессия и R303W и СДВГ [3]. В 2004 году в гене *Tph2* мышей был обнаружен однонуклеотидный полиморфизм, который определяется заменой C на G в положении 1473 экзона 11. Полиморфизм C1473G (rs33849125) приводит к замещению пролина аргинином в молекуле ТПГ-2 и играет значительную роль в скорости синтеза серотонина в мозге, приводя к 50% снижению активности ТПГ-2 [4, 5]. Аллель G, связанный с низкой активностью ТПГ-2, был перенесен из линии CC57Br (G/G) в геном линии C57BL/6 (C/C), и были созданы две рекомбинантные линии мышей B6-1473G и B6-1473C с низкой и нормальной активностью ТПГ-2 соответственно [6]. Однако, не было обнаружено изменения экспрессии ключевых генов серотониновой системы в мозге, кроме снижения экспрессии гена *Htr2a* в гиппокампе у линии B6-1473G по сравнению с линией B6-1473C. Также не было найдено изменений в уровне серотонина и его метаболита 5-ГИУК (5-гидроксииндолуксусная кислота) в среднем мозге, где располагаются тела серотониновых нейронов, у B6-1473G по сравнению с линией B6-1473C [6–8].

За последние 30 лет были идентифицированы семь отдельных семейств и клонированы 20 подтипов 5-HT рецепторов [9]. 5-HT_{1A} рецептор является одним из самых изученных рецепторов серотонина. Это связано с несколькими факторами: этот рецептор играет важную роль в нейрональном развитии и пластичности, контроле различных физиологических функций, а также в механизмах депрессии, тревожности и разного рода психических заболеваний [10, 11]. 5-HT_{1A} рецепторы широко представлены в центральной нервной системе, в особенности в миндалевидном комплексе, гиппокампе, перегородке и ядрах шва среднего мозга [12, 13]. 5-HT_{1A} рецепторы в ядрах шва выступают в роли соматодендритных ауторецепторов, ингибируя активность серотониновой системы посредством механизма отрицательной обратной связи [10, 11]. 5-HT_{1A} рецепторы локализованы также и постсинаптически. 5-HT_{1A} рецепторы, локализованные на мембране нейронов пре- и постсинаптически, оказывают различное влияние на активность нейронов мозга [11, 12]. Известно, что изменения в экспрессии гена *Htr1a*, кодирующего 5-HT_{1A} рецептор, могут дифференциально влиять на пре- и постсинаптические 5-HT_{1A} рецепторы и, следовательно, на функциональную активность 5-HT системы мозга. Так в промоторе гена рецептора, были обнаружены регуляторные сайты связывания селективных репрессоров фактора FREUD-1 и его гомолога FREUD-2, которые приводят к подавлению экспрессии гена рецептора в мозге [14–17]. При сверхэкспрессии FREUD-1 обнаружено подавление экспрессии гена 5-HT_{1A} рецептора, а также снижение уровня самого белка 5-HT_{1A} рецептора. мРНК FREUD-1 обнаружена в ядрах шва среднего мозга, гиппокампе, коре и гипоталамусе, и показано, что белок FREUD-1 ко-локализован с 5-HT_{1A} рецептором [15]. Более того, имеется несколько работ, указывающих на участие FREUD-1 в развитии психопатологий [18, 19]. FREUD-2 является гомологом FREUD-1 и связывается со смежным сайтом FREUD-1, подавляя экспрессию гена 5-HT_{1A} рецептора [16, 17]. В отличие от FREUD-1, FREUD-2 слабо экспрессируется в ядрах шва, но при этом была обнаружена его высокая экспрессия в префронтальной коре, где он также ко-локализован с 5-HT_{1A} рецепторами. Наблюдается тенденция к снижению FREUD-2 в префронтальной коре у больных депрессией [16]. Таким образом, транскрипционная регуляция гена *Htr1a* и изменения его экспрессии могут играть значительную роль в механизмах различного рода психических заболеваний [20].

Недавно в лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН были получены рекомбинантные линии B6.CBA-D13Mit76C (B6-M76C) и B6.CBA-D13Mit76B (B6-M76B) на геноме инбредной линии мышей C57BL/6, содержащие фрагмент 102,73-110,56 м.п.н. хромосомы 13 с геном *Htr1a*, полученный из предрасположенной к каталепсии линии CBA и устойчивой к каталепсии линии C57BL/6, соответственно. Мыши этих линий характеризуются различной чувствительностью пре- и постсинаптических 5-HT_{1A} рецепторов к хроническому введению агониста 8-OH-DPAT [21]. При исследовании серотониновой системы мозга этих мышей было показано, что у линии B6-M76C снижен метаболизм 5-HT в гиппокампе и это сопровождается повышенной экспрессией гена *Htr1a* по сравнению с мышами B6-M76B. Кроме того, у мышей B6-M76C, обнаружено снижение общего объема мозга, снижение размера стриатума, мозжечка и гипофиза [21, 22].

В то время как отдельные эффекты полиморфизма C1473G на функционирование 5-HT системы мозга изучены, его совместное с геном *Htr1a* влияние на 5-HT систему остается совершенно неизвестным. Таким образом, целью данной работы является исследование влияния

участка дистального фрагмента хромосомы 13, содержащего ген *Htr1a* каталептической линии CBA на фоне G-аллеля полиморфизма C1473G, определяющим сниженную активность ключевого фермента синтеза 5-HT ТПГ-2, на состояние и пластичность серотониновой системы мозга. Это включает в себя исследование экспрессии генов ключевых элементов синтеза, обратного захвата и деградации серотонина, основных серотониновых рецепторов (*Htr1a* и его селективные сайленсеры *Cc2d1a* и *Cc2d1b*, *Htr2a* и *Htr7*), а так же уровень обмена серотонина и его метаболита 5-ГИУК в мозге.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение линий

