Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

На правах рукописи



Дудко Наталия Александровна

РЕГУЛЯТОРНАЯ ГЕНОМИКА АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Федеральная территория «Сириус» – 2026

Работа выполнена в Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования "Научно-технологический университет "Сириус"**.**

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор, академик РАН
Рогаев Евгений Иванович
Научный руководитель Научного центра генетики и наук о жизни, руководитель направления «Генетика»

Защита состоится 18 декабря 2026 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета НТУ.1.5.7.36 в Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования "Научно-технологический университет "Сириус" по адресу 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНОО ВО «Университет «Сириус» https://siriusuniversity.ru/sveden/science/obyavleniya-o-zashchitakh, тел. 8-800-100-41-55.

Автореферат разослан «17» ноября 2026 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук — Поценковская Э.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень разработанности темы исследования

Поведение – это комплексный фенотип с множеством вариаций. Изучение механизмов возникновения и развития агрессивного поведения представляет собой крайне актуальную научную задачу. Многие нейродегенеративные и психиатрические заболевания ассоциированы с повышенной агрессивностью. Поведение является сложным признаком, и пока нет достаточного количества исследований, чтобы точно сказать, сколько генов вовлечено в процесс формирования агрессии и как они взаимодействуют.

Традиционно агрессивное поведение представляет собой сложное социальное намеренное поведение, направленное на нанесение физического повреждения другому индивидууму [Smith, Leiras, 2018]. Оно характерно для большинства позвоночных и некоторых беспозвоночных, и обеспечивает выживание в условиях конкуренции за ограниченные ресурсы (пищу, территорию), соперничестве за партнеров при спаривании и защиту [Ferguson, 2010; Lischinsky, Lin, 2020; Traniello и др., 2023; Wei, Talwar, Lin, 2021]. Агрессия является эволюционно закрепленной формой поведения животных и человека и сама по себе не является патологией [Haller, Kruk, 2006]. Однако такие психические расстройства, как биполярное аффективное расстройство (БАР), синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), шизофрения, проявляющиеся во враждебности, угрозах и нападениях, ассоциированы с искаженными формами агрессивного поведения [Bhavana, Vydyanath, Lakshmi, 2023; Teksin и др., 2023]. Изучение агрессивного поведения, помимо вклада в фундаментальную нейрогенетику и реконструкцию генетических механизмов, контролирующих различные поведенческие паттерны, также позволит разработать подходы для прогнозирования предрасположенностей к разным формам социального поведения на основе характеристик генотипа, в перспективе – разработки новых подходов для коррекции патологических форм поведения, являющихся, в том числе частью проявления заболеваний.

Ранее на основе данных секвенирования транскриптомов нескольких тканей лис с разными типами поведения были получены результаты, свидетельствующие об изменении уровня экспрессии ряда генов у животных с ручным или агрессивным поведением [Kukekova и др., 2011]. Это говорит о том, что изменение поведения в линиях лис может быть связано не только с генетическими вариациями, но и, вероятно, с изменениями в механизмах регуляции работы генов, включая возможный вклад эпигенетических факторов.

На сегодняшний день нет достоверных данных об эпигенетической регуляции поведения на модели лисы *Vulpes vulpes*. В связи с этим, актуальным является применение методов эпигенетики для изучения посттрансляционных гистоновых модификаций (в частности, с помощью иммунопреципитации с последующим глубоким секвенированием) для изучения механизмов эпигенетической регуляции поведения. В связи с этим, в рамках данной работы было

решено использовать модель лис *Vulpes Vulpes*, селектированных продолжительное время на поведение по отношению к человеку для изучения генетических и эпигенетических механизмов, лежащих в основе поведенческих различий на данной модели. Для этого были получены и проанализированы полногеномные, транскриптомные и эпигеномные данные, а также проведен интегративный анализ полученных результатов.

Цель исследования:

Выявление генетических вариантов, хромосомных локусов и молекулярных механизмов, ассоциированных с агрессивным поведением у лисицы обыкновенной (*Vulpes vulpes*), путем интеграции данных полногеномного секвенирования селектированных и неселектированной линий с транскриптомными и эпигеномными профилями головного мозга.

Задачи исследования:

1. Получить полногеномные данные и провести на их основе поиск генетических вариантов в выборках лисиц, представляющих три линии (селектированные на агрессию/дружелюбие и неселектированную), и идентифицировать геномные регионы и генетические варианты, специфичные для агрессивной линии.
2. Получить транскриптомные данные для фронтальной коры и миндалины и провести поиск генов с дифференциальной экспрессией между агрессивной и ручной/неселектиуемой линиями.
3. Получить эпигенетические профили гистоновых меток H3K4me3 и H3K27ac фронтальной коры, сформировать карты регуляторных элементов (промоторы, энхансеры) и выявить локусы со статистически значимыми различиями эпигенетических профилей в разных линиях.
4. Провести интеграцию данных о генетических вариантах, экспрессии генов и состоянии хроматина для выявления потенциальных молекулярно-генетических механизмов регуляции поведения.

Научная новизна

Впервые на основе данных индивидуального полногеномного секвенирования 46 животных (со средним покрытием >4x) агрессивной, ручной и неселектированной линий лисицы с использованием актуальной хромосомной сборки генома VulVul3 выявлены генетические варианты, специфичные для животных агрессивной линии. Впервые для данной модели получены эпигенетические профили фронтальной коры и выявлены специфичные для агрессивной линии локусы, обогащенные гистоновыми метками H3K4me3 и H3K27ac. Впервые на основе интеграции геномных, транскриптомных и эпигеномных данных показана прямая

связь между однонуклеотидными вариантами, специфичными для агрессивной линии, и различиями в экспрессии генов.

Теоретическая и практическая значимость

В работе получены фундаментальные данные о генах и сигнальных путях, потенциально участвующих в регуляции агрессивного поведения на модели лис *Vulpes vulpes*. Набор однонуклеотидных вариантов, специфичных для агрессивной линии, представляет собой потенциальные мишени для дальнейшего исследования в популяциях звероферм. Приоритетные кандидатные гены определяют конкретные направления дальнейших экспериментальных исследований, в частности, проверку ассоциации вариантов с поведенческими оценками и исследования белков.

Методология и методы исследования

Согласно поставленным задачам выбраны современные методологические подходы для их решения. В качестве объектов исследования использовались: фронтальная кора и миндалевидное тело лис *Vulpes vulpes*, принадлежащих к 3 разным поведенческим группам (агрессивным, ручным и неселектированным по отношению к человеку), а также ранее полученные в лаборатории геномные данные норок *Neogale vison*, также принадлежащих к 3 аналогичным поведенческим группам.

Работа включала четыре основных этапа.

На первом этапе выделяли ДНК из фронтальной коры головного мозга лисиц, готовили геномные библиотеки, по результатам глубокого секвенирования которых получали полногеномные данные. Эти данные, дополненные полученными ранее, использовали для анализа популяционной структуры, поиска однонуклеотидных вариантов и выявления геномных окон, специфичных для агрессивной линии. Также проводили аннотацию миссенс-вариантов, встречающихся с повышенной частотой в группе агрессивных животных.

