

Изменение метаболизма катехоламинов в мозге у мышей с дефицитом катехол-О-метилтрансферазы

И.И. Ахмаров¹, О.А. Кириллов¹, А.В. Чиринскайте¹, Е.Ю. Городилова², Ю.В. Сопова¹, Е.И. Леонова^{*1}

¹ Центр трансгенеза и редактирования генома, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* E-mail: e.leonova@spbu.ru

Резюме. Катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ) является одним из основных ферментов млекопитающих, участвующих в метаболизме катехоламинов, таких как дофамин, норадреналин. Процесс метаболизма катехоламинов важен для регуляции нормального функционирования нервной системы, включая эмоции и реакции на стресс. Участие КОМТ в функционировании нервной системы делает животных с инактивированным геном *comt* удобной моделью для изучения психических расстройств. С помощью CRISPR/Cas9-технологии была создана новая линия мышей с нокаутом гена *comt*. Измерение концентрации нейромедиаторов и их метаболитов в стриатуме и префронтальной коре у мышей с нокаутом гена *comt* и мышей дикого типа проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием внутреннего стандарта 2,3-дигидроксибензойной кислоты, не встречающейся в нативной ткани, в концентрации 100 нг/мл. У гомозиготных мышей с нокаутом гена *comt* наблюдалось отсутствие гомованилиновой кислоты — конечного продукта метаболизма дофамина в префронтальной коре и стриатуме, в то время как уровень промежуточного продукта 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты был выше. Уровень норадреналина в префронтальной коре оказался выше, тогда как в стриатуме достоверных различий между нокаутными мышами и мышами дикого типа не обнаружено. Несмотря на соответствующие изменения в метаболитах катехоламинов, концентрации серотонина и дофамина значительно не различались между группами мышей с нокаутом гена *comt* и мышей дикого типа.

Ключевые слова: катехол-О-метилтрансфераза, CRISPR/Cas-технология, нокаутирование гена, дофамин, норадреналин

Благодарности. Работа выполнена при поддержке СПбГУ, проект ID 95445540 (121082000087-7). Секвенирование проводилось в РЦ РМИКТ Научного Парка СПбГУ.

Для цитирования: Ахмаров И.И., Кириллов О.А., Чиринскайте А.В., Городилова Е.Ю., Сопова Ю.В., Леонова Е.И. Изменение метаболизма катехоламинов в мозге у мышей с дефицитом катехол-О-метилтрансферазы. Лабораторные животные для научных исследований. 2024; 4. 4–13. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2024-04-01>.

Original article

Changes in brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase-deficient mice

I.I. Akhmarov¹, O.A. Kirillov¹, A.V. Chirinskaite¹, E.Yu. Gorodilova², J.V. Sopova¹, *¹

¹ The center for transgenesis and genome editing, Saint Petersburg state university, St. Petersburg, Russia

² Research Resource Center for Molecular and Cell Technologies, Saint Petersburg state university, St. Petersburg, Russia

* E-mail: e.leonova@spbu.ru

Abstract. Catechol-O-methyltransferase (COMT) is one of the main mammalian enzymes involved in the metabolism of catecholamines such as dopamine and norepinephrine. Catecholamine metabolism is important for regulating normal functioning of the nervous system, including emotions and stress responses. COMT

© Ахмаров И.И., Кириллов О.А., Чиринскайте А.В., Городилова Е.Ю., Сопова Ю.В., Леонова Е.И., 2024

activity in the nervous system allows animals with an inactive *comt* gene to be used as a model for studying mental disorders.

We created a new line of mice with a knockout of the *comt* gene using CRISPR/Cas9 technology. The concentration of neurotransmitters and their metabolites in the striatum and prefrontal cortex of *comt* knockout and wild-type mice was measured by high-performance liquid chromatography using an internal standard 2,3-dihydroxybenzoic acid, which is not found in native tissue, at a concentration of 100 ng/ml. Homozygous *comt* knockout mice were found to have a lack of homovanillic acid, the end product of dopamine metabolism, in the prefrontal cortex and striatum, while levels of the intermediate product 3,4-dihydroxyphenylacetic acid were increased. Norepinephrine levels were increased in the prefrontal cortex of *comt* knockout mice, while no significant differences were found in the striatum between *comt* knockout and wild-type mice. Despite corresponding changes in catecholamine metabolites, serotonin and dopamine concentrations were not significantly different between *comt* knockout and wild-type mice.