Новые рекомбинантные линии B6-1473GG.CBA-D13Mit76C (1473GG-76C) и B6-1473GG.CBA-D13Mit76B (1473GG-76B) были получены переносом фрагментов хромосомы 13, маркированных полиморфными микросателлитными маркерами: D13Mit211 (103.9 м.п.н.), D13Mit76 (110.56 м.п.н.) и D13Mit260 (112.4 м.п.н.) от ранее полученной в лаборатории рекомбинантной линий мышей B6.CBA-D13Mit76C и B6.CBA-D13Mit76B [21] в геном другой рекомбинантной линии B6-1473G [23], соответственно. Генотипирование полиморфизма C1473G гена *Tph2* проводилось в соответствии с опубликованным протоколом [24] с двумя позитивными контрольными праймерами, дающими продукт ПЦР 523 п.н., и с аллельспецифическими праймерами 1473C или 1473G, дающими продукт ПЦР 307 п.н [23]. Для получения линий были взяты самцы линии B6-1473G, которых скрестили с самками B6.CBA-D13Mit76C и B6.CBA-D13Mit76B соответственно. Полученных гибридов F1 от (B6-1473GxB6.CBA-D13Mit76C) (гетерозигот, несущих CBA- и C57BL/6-аллели маркеров D13Mit76, D13Mit211 AKR- и C57BL/6-аллели для маркера D13Mit260 и гетерозигот по полиморфизму C1473G (C/G) скрещивали с друг с другом. Для получения второй линии B6-1473GG.CBA-D13Mit76B полученных гибридов F1 от (B6-1473GxB6.CBA-D13Mit76B) (гомозигот по аллелям C57BL/6 маркеров D13Mit211, D13Mit76, D13Mit260 и гетерозигот по полиморфизму C1473G (C/G) скрещивали с друг с другом. Далее для получения линии B6-1473GG.CBA-D13Mit76C отбирали гомозигот G/G и гомозигот несущих CBA аллели по маркерам D13Mit211, D13Mit76, и AKR аллели для D13Mit260. Для линии B6-1473GG.CBA-D13Mit76B отбирали и гомозигот несущих C57BL/6 -аллели по маркерам D13Mit211, D13Mit76, D13Mit260, и гомозигот G/G. Линия B6-1473GG.CBA-D13Mit76C гомозиготна по CBA-аллелям D13Mit76 и D13Mit211 и по AKR-аллелям D13Mit260 и также гомозиготна по G/G полиморфизму гена *Tph2*. Линия B6-1473GG.CBA-D13Mit76B гомозиготна по C57BL/6 – аллелям D13Mit76 и D13Mit211 и D13Mit260 и также гомозиготна по G/G полиморфизму гена *Tph2*. Генотип животного определяли по образцам ДНК, полученной из ткани кончика хвоста, с помощью ПЦР со специфичными для маркеров D13Mit76, D13Mit211, D13Mit260 и C/G праймерами (табл. 1) [22, 23, 25]. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле и визуализировали с использованием окрашивания бромидом этидия.

Исследование уровня мРНК генов и уровень моноаминов в мозге животных изучали на самцах линии B6-1473GG.CBA-D13Mit76C и B6-1473GG.CBA-D13Mit76B. Мыши после отсадки от матерей в возрасте 1 мес. содержались в группах одного пола по 10 особей в клетках размером 40 × 25 × 12 см в стандартных условиях (20–22°C, свободный доступ к еде и воде, 12-ч цикл свет/темнота). В опытах использовали животных в возрасте 2–3 мес., массой 25 ± 5 г. За 2 дня до выведения из эксперимента животных рассаживали в индивидуальные клетки того же размера, чтобы исключить влияние группового эффекта. После чего мышей декапитировали, на льду выделяли кору, гиппокамп, гипоталамус и область ядер шва среднего мозга, замораживали структуры мозга в жидком азоте и хранили при –80°C до процедуры выделения общей РНК и моноаминов. Все структуры мозга от двух линий выделяли в один день, в первой половине дня (10:00–12:00 ч).

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Экстракция. Структуры головного мозга мышей гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Эльвейма на ледяной бане в 200 мкл 0.6 М хлорной кислоты, содержащей изопреналин (внутренний стандарт) в концентрации 200 нг/мл. Для осаждения белка гомогенат центрифугировали при 12000 *g* в течение 15 мин при 4°C. Осадок хранили при –20°C для дальнейшего количественного определения белка согласно протоколу Брэдфорда. Супернатант разводили ультрачистой водой в 2 раза и фильтровали на мембране с диаметром пор 22 мкм. Полученный экстракт использовали для хроматографического анализа.

Хроматографический анализ. Измерения проводили с помощью модульной системы хроматографического анализа (Shimadzu Corporation, США), оснащенной градиентным насосом на четыре растворителя (LC-20AD) с вакуумным дегазатором (DGU-20A5R) и блоком для автоматизированного ввода пробы с петлей объемом 100 мкл (SIL-20A).

Элюирование проводили в изократическом режиме в течение 15 мин. Элюент состоял из 90% 50 мМ фосфатного буферного раствора при pH

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж}$, °C	Длина продукта ПЦР, п.н.
Htr1a	F 5'-ctgtgacctgtttatcgccctg-3' R 5'-gtagtctatagggtcggtgattgc-3'	62	200
Htr2a	F 5'-agaagccaccttgtgtgtga-3' R 5'-ttgctcattgctgatggact-3'	61	169
Htr7	F5'-ggctacacgatctactccaccg-3' R5'-cgcacactcttccacctccttc-3'	65	198
Tph2	F 5'-cattcctcgcacaattccagtcg-3' R 5'-cttgacatattcaactagacgctc-3'	61	239
Slc6a4	F 5'-cgctctactacctcatctcctcc-3' R 5'-gtcctgggcgaagtagttgg-3’	63	101
Maoa	F 5'-aatgaggatgttaaatgggtagatgttggt-3' R 5'-cttgacatattcaactagacgctc-3'	61	138
Cc2d1a	F 5'-gcaaagccgggcaacatcatc-3' R 5'-tagcagaggtgggtgtagtgg-3'	60	181
Cc2d1b	F 5'-acacgcaccaaagacctgataac-3' R 5'-gtatccttgtcttcgcccacag-3'	64	114
rPol2	F 5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R 5'-ctctcttagtgaatttgcgtact-3'	60	194
D13Mit76	F 5'-atgcacctgtctaaatgtgtgc-3' R 5'-agagggactgtgggactgtg-3'	59	109
D13Mit211	F 5'-tttgcaaaagacaagacttattgc-3' R 5'-aaaagacatccagttctcaatgg-3'	59	114
D13Mit260	F 5'-taaatttggatgcagacaatgg-3' R 5'-ttaaaaatagaaatggctctgtgtg-3'	59	115

3.9 и 10% метанола в присутствии 0.3% натрий 1-октансульфоната. Скорость подачи элюента составляла 1 мл/мин. Разделение веществ происходило на аналитической колонке (Luna, Penomenex, США) C18 (длина × внутренний диаметр 100 × 4.6 мм) с размером частиц сорбента 5 мкм. Колонка была защищена предколонкой C8 (длина × × внутренний диаметр 12.5 × 4.6 мм, 5 мкм). Колонка была термостатирована при 40°C.