На втором этапе выделяли тотальную РНК из фронтальной коры головного мозга и миндалевидного тела, готовили и секвенировали транскриптомные библиотеки, таким образом получали транскриптомные данные. Анализ дифференциальной экспрессии проводили отдельно для каждой ткани, определяли гены с дифференциальным уровнем экспрессии, отличающим агрессивных животных от ручных и неселектированных. Определяли модули коэкспрессии генов и корреляции модулей с фенотипом.

На третьем этапе выделяли клеточные ядра из тканей фронтальной коры головного мозга с дальнейшей иммунопреципитацией с антителами к гистоновым меткам H3K4me3 и H3K27ac, выделяли ДНК, готовили таргетные библиотеки с последующим секвенированием. Проводили поиск локусов, обогащенных прочтениями по гистоновым меткам, анализировали различия между линиями лисиц и определяли локусы, специфичные для агрессивной линии.

Четвертым этапом проводили интегративный анализ. Обогащение генами с дифференциальной экспрессией среди генов, в которых расположены однонуклеотидные варианты, оценивали с помощью критерия Фишера. Для мегарегионов ОНВ оценивали обогащение генами с дифференциальной экспрессией с помощью перестановочного анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. В результате анализа данных геномного секвенирования 46 лисиц трех линий (агрессивная, ручная, неселектированная) выявлены однонуклеотидные варианты, специфичные для животных агрессивной линии. Большинство вариантов локализовано в некодирующих областях, что указывает на преимущественно регуляторный характер изменений.
2. Во фронтальной коре и миндалевидном теле показаны различия в уровне экспрессии генов между агрессивной, ручной и неселектированной линиями; выявлены общие и тканеспецифичные гены, а также модули коэкспрессии, связанные с исследуемым фенотипом.
3. Впервые охарактеризованы маркеры гистоновых меток H3K4me3 и H3K27ac во фронтальной коре лисиц и выявлены межлинейные различия в распределении активного хроматина в генах, связанных с миелинизацией, нейрогенезом, синаптической и дофаминергической сигнализацией.
4. Совместный анализ геномных, транскриптомных и эпигенетических данных указывает на модель полигенной регуляции поведения с существенным вкладом некодирующих вариантов и изменений состояния хроматина.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности полученных результатов является высокой и подтверждается достаточным количеством полученных данных, сопоставлением с опубликованными данными, использованием общепринятых современных экспериментальных методов, а также корректностью применяемых статистических способов анализа результатов.

Апробация результатов была осуществлена на научных мероприятия:

1) Конференции BGRS/SB-2024 с устным докладом по теме “Регуляторная геномика агрессивного поведения на неканонической модели лисы *Vulpes vulpes*” (Новосибирск, 2024)
2) Конференция “Генетика 2025” с устным докладом по теме “Регуляторная геномика агрессивного поведения на лисице *Vulpes vulpes*” (Москва, 2025)
3) Конференция “Генетические процессы в популяциях” с устным докладом по теме “Профиль активного хроматина клеток фронтальной коры мозга модели агрессивного поведения лисы *Vulpes vulpes*” (Москва, 2026)

Публикации

По теме диссертационной работы опубликованы 3 статьи в рецензируемом научном журнале, включенном в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, индексируемом в международных реферативных базах данных и системах цитирования Web of Science и Scopus; тезисы в материалах российских конференций с международным участием.

Личный вклад автора

Личное участие автора заключалось в постановке задач диссертационного исследования, изучении и анализе литературы по теме диссертации; планировании и выполнении экспериментальных работ; статистической обработке полученных результатов, их интерпретации и обобщении, формулировке выводов; подготовке публикаций по теме диссертации, выступлении с устными докладами на конференциях международного уровня.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, выводов, списка используемой литературы и приложения. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 7 таблицами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полногеномный анализ.

Данные полногеномного секвенирования 46 образцов из 3 исследуемых линий животных (агрессивные (А), ручные (Т), неселектированные (N)) со средним покрытием >4х использовали для анализа популяционной структуры, гаплотипного теста, а также выявления однонуклеотидных вариантов (ОНВ) и геномных регионов (с высоким значением индекса Райта (Fst)), специфичных для агрессивной линии (схематично результаты анализа представлены на рисунке 1).

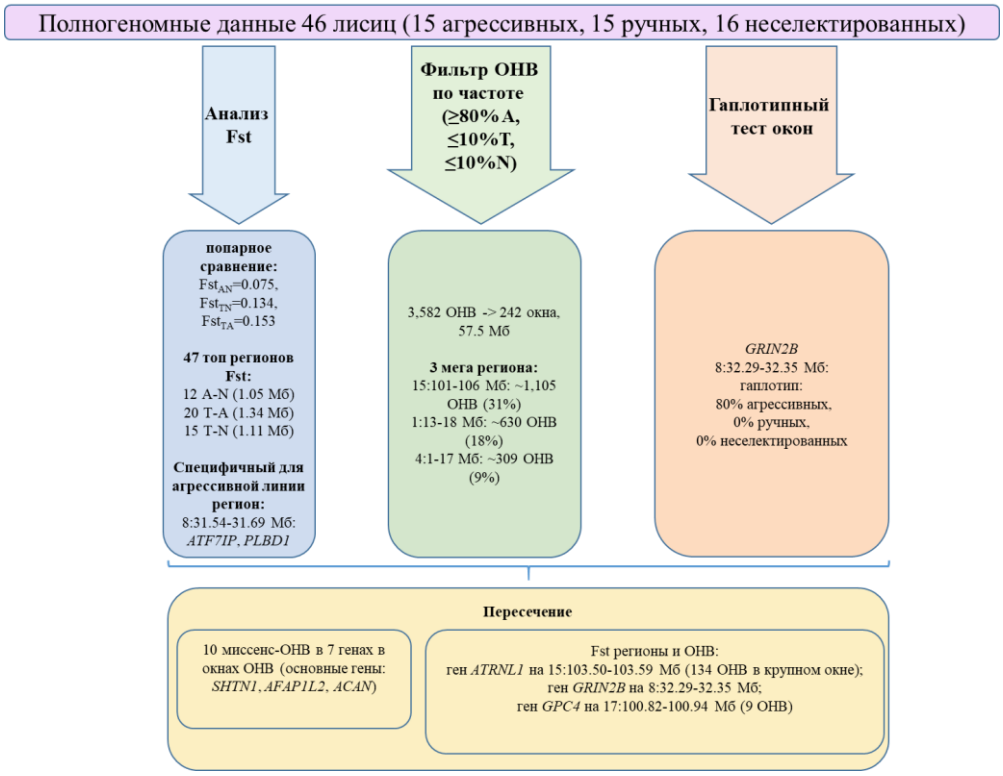


Рисунок 1 – Схематичное представление результатов, полученных на полногеномных данных. Fst – индекс фиксации Райта, ОНВ – однонуклеотидный вариант.

После генотипирования всей когорты, применения жесткой фильтрации и фазирования аллелей, генетические варианты 46 особей образуют три отчетливых кластера на PCA, соответствующих линиям; выбросов и скрытой структуры, связанной с партиями образцов, выявлено не было (PC1 – 23,0%, PC2 – 14,9%; минимальная ошибка перекрестной проверки ADMIXTURE наблюдалась при K = 2, тогда как биологически обоснованное значение K = 3 разделяло все три линии;) (Рисунок 2). Геномная дифференциация высока для попарных сравнений (средние значения: Fst_{AN}=0,075, Fst_{TN}=0,134, Fst_{TA}=0,153) и в основном обусловлена животными ручной линии.