Keywords: Catechol-*O*-methyltransferase, CRISPR/Cas technology, gene knockout, dopamine, norepinephrine

Acknowledgements. This work was supported by a St. Petersburg State University grant for the development of scientific research [ID 95445540 (121082000087-7)]. The sequencing was carried out at the Research Resource Center for Molecular and Cell Technologies scientific park of St. Petersburg state university.

For citation: Akhmarov I.I., Kirillov O.A., Chirinskaite A.V., Gorodilova E.Yu., Sopova J.V., Leonova E.I. Changes in brain catecholamine metabolism in catechol-*O*-methyltransferase-deficient mice. *Laboratory Animals for Science*. 2024; 4. 4–13. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2024-04-01>.

Введение

Катехол-*O*-метилтрансфераза (КОМТ) — фермент, катализирующий перенос метильной группы от *S*-аденозил-*L*-метионина к гидроксильной группе катехолового субстрата, такой как дофамин, норадреналин, тирозин, катехол-эстроген [1, 2]. Этот процесс помогает поддерживать баланс нейротрансмиттеров в мозге и других тканях, что важно для правильного функционирования нервной системы, регуляции настроения и реакции на стресс [3–6].

Изменения в метаболизме катехоламинов были использованы в качестве гипотезы для объяснения наиболее тяжелых нервно-психических синдромов.

В организме млекопитающих КОМТ существует в двух формах — растворимая (Р-КОМТ — 222 а.о. у мышей) и мембраносвязанная (МС-КОМТ — 256 а.о. у мышей) [7]. Обе изоформы кодируются одним геном *comt*, однако экспрессируются под контролем разных промоторов, P1 и P2 [8], при этом их активные центры имеют одинаковые аминокислотные последовательности. Обе формы представляют собой строго внутриклеточные ферменты [9], продуцирующиеся во всех тканях, но более высокая ферментативная активность МС-КОМТ характерна для тканей головного мозга, тогда как Р-КОМТ — для печени, почек, эпителия подвздошной кишки [10, 11]. В префронтальной коре КОМТ модулирует уровень дофамина. Поскольку в префронтальной коре наблюдается низкий уровень активности дофаминового транспортера, который отвечает за обратный захват дофамина нервными клетками, предполагается, что большая часть высвободившегося дофамина либо связывается с переносчиком норадреналина, а затем метаболизируется с помощью моноаминоксидазы,

либо попадает в глиальные клетки и постсинаптические нейроны, где метаболизируется с помощью КОМТ [12].

Многие нейроактивные препараты, имеющие структуру катехолов, такие как *L*-допа, также могут быть субстратом для КОМТ. Поэтому при лечении болезни Паркинсона, двигательных расстройств и симптомов паркинсонизма назначают препарат *L*-допа в сочетании с ингибитором КОМТ [13]. Ингибиторы КОМТ также показали эффективность в лечении синдрома беспокойных ног и других неврологических заболеваний [14].

Участие КОМТ в функционировании нервной системы делает животных с дефицитом КОМТ полезной моделью для изучения психических расстройств. Созданные мыши с нокаутом гена *comt* могут предоставить ценную информацию о различных аспектах здоровья, таких как когнитивные функции, тревога, болевая чувствительность и психоз.

Материал и методы

Получение направляющей CRISPR РНК (sgРНК) для гена *comt*

Конструкции направляющей sgРНК для гена *comt* были созданы с использованием стандартных методов молекулярной биологии и биоинформатики. Последовательности направляющих sgРНК для нокаутирования гена *comt* подбирали с помощью программы ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no>). Подбор праймеров для проведения ПЦР (полимеразно-цепной реакции) и секвенирования проводили с помощью программы PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>), все праймеры приведены в таблице 1. Синтез праймеров осуществляли в компании «ООО Бигль», Россия. Все последовательности ДНК, полу-