Биогенные амины детектировали на электрохимическом детекторе DECADE II (стеклоуглеродная проточная ячейка VT-03 длиной 3 мм) (Antec, Нидерланды) при установленном потенциале +0.7 В относительно потенциала хлорсеребряного электрода сравнения. Сигнал детектора снимался интегратором CBM-20A (Shimadzu Corporation, США) и обрабатывался в программе Labsolutions (Shimadzu). Предел количественного определения – 20 пг в пробе при отношении сигнал–шум 5 : 1.

ОТ-ПЦР в реальном времени

Экспрессию генов определяли с помощью количественного метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), разработанного в нашей лаборатории [26–28]. Использовали два типа стандартов: внешний и внутренний. Внутренний стандарт (мРНК *rPol2*) применяли для контроля обратной транскрипции в качестве основы для расчета уровня мРНК исследуемых генов. В предварительных опытах не были выявлены различия в уровне мРНК *rPol2* в исследуемых структурах мозга. Внешним стандартом служила ДНК мыши известной концентрации, что позволило контролировать ПЦР и определять число копий мРНК исследуемых генов *rPol2* в образцах.

Выделение общей РНК

Общая РНК была выделена с помощью TRIzol-Reagent (“Lifetechnologies”, США) в соответствии с инструкцией производителя с последующей обра-

боткой ферментом ДНКазой по протоколу производителя (Promega inc., США). РНК была разведена водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранилась при –70°С. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [27, 28].

Реакция обратной транскрипции

Общая РНК (8 мкл, или 1 мкг) была смешана со 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2.25 мкМ стерильного KCl в объеме 16 мкл, денатурирована при 94°С в течение 5 мин на амплификаторе "БИС" М-120 (БИС-Н, Россия), после чего был проведен отжиг при 41°С в течение 15 мин, затем было добавлено 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу M-MLV (200 ед.), Tris-HCl (pH 8.3, 0.225 мкмоль), смесь dNTP (0.015 мкмоль каждого), DTT (0.225 мкмоль) и $MnCl_2$ (0.03 мкмоль). Полученная смесь (конечным объемом 31 мкл) была инкубирована при 41°С в течение 60 мин. Синтезированная кДНК хранилась при температуре –20°С.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR)

Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл. 1), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании "Биосан" (Новосибирск, Россия). 1 мкл кДНК смешивали с 2.5 мкл ПЦР буфера (содержит интеркалирующий краситель SYBR green I и референсный краситель ROX), 2.5 мкл 2.5 мМ dNTP, 2.5 мкл 25 мМ $MgCl_2$, 2.5 мкл смеси праймеров (прямого и обратного), 0.2 мкл Taq ДНК-полимеразы и стерильной воды до конечного объема 20 мкл. При приготовлении реакционной смеси были использованы наборы реагентов "Синтол" (Москва, Россия). ПЦР была проведена на амплификаторе LightCycler 480 System (Roche, Swizerland) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 94°С, 1 цикл; 10 с при 94°С, 30 с при соответствующей температуре отжига (табл. 1), 30 с при 72°С, 40 циклов. Серия разведений геномной ДНК с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл амплифицировалась одновременно в отдельных пробирках и использовалась как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) – lgP (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 System. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *rPol2*, выполняющей функцию внутреннего стандарта.

Статистический анализ

Результаты были представлены как $m \pm$ SEM и сравнены при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA в программе *STATISTICA*. Статистическая значимость была на уровне $p < 0.05$. Нормальности дисперсий проверялись с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка, для всех дисперсий статистическая значимость по обоим критериям была $p > 0.05$, что свидетельствует о нормальности всех распределений. Критерий Диксона использовался для выявления и исключения крайних отклонений из анализа, для относительных значений, крайние параметры убирались из дисперсий обоих сопоставляемых абсолютных величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Однофакторный дисперсионный анализ выявил эффект генотипа между 1473GG-76C и 1473GG-76B на уровень экспрессии гена *Htr1a*, кодирующего ключевой рецептор серотонина 5-HT_{1A}. Мы нашли его достоверное повышение (рис. 1) у 1473GG-76C в среднем мозге ($F_{1,18} = 8.35$, $p < 0.001$), префронтальной коре ($F_{1,17} = 12.54$, $p < 0.01$) и гиппокампе ($F_{1,19} = 5.55$, $p < 0.05$). В гипоталамусе достоверных различий обнаружено не было ($F_{1,19} < 1$). Для транскрипционных факторов гена *Htr1a* были получены следующие различия (рис. 2): достоверное повышение уровня экспрессии мРНК гена *Cc2d1a* в гиппокампе ($F_{1,19} = 7.83$, $p < 0.05$) и мРНК гена *Cc2d1b* в среднем мозге ($F_{1,19} = 5.75$, $p < 0.05$) у мышей линии 1473GG-76C по сравнению с мышами линии 1473GG-76B.

Для уровня мРНК гена *Htr2a,* кодирующего рецептор 5-HT_{2A} был обнаружен эффект генотипа (рис. 3). Экспрессия этого гена была повышена у мышей 1473GG-76C в среднем мозге ($F_{1,18} = 4.81$, $p < 0.05$) и гиппокампе ($F_{1,18} = 4.81$, $p < 0.05$), но не для префронтальной коры ($F_{1,18} < 1$) и гипоталамусе ($F_{1,15} < 1$).