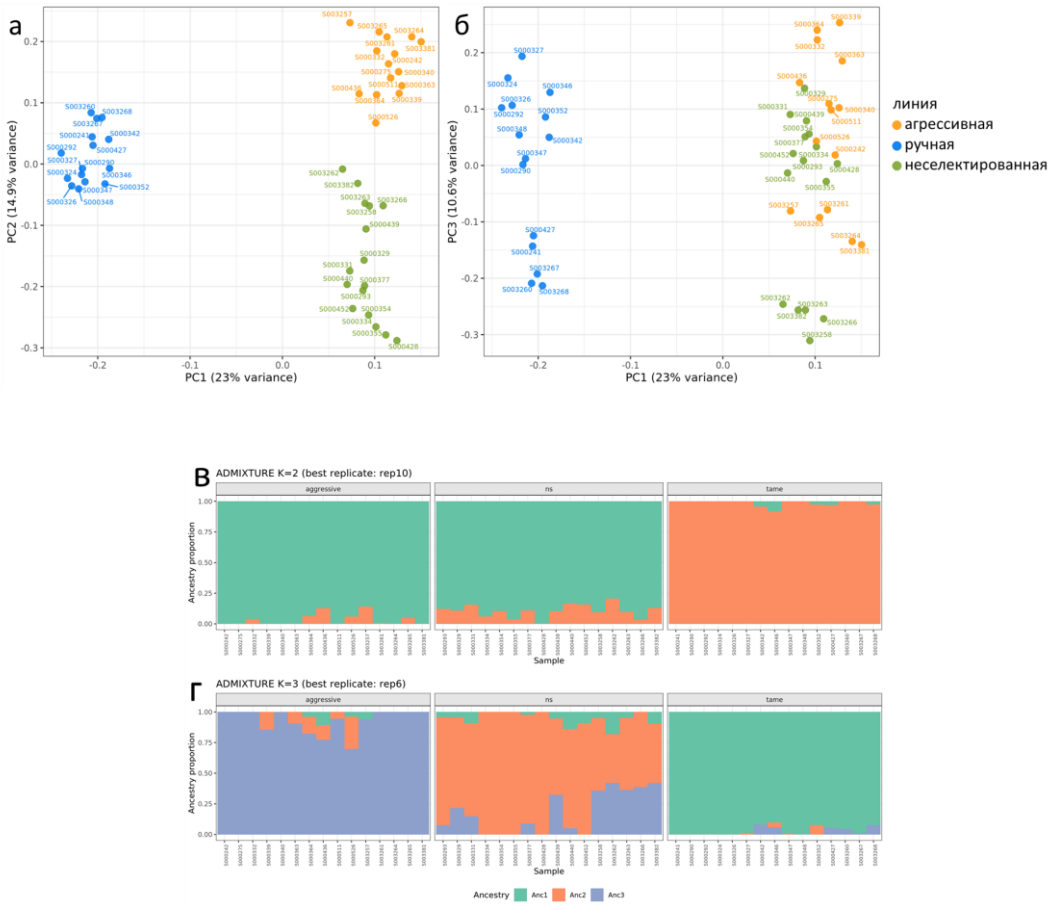


Рисунок 2 – Популяционная структура геномов исследуемых линий в виде главных компонент для (а) первой и второй компонент; (б) первой и третьей компонент. Цветами обозначены исследуемые линии: оранжевый – агрессивная, зеленый – неселектированная, синий – ручная. Популяционная структура исследуемых линий в виде предковых компонент для (в) K=2; (г) K=3. Цветами обозначены линии: оранжевый – агрессивная, зеленый – неселектированная, синий – ручная.

Для каждого попарного сравнения 50 окон с наибольшими значениями Fst были объединены в 47 регионов (12 для сравнения агрессивной и неселектированной линий, 20 – ручной и агрессивной, 15 – ручной и неселектированной) (Рисунок 3). Только один регион оказался строго специфичным для агрессивной линии – регион chr8:31,54–31,69 Mb (гены *ATF7IP*, *PLBD1*; взвешенные значения Fst_{AN}=0,70, Fst_{TA}=0,88). При этом он не содержит ОНВ, специфичных для агрессивной линии.

Далее применение фильтра частот по группам (≥80% A, ≤10%T, ≤10%N) к общему списку ОНВ позволило выявить 3582 ОНВ, специфичных для агрессивной линии; они сконцентрированы в 242 окнах общей протяженностью 57,5 Мб и трех мегарегионах: chr15 101–106 Мб (около 1105 ОНВ, 31%), chr1 13–18 Мб (около 630, 18%) и chr4 1–17 Мб (около 309, 9%). Среди вариантов выявлено 49,0% интронных, 39,3% межгенных, 10,7% в генах некодирующих РНК, 0,6% синонимичных, 0,1% затрагивающих сайты сплайсинга и 0,3% миссенс-вариантов (10 ОНВ в 7 генах). Проверка гаплотипов во всех 242 окнах выявила один наиболее выраженный

сигнал: область гена *GRIN2B* (chr8 32,24–32,33 Мб), в которой два OHB, специфичных для агрессивной линии, расположены в цис-положении. Гаплотип присутствует в 80% копий хромосом животных агрессивной линии и отсутствует в копиях хромосом животных ручной и неселектированной линий (критерий Фишера: $p = 3{,}3 \times 10^{-11}$; $FDR = 4{,}0 \times 10^{-9}$).

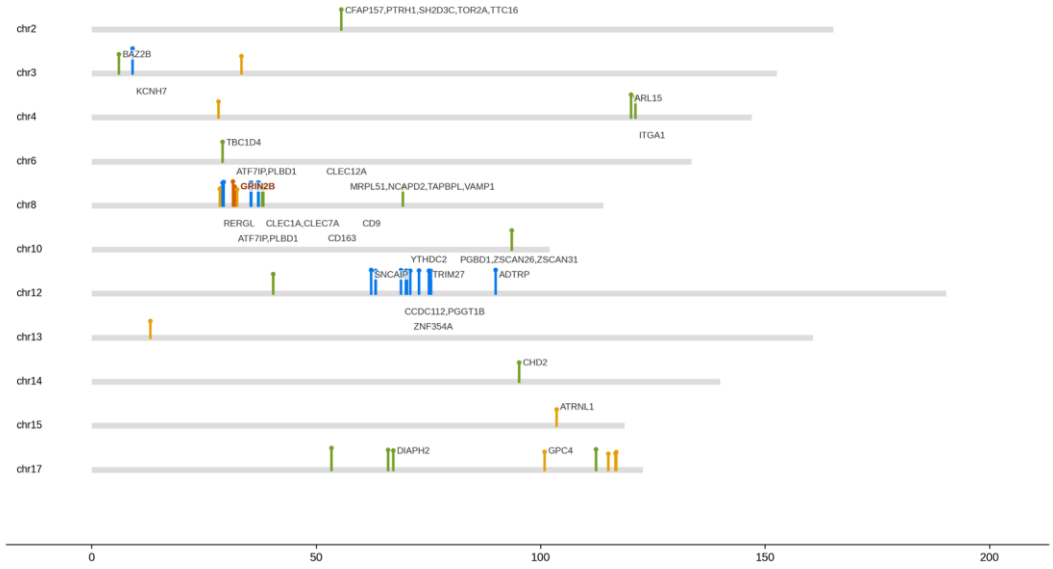


Рисунок 3 – Распределение по геному 47 регионов Fst с максимальными значениями в попарных сравнениях между исследуемыми линиями (агрессивная (A), ручная (T), неселектированная (N)). Цветами обозначены попарные сравнения, в которых для региона наблюдалось максимальное значение Fst: терракотовый - A с T и A с N; оранжевый – A с N, зеленый – T с N, синий – T с A. Отдельно на chr8 коричневым цветом обозначен ген GRIN2B, в области которого находятся специфичный для агрессивной линии гаплотип.