Таблица 1.
Олигонуклеотиды, использованные в работе

Олигонуклеотид	Последовательность 5'–3'
Cas9 comt sg for	gaaattaatacactcactatagccgggtccacaacctgctcatgttttagagctaga
Cas9 sg rev	aaaagcaccgactcgggtgccactttttcaagttgataacggactagccttattttaactgtctatttctagctctaaaac
Comt seq rev	ggccatgtaccttttgcgtc
Comt for pcr	gttggctgctgtctcattgg
Comt rev pcr	ccgtcacttgcactgctgctg

ченные с помощью ПЦР, были секвенированы в Ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

Для наработки sgРНК к гену *comt* в качестве матрицы использовали синтетическую последовательность ДНК, полученную после отжига частично комплементарных праймеров и последующего синтеза с помощью ДНК-полимеразы Taq (Thermo Fischer Scientific, США). Прямой праймер Cas9 comt sg for содержал промоторную последовательность РНК-полимеразы бактериофага T7, направляющую последовательность к выбранной области ДНК-мишени и консервативную последовательность sgРНК, а обратный праймер Cas9 sg rev имел консервативную последовательность sgРНК. Транскрипцию *in vitro* проводили с использованием T7 РНК полимеразы (Invitrogen, США) в течение 1,5 ч при 37 °С. Для удаления ДНК-матрицы добавляли 2 мкл (2 ед.) ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. ДНКазу I инактивировали нагреванием при 65 °С в течение 10 мин. Выделение и очистку РНК осуществляли с помощью набора MEGAclear™ Transcription Clean-Up (Invitrogen, США).

Лабораторные животные

Мыши дикого типа линии C57BL/6 были получены из Центра коллективного пользования ИПАК РАН (FFSN-2021-0005). Мышей содержали по 3 особи в клетке в конвенциональных условиях (температура 21±1 °С и влажность 40–70%) со свободным доступом к корму и воде согласно санитарно-эпидемиологическим правилам СП 2.2.1.3218–14. В помещениях для содержания и экспериментов с животными имелась приточно-вытяжная вентиляционная установка. Световой режим осуществлялся в 12-часовом автоматическом режиме день–ночь. Все исследования на животных были одобрены этическим комитетом в области исследований на животных в Санкт-Петербургском государственном университете (одобрение № 131-03-5 от 11 октября 2022 г.). Все процедуры строго соответствовали рекомендациям,

изложенным в ГОСТе 33216–2014¹. Операции производили под общей анестезией с использованием внутривенных инъекций смеси золетила 100 (30 мг/кг; Золетил, Virbac Lab, Карпос, Франция) и ксилазина (6 мг/кг; Interchemie Werken de Adelaar, Венрей, Нидерланды).

Получение оплодотворенных яйцеклеток, проведение микроинъекций и подсадка генетически модифицированных оплодотворенных яйцеклеток самкам-реципиентам

Для получения мышей с нокаутом гена *comt* на первом этапе вымывали оплодотворенные яйцеклетки мышей по стандартной методике [15]. Для этого половозрелым самкам мышей в возрасте 4–5 нед вводили 7,5 ед. гонадотропина сыворотки жеребых кобыл и через 46 ч — 7,5 ед. хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). Вымывание зигот из самок-доноров делали через 11–12 ч после спаривания с самцами. Для вымывания использовали культуральную среду Ооклин (ООО «ПанЭко», Россия). Для оплодотворения самок доноров использовали самцов этой же линии. Каждого самца в возрасте от 6 до 14 мес помещали в отдельную клетку, куда подсаживали 1 самку сразу после введения ХГЧ. Микроинъекции в цитоплазму зиготы смеси sgРНК к гену *comt* (20 нг/мкл) и белка Cas9 (40 нг/мкл) проводили с помощью микроинъектора FemtoJet (Eppendorf, Германия). Процедура цитоплазматической микроинъекции подробно описана в работе В. Дое и соавт. [16]. Для этих целей использовали микроскоп Nikon с оптической системой Nikon ДИК (дифференциальный интерференционный контраст), микроманипуляторы TransferMan 4R (Eppendorf, Германия) и микроинъектор Femtojet (Eppendorf, Германия).