Не было обнаружено эффекта генотипа между 1473GG-76C и 1473GG-76B на уровень мРНК гена *Htr7*, кодирующего рецептор серотонина 7 типа во всех исследованных структурах (рис. 4): средний мозг ($F_{1,17} = 1.60$, $p > 0.05$), префронтальная кора ($F_{1,19} = 3.55$, $p > 0.05$), гиппокамп ($F_{1,17} < 1$) и гипоталамус ($F_{1,17} < 1$).

Для ключевых элементов серотониновой системы (рис. 5) в среднем мозге был найден эффект генотипа только на экспрессию гена *Maoa,* кодирующего фермент деградации серотонина МАО А ($F_{1,18} = 6.96$, $p < 0.05$), которая оказалась

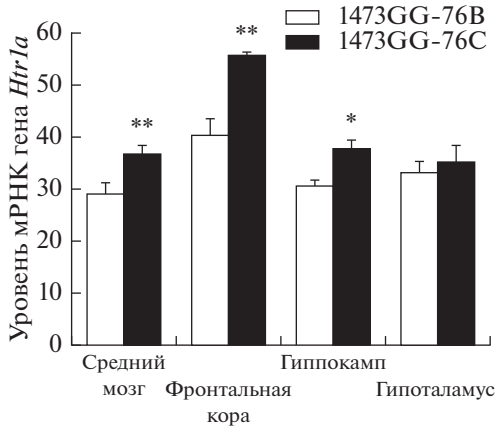

Рис. 1. Уровень мРНК гена *Htr1a* в структурах мозга мышей 1473GG-76C и 1473GG-76B. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *rPol2*. * $p < 0.05$, ** $p << 0.01$ по сравнению с 1473GG-76B. В каждой группе число образцов $n \geq 10$.

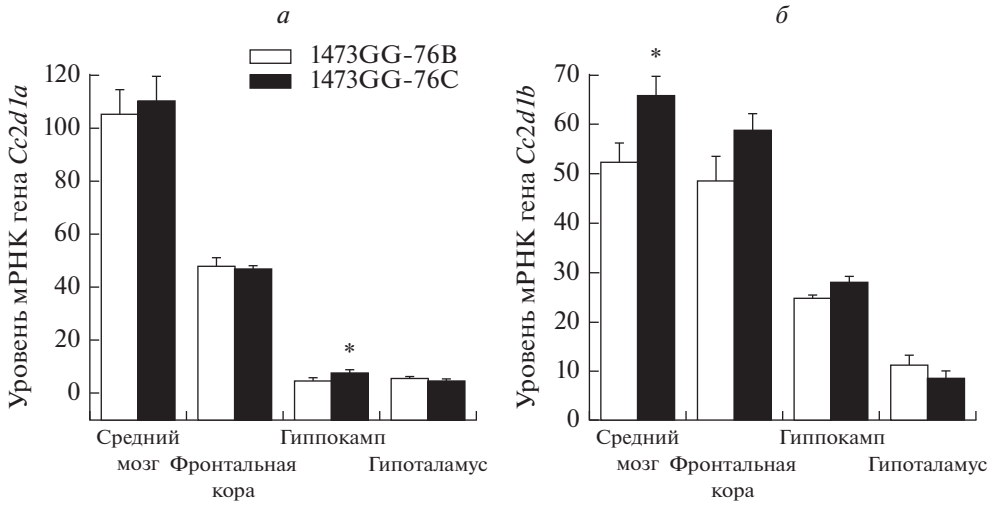

Рис. 2. Уровни мРНК генов *а* – *Cc2d1a* и *б* – *Cc2d1b* в структурах мозга мышей 1473GG-76C и 1473GG-76B. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *rPol2*. * $p < 0.05$ по сравнению с 1473GG-76B. В каждой группе число образцов $n \geq 10$.

выше у линии 1473GG-76C, в то время как уровни экспрессии генов *Slc6a4* и *Tph2*, кодирующих серотониновый транспортер и ключевой фермент синтеза серотонина, соответственно, не изменились ($F_{1,19} < 1$).

Хроматографический анализ (рис. 6) (ВЭЖХ) выявил достоверное повышение уровня серотонина в среднем мозге ($F_{1,19} = 5.21$, $p < 0.05$), гиппокампе ($F_{1,20} = 6.08$, $p < 0.05$) и гипоталамусе ($F_{1,20} = 16.60$, $p < 0.001$), но не в префронтальной коре ($F_{1,15} < 1$) у мышей линии 1473GG-76C. Уровень основного метаболита серотонина 5-ГИУК (5-гидроксииндолуксусной кислоты) в среднем мозге и префронтальной коре был достоверно снижен ($F_{1,19} = 6.51$, $p < 0.05$ и $F_{1,15} = 7.48$, $p < 0.05$ соответственно) у мышей линии 1473GG-76C. В гиппокампе и гипоталамусе уровень 5-ГИУК у этих мышей не изменился ($F_{1,20} = 3.34$, $p > 0.05$ и $F_{1,20} = 2.42$, $p > 0.05$ соответственно). Кроме того, у мышей линии 1473GG-76C было найдено достоверное снижение коэффициента метаболизма серотонина в среднем мозге ($F_{1,19} = 22.26$, $p < 0.001$), префронтальной коре ($F_{1,15} = 8.67$, $p < 0.05$), гиппокампе ($F_{1,20} = 15.07$, $p < 0.001$) и гипоталамусе ($F_{1,20} = 6.37$, $p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование рекомбинантных линий, различающихся только небольшим фрагментом генома, является эффективным подходом изучения пластичности и функции нейротрансмитерных

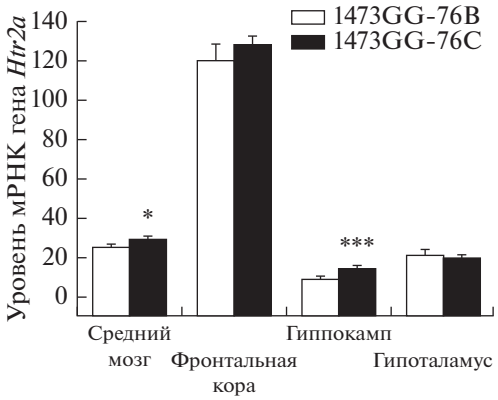

Рис. 3. Уровень мРНК гена *Htr2a* в структурах мозга мышей 1473GG-76C и 1473GG-76B. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *rPol2*. * $p < 0.05$, *** $p < < 0.001$ по сравнению с 1473GG-76B. В каждой группе число образцов $n \geq 10$.