Для каждого миссенс-варианта выполняли аннотацию с реконструкцией белковой последовательности по геномной аннотации лисицы; позиции миссенс-замен проецировали на белки человека с помощью множественного выравнивания полноразмерных белков RefSeq десяти видов. Затем объединяли предсказания VEP SIFT/PolyPhen, оценки Grantham, различия по гидропатичности и заряду, данные о доменах UniProt и консервативность позиций; на этой основе десять OHB ранжировали по степени химических различий между исходной и измененной аминокислотами. Предсказанные структуры дикого и мутантного вариантов сравнивали после суперпозиции по Кабшу, анализируя значения RMSD (мера средней разницы между координатами соответствующих атомов в двух или более совмещенных трехмерных молекулярных структурах) структурного ядра и окрестности сайта замены, изменение значения pLDDT (показатель локальной уверенности модели AlphaFold в правильности предсказания структуры белка для каждой отдельной аминокислоты) в этой области и изменения контактов.

Набор миссенс-вариантов преимущественно представлен заменами с умеренным или низким предполагаемым влиянием. Наиболее значимыми по совокупности данных являются ген

ACAN (Рисунок 4 (сверху), аминокислотная замена P772S, пролин консервативен у исследуемых 10 видов; предполагаемое последствие замены – устранение изгиба полипептидной цепи на границе KS-домена; снижение значения pLDTT для участка на 17 пунктов при сохранении воспроизводимости структурного ядра; SIFT = 0,02), ген *SHTN1* (Рисунок 4 (снизу), аминокислотная замена V579I, валин консервативен у исследуемых 10 видов; PolyPhen = 0,631; неупорядоченная область белка) и ген *NOL8* (замена S359C, SIFT = 0,01; серин консервативен у всех 9 видов, вошедших в выравнивание). Также обнаружены два варианта в гене *ACAN*, восстанавливающие состояние референсной последовательности (L793S, V1812M), и вариант в гене *AFAP1L2* S673L, классифицированный предсказывающими алгоритмами как неповреждающий.

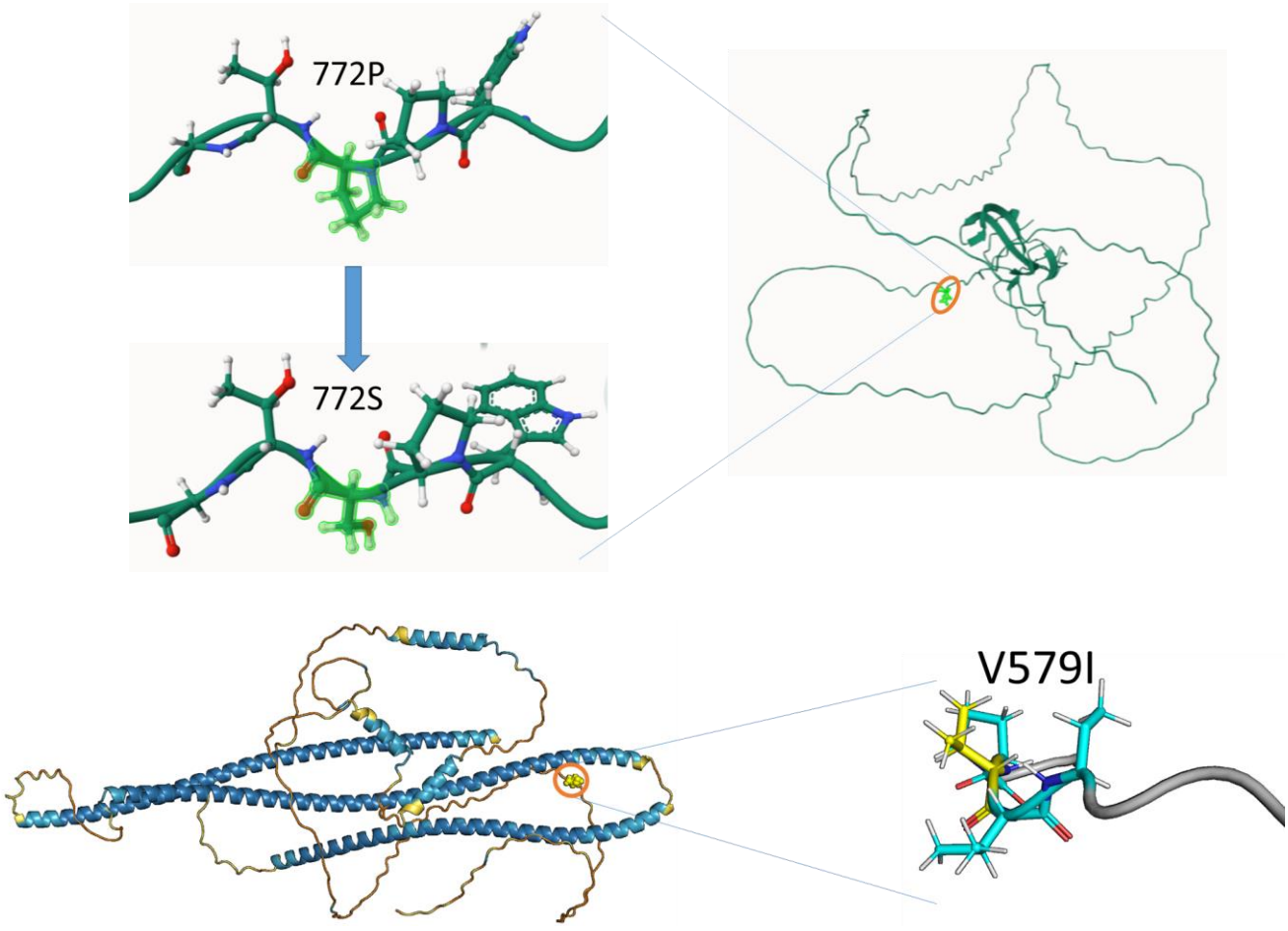


Рисунок 4. Сверху: предполагаемая 3D-структура домена KS белка ACAN (справа), аминокислотная замена P772S (слева): референсная аминокислота и специфичная для агрессивной линии. Снизу: предполагаемая 3D-структура белка SHTN1 (слева), аминокислотная замена V579I (справа): аминокислота, специфичная для агрессивной линии.