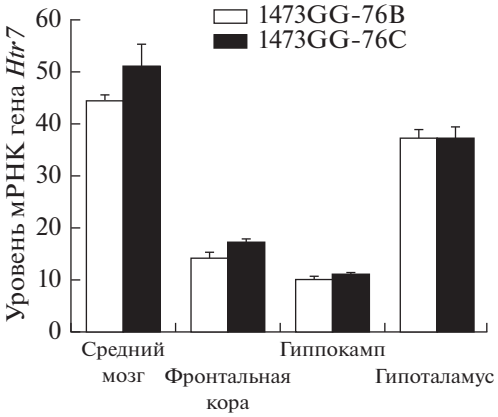

Рис. 4. Уровень мРНК гена *Htr7* в структурах мозга мышей 1473GG-76C и 1473GG-76B. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *rPol2*. В каждой группе число образцов $n \geq 10$.

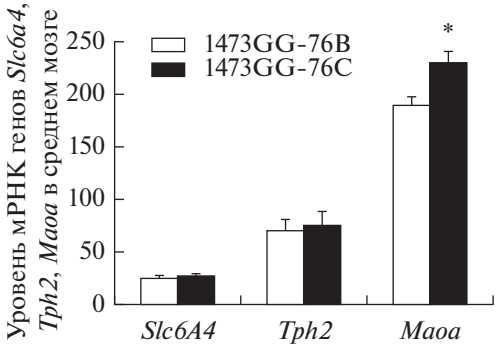

Рис. 5. Уровни мРНК генов *Slc6a4*, *Tph2* и *Maoa* в среднем мозге мышей 1473GG-76C и 1473GG-76B. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *rPol2*. * $p < 0.05$ по сравнению с 1473GG-76B. В каждой группе число образцов $n \geq 10$.

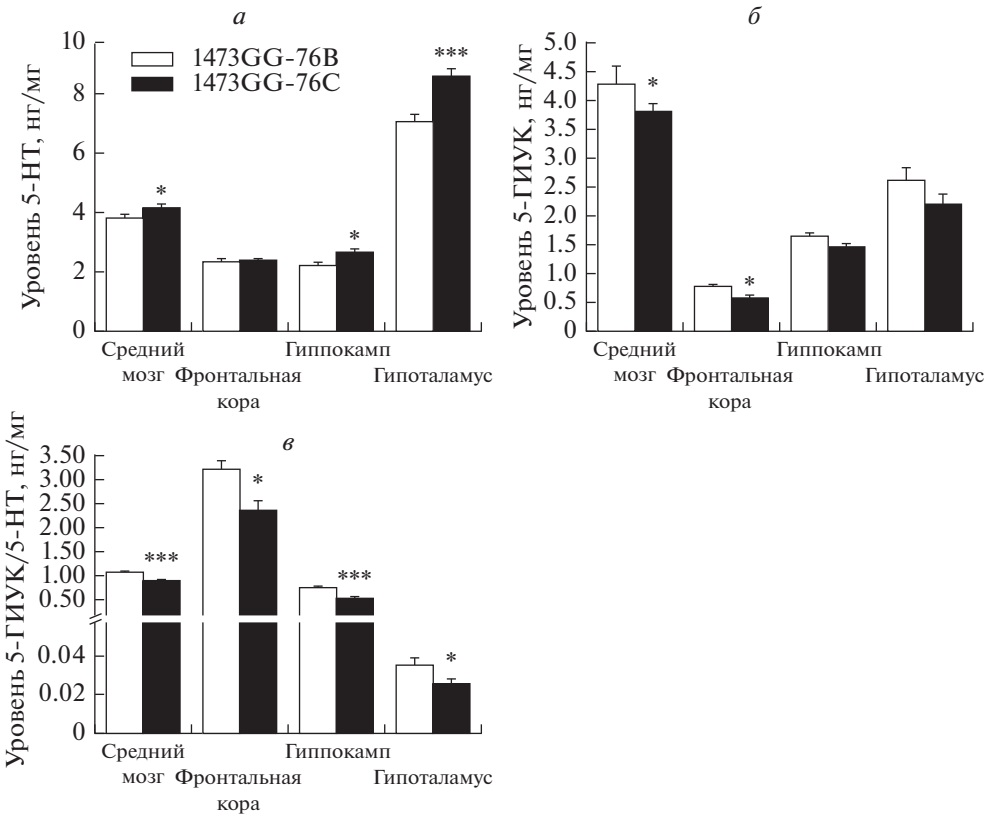

Рис. 6. Уровни *а* – 5-HT, *б* – 5-ГИУК и *в* – соотношение 5-ГИУК/5-HT в структурах мозга мышей 1473GG-76C и 1473GG-76B. Уровень 5-HT и 5-ГИУК представлен в нг/мг. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с 1473GG-76B. В каждой группе число образцов $n \geq 10$.

систем, регулирующих множество физиологических функций, включая поведение [29]. В данной работе исследования проводились на рекомбинантных мышах линий B6-1473GG.CBA-D13Mit76C и B6-1473GG.CBA-D13Mit76B, отличающихся от мышей реципиентной линии C57BL/6-G/G генотипом полиморфизма C1473G гена *Tph2* и дистальным фрагментом (103,9-112,4 м.п.н.) хромосомы 13, содержащим ген *Htr1a* каталептической линии CBA (B6-1473GG.CBA-D13Mit76C) и линии C57BL/6 (B6-1473GG.CBA-D13Mit76B) соответственно. В результате исследования у линии 1473GG-76C по сравнению с линией 1473GG-76B было обнаружено повышение экспрессии гена 5-HT_{1A} рецептора – ключевого регулятора функциональной активности 5-HT системы мозга [11], в коре и среднем мозге, где расположены тела серотониновых нейронов, а также гиппокампе, структуре, где наблюдается наивысший уровень мРНК и наибольшая плотность 5-HT_{1A} рецепторов [13]. Известно, что изменения в экспрессии гена *Htr1a* могут дифференциально влиять на пре- и постсинаптические 5-HT_{1A} рецепторы и, следовательно, на функциональную активность 5-HT системы мозга [11]. Принимая во внимание данные о роли 5-HT_{1A} рецептора в контроле функции 5-HT системы мозга [11], транскрипционные факторы гена *Htr1a* можно рассматривать в качестве потенциальных регуляторов функциональной активности 5-HT системы мозга. Интересно отметить, что наличие дистального фрагмента (103.9–112.4 м.п.н.) хромосомы 13, содержащего ген *Htr1a* каталептической линии на фоне 1473G-аллеля гена *Tph2*, привело к повышению уровня мРНК транскрипционных регуляторов экспрессии 5-HT_{1A} рецептора – гена *Cc2d1a* в гиппокампе и гена *Cc2d1b* в среднем мозге по сравнению с мышами линии 1473GG-76B. Возможно, повышение экспрессии сайленсеров 5-HT_{1A} рецептора является компенсаторным ответом на повышение экспрессии самого гена *Htr1a* в новом генетическом окружении. Изменения экспрессии регуляторов гена *Htr1a* может приводить к развитию различных психических заболе-

ваний [20], поскольку это вовлекает множество изменений не только на уровне транскрипции самого гена *Htr1a,* но и на уровне обмена серотонина в мозге.

При исследовании экспрессии *Htr7* гена, не было обнаружено разницы между линиями мышей, хотя данный тип рецепторов играет важную роль не только в функционировании самой серотониновой системы, но и в регуляции 5-HT_{1A} рецептора [10]. Полученные данные указывают на то, что на уровне экспрессии рецепторы регулируются независимо друг от друга.

5-HT_{2A} рецепторы привлекают особое внимание из-за их тесной связи с 5-HT_{1A} рецепторами в механизме наследственности каталепсии. Так известно, что введение агонистов 5-HT_{2A} и 5-HT_{1A} рецепторов уменьшает у мышей и крыс выраженность каталептического замирания, вызванного введением нейролептиков [30–32]. Хроническая и острая активация 5-HT_{2A} рецепторов вызывает у крыс и мышей значительное падение функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов [33–37]. Кроме того, было показано функциональное взаимодействие между 5-HT_{2A} и 5-HT_{1A} рецепторами в механизме подавления каталепсии у мышей. Активация 5-HT_{2A} рецептора вызывает активацию пресинаптических и ингибирование постсинаптических 5-HT_{1A} рецепторов [38]. Также показано непосредственное белок-белковое взаимодействие 5-HT_{2A} и 5-HT_{1A} рецепторов [39]. Наличие дистального фрагмента (103.9–112.4 м.п.н.) хромосомы 13, содержащего ген *Htr1a* каталептической линии на фоне генотипа G/G гена *Tph2* приводит к повышению мРНК гена *Htr2a*, кодирующего 5-HT_{2A} рецептор в среднем мозге и гиппокампе у мышей линии 1473GG-76C по сравнению с линией 1473GG-76B также несущих генотип G/G гена *Tph2*, но ген *Htr1a* от линии C57BL/6. Известно, что дистальный фрагмент (103.9–112.4 м.п.н.) хромосомы 13 определяет около 20% проявления каталепсии у мышей [40–42] и каталептические линии характеризуются, с одной стороны, повышенной функциональной активностью 5-HT_{1A} рецептора и отсутствием изменений экспрессии гена *Htr1a* в мозге, и, с другой стороны, сниженной функциональной активность 5-HT_{2A} рецептора, которая сопровождается снижением экспрессии гена *Htr2a* в коре [38, 43]. В нашем случае, возможно, повышение экспрессии мРНК гена *Htr2a* у линии 1473GG-76C связано с повышением экспрессии в этих же структурах мозга гена *Htr1a*, полученного от каталептической линии CBA, и наличием одновременно G-аллеля гена *Tph2.* У рекомбинантной линии B6-1473G с участком хромосомы 13 от C57BL/6, показано снижение экспрессии гена *Htr2a* в гиппокампе по сравнению с линией B6-1473C имеющей нормальный аллель гена триптофангидроксилазы и участок хромосомы 13 от линии C57BL/6 [8].

Метаболизм серотонина в мозге у линии 1473GG-76C снижается и это вызывается именно содержанием CBA-аллеля гена *Htr1a* на фоне гомозиготности по 1473G-аллелю гена *Tph2*, так как у линии 1473GG-76B также снижена активность ТПГ-2. У контрольных мышей линий гомозиготных по 1473C- и 1473G-аллелям гена *Tph2* не было найдено отличий по уровню серотонина, его основного метаболита и индекса метаболизма (отношение 5-ГИУК/5-HT) в работе с хроническим потреблением флуоксетина [6]. В другой работе при воздействии острого стресса было обнаружено снижение уровня серотонина в коре и гиппокампе, что, однако, не привело к изменению индекса обмена серотонина в этих структурах у B6-1473G мышей контрольной группы [7]. Кроме того, исследование влияния укороченного дня на моноамины мозга этих мышей показало, что контрольные мыши, содержащиеся при нормальном световом периоде, но тестированные в течение 2 дней в поведенческих тестах, характеризуются сниженным уровнем 5-ГИУК и обменом серотонина в гиппокампе [8]. Все выше перечисленное позволяет предположить, что уровни моноаминов и их метаболитов в коре и гиппокампе у данных мышей очень чувствительны к различным воздействиям. В нашем случае уменьшение метаболизма серотонина во всех исследованных структурах мозга может являться либо компенсаторной реакцией, либо нейрохимическим дисбалансом вызванным сочетанием мутаций из разных геномов на геноме линии C56BL/6. Это хорошо согласуется с имеющимися данными, полученными при исследовании 5-HT системы мозга у мышей линии B6-M76C, у которой перенос фрагмента хромосомы 13 привел к снижению 5-HT метаболизма в гиппокампе и повышению экспрессии гена *Htr1a* по сравнению с мышами B6-M76B. Однако у B6-M76C не было обнаружено изменений в экспрессии гена *Htr1a* в других структурах мозга. Также не было найдено отличий в уровне мРНК гена *Htr2a* [21, 22]. В связи с вышесказанным, обнаруженные нами в данной работе изменения в экспрессии генов рецепторов связаны именно с наличием дистального фрагмента (103.9–112.4 м.п.н.) хромосомы 13, содержащего ген 5-HT_{1A} рецептора каталептической линии CBA, на фоне 1473G-аллеля гена *Tph2.*