Пересечение регионов Fst с набором OHB носит избирательный характер: ген *ATRNL1* (chr15; 134 OHB в одном из окон с наиболее высоким значением FST), гены *GRIN2B* и *GPC4*

(chr17; 9 ОНВ). Сопоставление с ранее опубликованным геномным исследованием той же модели показало небольшое, но выраженно локализованное пересечение на уровне генов (21 общий ген): 15 из них расположены в выявленных нами окнах ОНВ на chr8, включая гены *ATF7IP*, *PLBD1* и *GRIN2B*. Кроме того, основной кандидатный ген *SORCS1* из этого исследования, связанный с ручным поведением, также находится в выявленном нами мегарегионе на chr15.

Дополнительно, учитывая выявленные ранее в опубликованных данных различия в уровнях моноаминовых нейромедиаторов у двух животных моделей, селектированных на поведения (лис и норок), а также ассоциации вариантов в гене *MAOA* с агрессивным поведением у других видов, было решено провести исследование полиморфизма этого гена в геномах лис и норок. Для этого использовали данные геномного секвенирования американской норки *Neogale vison*, в которых проводили поиск генетических вариантов относительно референсного генома самки американской норки (GCF_020171115.1). В общей сложности, по сравнению с референсным геномом, в исследованной выборке норок в области гена *MAOA* и его промоторном регионе было выявлено 277 генетических вариантов, из них ни один не попал в кодирующую область гена, 271 вариантов были локализованы в интронах и 6 попали в промоторную область. Анализ ассоциации выявленных вариантов с поведением, проведенный с помощью точного теста Фишера в программе PLINK, не выявил ни одного статистически значимого, с учетом поправки на множественные тестирование, генетического варианта. В геномных данных лис проводили аналогичный поиск генетических вариантов, всего в теле гена *MAOA* было выявлено 59 вариантов, 3 из них попадали в аннотированные экзоны. Однако, статистически значимой ассоциации с агрессивным поведением ни для одного из этих вариантов выявлено не было.

Анализ транскриптомов из фронтальной коры головного мозга и миндалевидного тела.

Данные транскриптомного секвенирования 30 образцов фронтальной коры (по 10 животных из агрессивной, ручной и неселектированной линий) и 15 образцов миндалевидного тела (по 5 животных из агрессивной, ручной и неселектированной линий) использовали для анализа популяционной структуры, анализа дифференциальной экспрессии и модулей коэкспрессии генов, основные результаты представлены на рисунке 5.

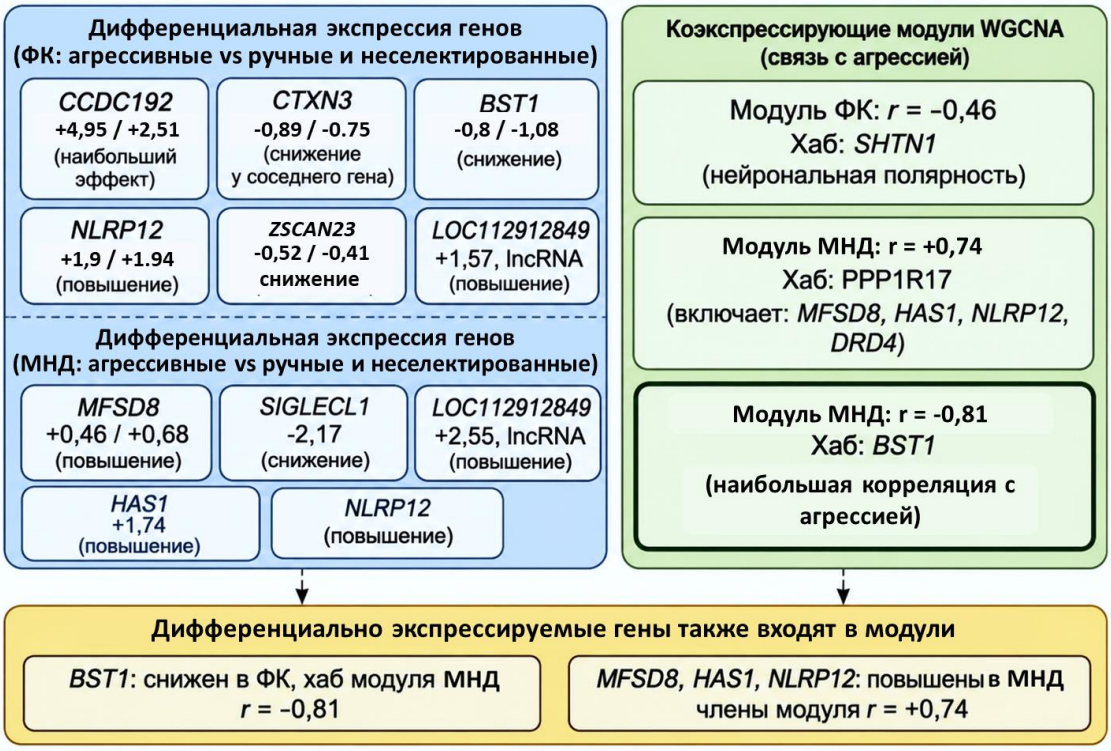


Рисунок 5. Схематичное представление результатов, полученных на транскриптомных данных: гены с дифференциальной экспрессией между агрессивными особями и ручными/неселектированными во фронтальной коре (ФК) и миндалевидном теле (МНД); модули коэкспрессии генов, коррелирующие с агрессивным фенотипом (с коэффициентом корреляции r) и хаб-гены в них.

В результате анализа главных компонент (PCA) не было выявлено выраженного разделения животных исследуемых линий по уровню экспрессии генов ни во фронтальной коре (ФК), ни в миндалевидном теле (МНД). В то же время дискриминантный анализ методом частичных наименьших квадратов (PLS-DA) показал обособление ручной линии от смешанного кластера агрессивной и неселекционной линий в ФК, а в МНД – четкое разделение всех трех групп (Рисунок 6).