При исследовании уровней мРНК ключевых генов серотониновой системы – *Tph2*, *Maoa* и *Slc6a4*, в среднем мозге было обнаружено повы-

шение экспрессии только гена *Maoa* у мышей линии 1473GG-76C по сравнению с мышами линии 1473GG-76B. Это может являться ответом на повышенный уровень серотонина у этих мышей в среднем мозге и других структурах. С другой стороны, поскольку уровень 5-ГИУК во всех структурах снижен, повышение экспрессии *Maoa* может являться механизмом положительной обратной связи в ответ на снижение метаболита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, присутствие дистального фрагмента (103.9–112.4 м.п.н.) хромосомы 13, содержащего ген *Htr1a* каталептической линии CBA на фоне G/G генотипа C1473G-полиморфизма гена *Tph2* с приводит к повышению экспрессии генов *Htr1a* и *Htr2a* рецепторов в среднем мозге и гиппокампе, не оказывая существенного влияния на экспрессию гена *Htr7*. Также мыши линии 1473GG-76C характеризуются повышенным уровнем мРНК транскрипционных регуляторов экспрессии гена 5-HT_{1A} рецептора – гена *Cc2d1a* в гиппокампе и гена *Cc2d1b* в среднем мозге. Данные изменения экспрессии сопровождаются уменьшением обмена серотонина в мозге у мышей линии 1473GG-76C по сравнению с мышами 1473GG-76B.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00027). Содержание животных осуществлялось за счет средств бюджетного проекта № 0259-2019-0002-C-01.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Содержание экспериментальных животных и все процедуры выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eight Edition, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council © 2011 National Academy of Sciences (США). Также работа с животными регламентировалась следующими документами: “Правила надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.; межгосударственными стандартами ГОСТ 33215-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными” (Правила оборудования помещений и организации процедур, дата введения 2015-07-01). Условия содержания животных и проведенные экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Murphy D.L., Andrews A.M., Wichems C.H., Li Q., Tohda M., Greenberg B.* // The Journal of Clinical Psychiatry. 1998. V. 59 Suppl 15. P. 4–12.
2. *Fitzpatrick P.F.* // Annual Review of Biochemistry. 1999. V. 68. P. 355–381.
3. *Osipova D.V., Kulikov A.V., Mekada K., Yoshiki A., Moshkin M.P., Kotenkova E.V., Popova N.K.* // Genes, Brain, and Behavior. 2010. V. 9. № 5. P. 537–543.
4. *Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Popova N.K.* // Genes, Brain, and Behavior. 2005. V. 4. № 8. P. 482–485.
5. *Куликов А.В., Осипова Д.В., Науменко В.С., Попова Н.К.* // Доклады Академии наук. 2005. V. 402. № 4. P. 571–573.
6. *Bazhenova E.Y., Sinyakova N.A., Kulikova E.A., Kazarinova I.A., Bazovkina D.V., Gainetdinov R.R., Kulikov A.V.* // Neurosci. Lett. 2017. V. 653. P. 264–268.
7. *Bazhenova E.Y., Bazovkina D.V., Kulikova E.A., Fursenko D.V., Khotskin N.V., Lichman D.V., Kulikov A.V.* // Neurosci. Lett. 2017. V. 640. P. 105–110.
8. *Bazhenova E.Y., Fursenko D.V., Kulikova E.A., Khotskin N.V., Sinyakova N.A., Kulikov A.A.* // Neurosci. Lett. 2019. V.699. P. 91–96.
9. *Pytliak M., Vargova V., Mechirova V., Felsoci M.* // Physiological Research. 2011. V. 60. № 1. P. 15–25.
10. *Naumenko V.S., Popova N.K., Lacivita E., Leopoldo M., Ponimaskin E.G.* // CNS Neurosci. Ther. 2014. V. 20. № 7. P. 582–590.
11. *Popova N.K., Naumenko V.S.* // Reviews in the Neurosciences. 2013. V. 24. № 2. P. 191–204.
12. *Barnes N.M., Sharp T.* // Neuropharmacology. 1999. V. 38. № 8. P. 1083–1152.
13. *Zifa E., Fillion G.* // Pharmacological Reviews. 1992. V. 44. № 3. P. 401–458.
14. *Ou X.M., Jafar-Nejad H., Storring J.M., Meng J.H., Lemonde S., Albert P.R.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 11. P. 8161–8168.
15. *Ou X.M., Lemonde S., Jafar-Nejad H., Bown C.D., Goto A., Rogaeva A., Albert P.R.* // The J. Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience. 2003. V. 23. № 19. P. 7415–7425.
16. *Hadjighassem M.R., Austin M.C., Szewczyk B., Daigle M., Stockmeier C.A., Albert P.R.* // Biol Psychiatry. 2009. V. 66. № 3. P. 214–222.
17. *Hadjighassem M.R., Galaraga K., Albert P.R.* // Eur. J. Neurosci. 2011. V. 33. № 2. P. 214–223.
18. *Rogaeva A., Albert P.R.* // Eur. J. Neurosci. 2007. V. 26. № 4. P. 965–974.
19. *Rogaeva A., Galaraga K., Albert P.R.* // J. Neurosci. Res. 2007. V. 85. № 13. P. 2833–2838.

20. *Albert P.R., Le Francois B., Millar A.M.* // Molecular Brain. 2011. V. 4. P. 21.

21. *Kulikova E.A., Bazovkina D.V., Akulov A.E., Tsybko A.S., Fursenko D.V., Kulikov A.V., Naumenko V.S., Ponimaskin E., Kondaurova E.M.* // British J. Pharmacology. 2016. V. 173. № 13. P. 2147–2161.

22. *Kulikova E.A., Bazovkina D.V., Antonov Y.V., Akulov A.E., Kulikov A.V., Kondaurova E.M.* // Neurosci. Res. 2017. V. 117. P. 14–21.

23. *Osipova D.V., Kulikov A.V., Popova N.K.* // J. Neurosci. Res. 2009. V. 87. № 5. P. 1168–1174.