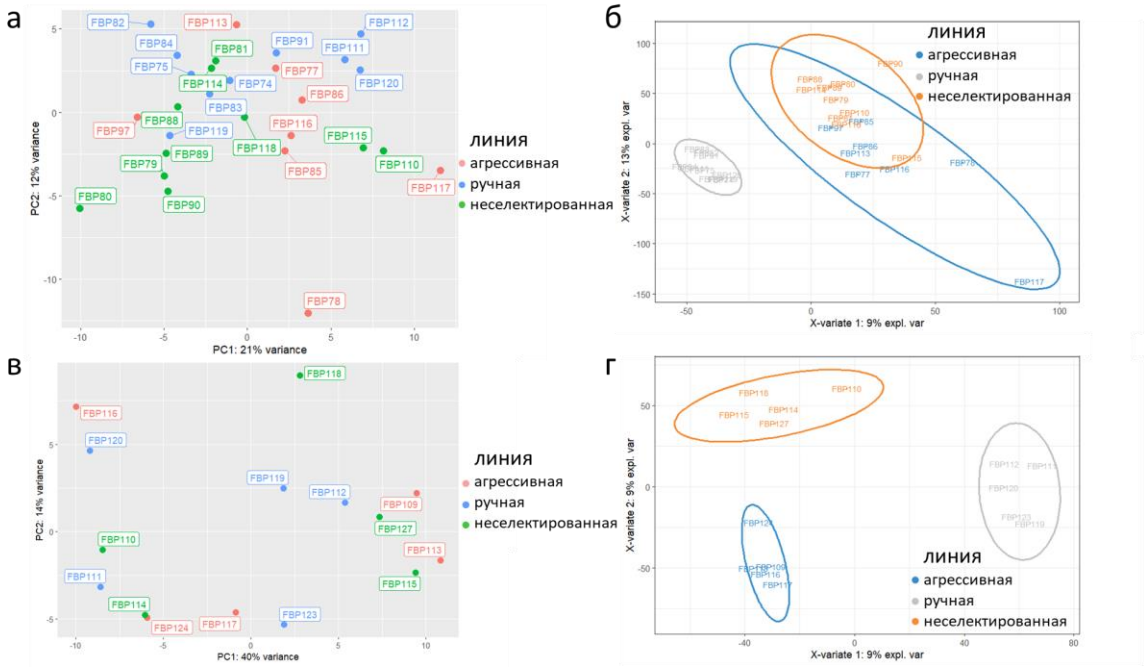


Рисунок 6. Популяционная структура транскриптомов исследуемых линий в виде главных компонент для фронтальной коры (а,б) и миндалевидного тела (в,г) с использованием методов снижения размерности: Анализ главных компонент (PCA) (а,в); Дискриминантный анализ методом частичных наименьших квадратов счетов (PLS-DA) (б,г). Названия исследуемых линий обозначены цветом; слева: красный – агрессивная, зеленый – неселектированная, синий – ручная; справа: синий – агрессивная, оранжевый – неселектированная, серый – ручная.

Дифференциальный анализ экспрессии в ФК и МНД при попарном сравнении позволил получитьследующие результаты: в ФК при сравнении агрессивной и ручной линий выявлено 179 дифференциально экспрессируемых генов (81 с повышенной и 98 со сниженной экспрессией), при сравнении агрессивной и неселектированной линий – 31 ген (13 с повышенной и 18 со сниженной экспрессией); в МНД при сравнении агрессивной и ручной линий выявлено 62 гена (31 с повышенной и 31 со сниженной экспрессией), а при сравнении агрессивной и неселектированной линий – 21 ген (10 с повышенной и 11 со сниженной экспрессией). В ФК и МНД был выделен блок из 14 и 12 генов, соответственно, характеризующихся специфичным для агрессивной линии транскрипционным профилем (согласованное направление изменения, padj < 0,05 в попарных сравнениях агрессивных особей с ручными и с неселектированными). Наиболее выраженные сигналы включают противоположное изменение экспрессии расположенных рядом генов *CTXN3* и *CCDC192* в ФК (*CTXN3*: $logFC_{AT}$=-0.89, $logFC_{AN}$=-0.75; *CCDC192*: $logFC_{AT}$=4.95; $logFC_{AN}$=2.51), ген *MFSD8* в МНД ($logFC_{AT}$=+0,46, $logFC_{AN}$=+0,68), ген *BST1* в МНД ($logFC_{AT}$=-0,82, $logFC_{AN}$=-1,05), гены *NLRP12* и *HAS1* в МНД и ФК. Анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов (WGCNA) позволил объединить выявленные различия в модулях коэкспрессии генов, коррелирующие (с коэффициентом корреляции r) с агрессивным поведением, а также хаб-гены (демонстрирующие сильную корреляцию экспрессии с большинством других генов внутри

модуля) в них: в ФК модуль с r = -0,46 (хаб-ген *SHTN1*, участвующий в поляризации нейронов); в МНД модули с r = +0,74 (хаб-ген *PPP1R17*; модуль включает гены *MFSD8, HAS1, NLRP12* и *DRD4*) и с r = -0,81 (хаб-ген *BST1*, модуль с наиболее сильной корреляцией с агрессией). Полученные результаты указывают на возможное участие процессов организации синаптической архитектуры, лизосомных процессов и нейровоспаления (*MFSD8, NLRP12*) в формировании исследуемого фенотипа.

Анализ регуляторных элементов генома во фронтальной коре головного мозга лисиц

Данные секвенирования хроматина, иммунопреципитированного с антителами к гистоновым меткам H3K4me3 и H3K27ac, от 18 образцов фронтальной коры (по 6 животных из агрессивной, ручной и неселектированной линий) использовали для построения карты регуляторных элементов (промоторы и энхансеры), получения эпигенетических профилей и выявления различий между линиями с разным поведением, основные результаты представлены на рисунке 7.



Рисунок 7. Схематичное представление результатов, полученных на основе анализа эпигеномных данных (гистоновых меток H3K4me3 и H3K27ac).

При сравнении агрессивных лисиц с ручными и неселектированными было обнаружено 73 локуса с согласованными изменениями обеих гистоновых меток: примерно в 59% из них уровень меток повышался, а в 41% – снижался. Повышенный эпигенетический сигнал был выявлен, в частности, в локусах промоторов генов *KLK6* и *TUBB4A* (Рисунок 8), связанных с миелином и цитоскелетом, тогда как снижение сигнала затрагивало гены внеклеточного матрикса и транскрипционной регуляции.

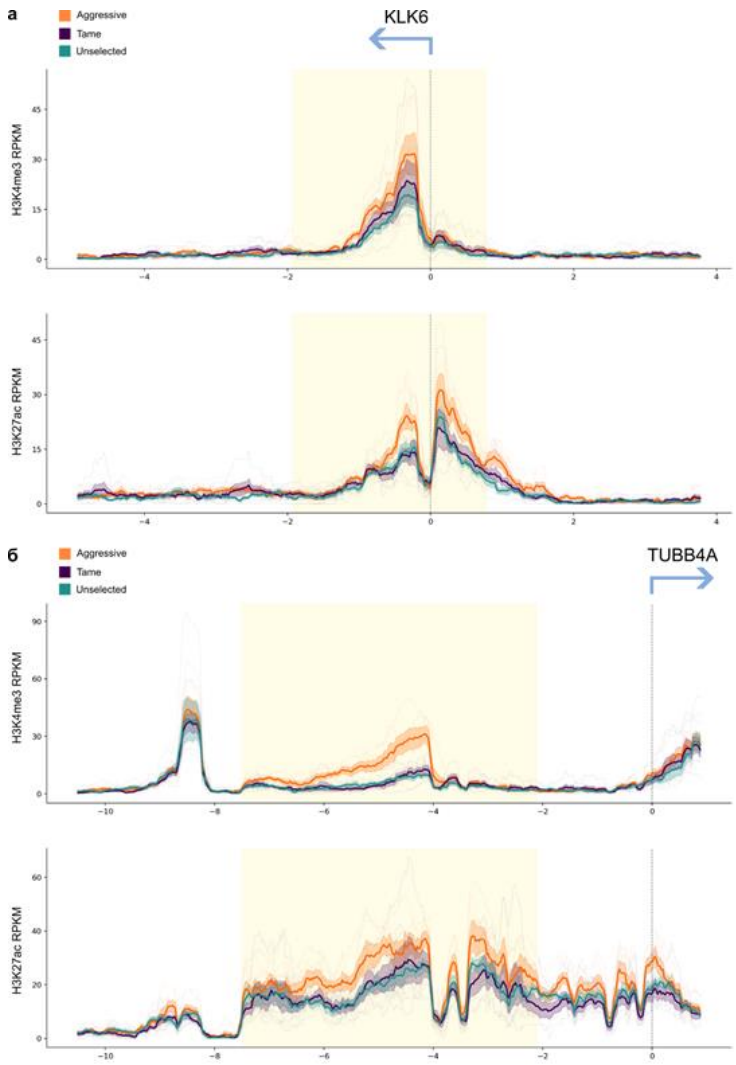


Рисунок 8. Увеличение уровней H3K4me3 и H3K27ac в районе промоторов генов *KLK6* (а) и *TUBB4A* (б) в клетках фронтальной коры у животных с агрессивным поведением по сравнению с ручными и неселектированными. Нулевая точка на оси абсцисс соответствует сайту начала транскрипции, направление транскрипции указано стрелкой. По оси ординат обозначена нормализованная глубина прочтений RPKM).