24. *Zhang X., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G.* // Science 2004. V. 305. № 5681. P. 217.

25. *Куликов А.В., Базовкина Д.В., Маузан М.П., Мормед П.* // Доклады Академии наук. 2003. V. 393. № 1. P. 134–137.

26. *Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K.* // J. Neurosci. Methods. 2005. V. 141. № 1. P. 97–101.

27. *Naumenko V.S., Kulikov A.V.* // Molekuliarnaia Biologiia. 2006. V. 40. № 1. P. 37–44.

28. *Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V.* // J. Neurosci. Methods. 2008. V. 170. № 2. P. 197–203.

29. *Moisan M.-P.* // Neurobehavioral Genetics. Methods and Applications / Eds. Jones B.C., Mormede P. Boca Raton: CRC Press, 1999. P. 71–91.

30. *Hicks P.B.* // Life Sci. 1990. V. 47. № 18. P. 1609–1615.

31. *Wadenberg M.L.* // Neurosci. Biobehav. Rev. 1996. V. 20. № 2. P. 325–339.

32. *Egashira N., Koushi E., Mishima K., Iwasaki K., Oishi R., Fujiwara M.* // J. Pharmacological Sciences. 2007. V. 105. № 4. P. 361–366.

33. *Hensler J.G., Truett K.A.* // Neuropsychopharmacology. 1998. V. 19. № 5. P. 354–364.

34. *Valdez M., Burke T.F., Hensler J.G.* // Brain Res. 2002. V. 957. № 1. P. 174–182.

35. *Zhang Y., D'Souza D., Raap D.K., Garcia F., Battaglia G., Muma N.A., Van de Kar L.D.* // The J. Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience. 2001. V. 21. № 20. P. 7919–7927.

36. *Zhang Y., Gray T.S., D'Souza D.N., Carrasco G.A., Damjanoska K.J., Dudas B., Garcia F., Zainelli G.M., Sullivan Hanley N.R., Battaglia G., Muma N.A., Van de Kar L.D.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004. V. 310. № 1. P. 59–66.

37. *Попова Н.К., Понимаскин Е.Г., Науменко В.С.* // Российский физиологический журн. им. И.М. Сеченова. 2015. Т. 101. № 11. С. 1270–1278.

38. *Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Zubkov E.A., Kulikov A.V.* // Genes, Brain, and Behavior. 2010. V. 9. № 5. P. 519–524.

39. *Borroto-Escuela D.O., Narvaez M., Ambrogini P., Ferraro L., Brito I., Romero-Fernandez W., Andrade-Talavera Y., Flores-Burgess A., Millon C., Gago B., Narvaez J.A., Odagaki Y., Palkovits M., Diaz-Cabiale Z., Fuxe K.* // Molecules. 2018. V. 23. № 6. P. 1341.

40. *Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K.* // Genes, Brain, and Behavior. 2008. V. 7. № 4. P. 506–512.

41. *Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Moisan M.P., Mormede P.* // Dokl. Biol. Sci. 2003. V. 393. P. 531–534.

42. *Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Kulikov A.V., Popova N.K.* // Genes, Brain, and Behavior. 2006. V. 5. № 8. P. 596–601.

43. *Науменко В.С., Кондаурова Е.М., Куликов А.В., Попова Н.К.* // Докл. Акад. наук. 2006. Т. 409. № 1. С. 133–135.

Investigation of the Brain Serotonin System Plasticity Using Recombinant Lines of Mice that Carry 1473G, an Allele of the Tryptophan Hydroxylase-2 Gene, and Differ by the Distal Fragment of Chromosome 13, which Contains the Gene Encoding the 5-HT_{1A} Receptor

A. Ya. Rodnyi[a], I. I. Belokopytova[a], E. V. Antonov[a], V. S. Naumenko[a], and E. M. Kondaurova[a]

[a] *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

New recombinant strains of mice B6-1473GG.CBA-CD13Mit76C (1473GG-76C) and B6-1473GG.CBA-D13Mit76B (1473GG-76B) were created using background of C57BL/6 strain to study the influence of the chromosome 13 distal fragment (103.9–112.4 Mbp) that contains the 5-HT_{1A} receptor gene from cataleptic line CBA on the 5-HT brain system of mice that carry the 1473G-allele of tryptophan hydroxylase-2 (TPH-2), a key enzyme involved in biosynthesis of serotonin (5-HT) in the brain. The 1473GG-76C and 1473GG-76B lines carry the chromosome 13 fragment, which contains the *Htr1a* gene from CBA and C57BL/6 strains, respectively. Both lines are homozygous by the 1473G-allele, which decreases the activity of TPH-2. The 1473GG-76C strain was found to have increased mRNA levels of the *Htr1a* and *Htr2a* genes as well as the Maoa gene (monoamine oxidase type A, which is the main enzyme involved in the degradation of 5-HT) in the midbrain, the *Htr1a* gene in the brain cortex, and the *Htr1a* and *Htr2a* genes in the hippocampus compared to 1473GG-76B. In addition, the 1473GG-76C strain demonstrated an increased expression of the genes encoding FREUD-1 ad FREUD-2, the key regulators for the Htr1a gene. The transcript level of the

Cc2d1a gene encoding FREUD-1 was elevated in the brain cortex and the expression of the *Cc2d1b* gene encoding FREUD-2 was changed in the midbrain. Furthermore, the 1473GG-76C strain demonstrated an increased level of 5-HT in the midbrain, hypothalamus, and hippocampus. Meanwhile, in the midbrain and brain cortex, these mice had a reduced level of 5-HIAA, the main metabolite of serotonin. The 5-HIAA/5-HT ratio, which reflects the intensity of 5-HT metabolism in the 1473GG-76C line was reduced in all the studied brain structures. Therefore, in 1473GG-76C mice homozygous for G-allele of the *Tph2* gene that carry the *Htr1a* gene of CBA strain, mRNA levels of the key genes of the 5-HT system and 5-HT metabolism differed significantly compared to 1473GG-76B mice homozygous for G-allele of the *Tph2* gene that carry the *Htr1a* gene of the C57BL/6 line.

Keywords: polymorphism C1473G, gene Tph2, gene Htr1a, recombinant mice, serotonin, tryptophan hydroxylase-2, 5-HT_{1A} receptor