Кроме того, были обнаружены изменения только по метке H3K4me3 в 298 локусах и только по метке H3K27ac – в 3070 локусах. Среди затронутых генов были выделены участники синаптической пластичности, нейрональной сигнализации и регуляции транскрипции, включая гены *CAMK2A, CHRNA5, ELK4* и *BACH1*.

Сопоставление эпигенетических профилей с ранее опубликованными данными экспрессии в префронтальной коре ручных и агрессивных лисиц (X. Wang,L. et al., 2018) выявило совпадение направлений изменений для пяти генов (*ABI3BP, RARA, DUSP1, CD82 и PTGFRN*), что указывает на возможную связь хроматинового состояния с транскрипционной активностью. В промоторе гена *MAOA* было выявлено снижение обеих меток у агрессивных лисиц относительно ручных, но не относительно неселектированных. В целом, было показано, что

выявленные изменения затрагивают три основных функциональных направления – миелинизацию и функцию олигодендроцитов, нейрогенез, а также синаптическую и дофаминергическую сигнализацию.

Интегративный анализ

Интеграция данных трех уровней – специфичных для агрессивной линии OHB, дифференциального обогащения гистоновыми метками H3K4me3/H3K27ac и дифференциальной экспрессии в двух тканях мозга – позволяет сформировать единую регуляторную модель поведенческой дивергенции. Лишь 10 из 3582 OHB расположены в кодирующих областях, а два варианта, локализованные в участках с дифференциальным обогащением активного хроматина (промотор гена *KLK6* и энхансер в теле гене *HIF3A*), являются некодирующими. Это согласуется с результатами эксперимента на крысах, в котором локусы, связанные с ручным поведением, картировались преимущественно в регуляторных областях при полигенном контроле признака (Heyne, Henrike O et al., 2014), а также с данными геномного исследования лисиц, где поведенческие QTL были обогащены регуляторными вариантами и генами развития нервной системы, а не вариантами, приводящими к фиксированным изменениям белковой последовательности. Обогащение генами с дифференциальной экспрессией среди генов, в которых расположены OHB, а также зависимость между распределением OHB и выраженностью различий экспрессии демонстрируют связь между генотипом и экспрессией на уровне всего генома. Среди мегарегионов только область на chr4 (в которую входит ген *MFSD8*) демонстрирует статистически значимый результат по результатам пермутационного тест .

В тех случаях, когда кодирующие и регуляторные эффекты совпадают (в частности, для гена *AFAP1L2* при наличии OHB наблюдается повышенная экспрессия во фронтальной коре агрессивных животных), прогнозирующие алгоритмы не указывают на выраженное влияние аминокислотных замен: замена S673L классифицируется алгоритмами PolyPhen и SIFT как не повреждающая; вариант A679T соответствует аминокислоте, обнаруживаемой у кошки, собаки, волка и шакала. Это смягчает первоначальную оценку тяжести варианта, основанную на показателе Grantham. Среди миссенс-вариантов только вариант в гене *ACAN* (P772S) объединяет все линии доказательств: консервативность позиции, структурный механизм воздействия, снижение точности предсказания структуры участка и прогноз алгоритма SIFT о повреждающем эффекте. Для замен в генах *SHTN1* (V579I) и *NOL8* (S359C) значимость вариантов обосновывается консервативностью позиции и локальными химическими особенностями. При этом ген *SHTN1* дополнительно сочетает наличие кодирующего варианта со статусом хаб-гена в модуле коэкпспрессии, коррелирующем с агрессией во фронтальной коре, и расположением в крупнейшем мегарегионе, несмотря на отсутствие изменений экспрессии. Такой профиль может

указывать на влияние варианта на изоформы, специфичные для отдельных типов клеток, или на регуляцию на уровне белка.

Данные по хроматиновым меткам впервые в рамках этой модели позволили выявить прямую связь между генетическими вариантами и энхансерными областями. Наиболее убедительным регуляторным кандидатом является ОНВ в промоторе гена *KLK6*: специфичный для агрессивной линии вариант расположен в промоторе гена, где у агрессивных животных повышается обогащение обоими гистоновыми метками – H3K4me3 и H3K27ac – в обоих сравнениях. Ген *KLK6* кодирует сериновую протеазу, секретируемую олигодендроцитами и нейронами; она расщепляет миелин и внеклеточный матрикс и связана с демиелинизирующими заболеваниями и психическими расстройствами. Усиление активного состояния промотора позволяет сформулировать гипотезу о различиях между линиями в протеазо-зависимом ремоделировании миелина и внеклеточного матрикса. ОНВ в теле гена *HIF3A* коррелирует со снижением обогащения по гистоновой метке H3K27ac, связывая поведенческую селекцию с метаболической сигнализацией и ответом на гипоксию. При этом оба локуса не демонстрируют экспрессии на уровне общей мРНК, что соответствует ситуации, когда регуляторный вариант действует в ограниченной популяции клеток. Дополнительно, выявленное в анализе дифференциальной экспрессии противоположное изменение экспрессии расположенных рядом генов *CTXN3* и *CCDC192* в ФК, в сочетании с дифференциально обогащенным пиком H3K27ac перед геном *CTXN3*, указывает на возможную дивергентную регуляцию со стороны общего регуляторного элемента (Рисунок 9).

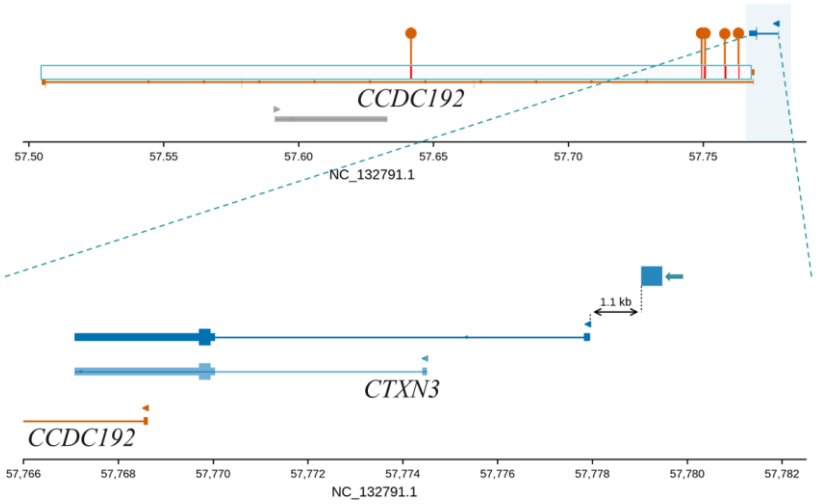


Рисунок 9. Схематичный фрагмент аннотации генома лисицы (сверху: NC_132791.1:57.50-57.80 Мб; снизу: NC_132791.1:57.766-57.782 Мб): оранжевым цветом отмечена область гена *CCDC192* ($logFC_{AT}$=4.95; $logFC_{AN}$=2.51); над ним обозначено расположение вариантов, специфичных для агрессивных лисиц в теле гена; синим цветом отмечен ген *CTXN3* ($logFC_{AT}$=-0.89, $logFC_{AN}$=-0.75); справа от него обозначено расположение локуса H3K27ac ($logFC_{AT}$=-0.82, $logFC_{AN}$=-1,17).

Таким образом, в данной работе, выявлена многоуровневая регуляторная архитектура агрессивного фенотипа серебристых лисиц, включающая преимущественно некодирующие генетические варианты, изменения активного хроматина и экспрессии генов. Полученные результаты позволяют предположить новые гены-кандидаты, выявленные интегративным анализом. Среди ключевых кандидатов выделены гены *GRIN2B* и *ACAN* на геномном уровне, *KLK6* и *HIF3A* – на уровне эпигенетических изменений, а также *SHTN1, PPP1R17, BST1, MFSD8, HAS1* и *NLRP12* – на уровнях экспрессии и коэкспрессии. Выявленные изменения затрагивают нейрональную возбудимость, синаптическую пластичность, дофаминергическую сигнализацию, нейроиммунные процессы и метаболизм. Пересечение ряда кандидатных генов и геномных регионов с ранее описанными локусами, в частности, генов *GRIN2B* и *SORCS1*, а также *ATF7IP/PLBD1,* дополняет существующие представления и подчеркивает значимость генетических и эпигенетических различий в формировании поведенческих различий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данной работы впервые были получены данные сразу на нескольких генетических уровнях для 3 фенотипических групп лис (ручных, агрессивных, неселектированных). Были глубоко проанализированы геномы исследуемых особей, что позволило выявить общий гаплотип основателей агрессивной линии в области гена *GRIN2B* и специфичный для агрессивной линии регион Fst (с генами *ATF7IP*/*PLBD1*), соответствующий ранее опубликованным данным. Также, было выявлено 3582 однонуклеотидных полиморфизма, специфичных для агрессивной линии особей. По совокупности данных о консервативности, предсказаниях алгоритмов и структурных характеристиках в качестве наиболее интересных кандидатов были выделены миссенс-варианты в генах *ACAN, SHTN1* и *NOL8*.

Был проведен анализ дифференциальной экспрессии таких отделов мозга лисы, как фронтальный кортекс и миндалевидное тело, выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены и модули коэкспрессии генов. В частности, показано дифференциальная экспрессия для генов, участвующих в организации синаптической архитектуры, лизосомных процессах и процессах нейровоспаления.

Были получены эпигенетические профили, соответствующие промоторам и энхансерам, дифференциально обогащенным между исследуемыми фенотипическими группами. При сравнении агрессивных лисиц с ручными и неселекционными животными обнаружено 73 локуса с согласованными изменениями обеих меток: примерно в 59% из них уровень меток повышался, а в 41% – снижался. Повышенный эпигенетический сигнал был выявлен, в частности, в локусах

генов, связанных с миелином и цитоскелетом, тогда как снижение затрагивало гены внеклеточного матрикса и транскрипционной регуляции.

Интеграция трех уровней данных позволила объединить три независимых перечня генов в единую модель: ОНВ, специфичные для агрессивной линии, преимущественно расположены в некодирующих областях и статистически связаны с различиями в экспрессии генов. Гены, содержащие ОНВ, обогащены среди дифференциально экспрессируемых генов. Мегарегион на chr4 (содержащий ген *MFSD8*) – единственный, для которого выявлено статистически значимое по результатам перестановочного теста обогащение генами с дифференциальной экспрессией ($p = 0,033$). Обнаружена корреляция между генетическими вариантами и состоянием хроматина: ОНВ в промоторе гена *KLK6* расположен в локусе с повышенным обогащением гистоновых меток H3K4me3 и H3K27ac в агрессивной линии, а ОНВ в теле гена *HIF3A* – в локусе со сниженным обогащением H3K27ac. При этом в обоих случаях изменения экспрессии на уровне ткани в целом отсутствуют, что соответствует паттерну регуляторной изменчивости, специфичной для отдельных типов клеток. Хаб-гены WGCNA (*SHTN1, PPP1R17, BST1*) совпадают с генами, содержащими ОНВ или дифференциально экспрессируемыми.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены геномные особенности агрессивной линии лисиц (*Vulpes vulpes*), включая 3582 агрессивно-специфичных нуклеотидных варианта (большинство расположено в некодирующих областях), объединенные в 242 геномных окна и три крупных мегарегиона, а также 10 миссенс-вариантов.
2. Установлены различия уровня экспрессии генов во фронтальной коре и миндалевидном теле между животными агрессивной, ручной и неселектированной линий и модули коэкспрессии, коррелирующие с поведенческим фенотипом, связанные с процессами синаптической пластичности, нейрональной сигнализации, нейровоспаления и клеточного метаболизма.
3. Впервые охарактеризованы эпигенетические профили H3K4me3 и H3K27ac во фронтальной коре лисиц и выявлены различия состояния активного хроматина между линиями. Изменения затрагивают гены, связанные с миелинизацией, нейрогенезом, синаптической и дофаминергической сигнализацией, причем значительная часть различий локализована в энхансерных областях.
4. На основе интеграции геномных, транскриптомных и эпигенетических данных были определены функциональные особенности генов *ACAN, SHTN1, MFSD8, BST1* и регуляторной области в локусе *KLK6*, характерные для лисиц с агрессивным поведением.
5. Выявленные геномные и эпигеномные особенности, специфичные для животных агрессивной линии, согласуются с ранее установленной полигенной моделью регуляции

поведения, а геномная локализация показывает существенный вклад некодирующих регуляторных вариантов и изменения хроматинового состояния.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. Эпигенетика агрессии: современные достижения и перспективы на животных моделях. **Н.А. Дудко**, Г.Н. Нуриева, С.С. Кунижева, И.Л. Кузнецова // Генетика. Том 61, 2025 г., № 10
2. Генетическая вариабельность локуса гена *MAOA* у агрессивных животных неканонической поведенческой модели *Neogale vison*. / А. Д. Манахов*, **Н. А. Дудко*,** Ф. Е. Гусев, Т. В. Андреева, О. В. Трапезов, Е. И. Рогаев // Генетика. – 2023, том 59, № 6, с. 728–732
3. Профиль активного хроматина клеток фронтальной коры мозга модели агрессивного поведения лисы *Vulpes vulpes*. / **Дудко Н. А.***, Гусев Ф.Е., Андреева Т. В., Шепелева Д. В., Шихевич С. Г., Харламова А. В., Манахов А.Д. // RUSS J GENET+, 2026, 2026. Т. 62. № 11. С. 117–132