Подготовку псевдобеременных самок осуществляли в соответствии с протоколом [17]. В качестве самок-реципиентов была выбрана аутбредная линия CD1. Вазэктомированных самцов линии CD1 в возрасте 3 мес получали с помощью микрохирургической операции согласно протоколу [18]. Самцов предварительно

¹ ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» [GOST 33216–2014 “Rukovodstvo po sodержaniyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila sodержaniya i ukhoda za laboratornymi gryzunami i krolnikami” (In Russ.)].

анестезировали смесью золетил 100/ксилазина. Для получения псевдобеременных самок их ссаживали с вазэктомированными самцами. На следующее утро после спаривания отбирали самок с копулятивными пробками. Оплодотворенные яйцеклетки после микроинъекций генетических конструкций подсаживали в яйцевод псевдобеременных самок линии CD1 с помощью микрохирургических операций. Самки были предварительно анестезированы смесью золетил 100/ксилазина. Рожденные в результате этого эксперимента детеныши (поколение F0) были генотипированы с помощью ПЦР и секвенированы.

Генотипирование полученных мышей и получение мышей, гомозиготных по нокауту гена *comt*

Геномную ДНК из образцов ткани мышей выделяли методом щелочного лизиса согласно протоколу [19] и анализировали с помощью ПЦР с праймерами, перечисленными в таблице 1. Анализ хроматограмм секвенирования проводили с использованием компьютерной программы Synthego (<https://www.synthego.com>). Далее, на основании секвенирования ДНК целевого фрагмента ДНК детенышей F0 мышей, выявляли мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания.

Выведение линейных гетерозиготных мышей из поколения F0 осуществляли путем их скрещивания с мышами C57Black дикого типа. Затем гетерозиготы скрещивали для получения гомозигот. Далее для избавления от потенциальных оффтаргетов проводили 6 обратных скрещиваний гомозигот с мышами C57Black дикого типа. Каждое обратное скрещивание включало последовательное скрещивание гомозиготных мышей с мышами C57BL/6 дикого типа и последующее скрещивание полученных гетерозигот между собой для получения гомозигот.

Исследование уровня моноаминов в мозге с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для проведения эксперимента были отобраны 2 группы мышей: контрольная и опытная. Контрольная группа состояла из мышей линии C57BL/6 дикого типа (6 самок и 6 самцов в возрасте 4 мес), опытная группа — из мышей полученной линии СОМТ-КО (6 самок и 6 самцов в возрасте 4 мес). У каждого животного были взяты образцы тканей мозга для анализа моноаминов и их метаболитов. Диссекцию полосатого тела и лобной коры проводили на льду, мышей предварительно подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации. Выделенные образцы сразу переносили в жидкий азот и хранили при -80°C до анализа. Тканевый серотонин (5-НТ), дофамин (ДА), норадреналин (НА) и их метаболиты: 5-гидроксииндолуксусную кислоту (5-ОИУК), 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (ДОФУК) и гомованилино-

вую кислоту (ГВК) анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по методике, изложенной в работе [20]. Образцы тканей гомогенизировали в 0,1 М HClO_4 , содержащем 2,3-дигидроксибензойную кислоту (ДГБА) в концентрации 100 нг/мл (внутренний стандарт). Гомогенизацию проводили с помощью ультразвукового аппарата Q125 (Qsonica, США), затем центрифугировали (10 мин, 4°C ; 14 000 g) и фильтровали с использованием центрифужных фильтровальных установок с мембраной из поливинилиденфторида (ПВДФ) (размер пор 0,22 мкм, Millipore, Берлингтон, Массачусетс, США). Измерения моноаминов проводили с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектированием (Eicom, НТЕС-500, Япония) и с использованием графитового электрода WE-3G (Eicom, Япония) с приложенным потенциалом +650 мВ. Разделение проводили на обращенно-фазовой колонке CA-50DS (150×2,1 мм, диаметр пор 5 мкм, Eicom, Япония) при скорости потока 200 мкл/мин. Состав подвижной фазы на 1 л раствора: Na_2HPO_4 1,376 г, NaH_2PO_4 14,9 г, октилсульфонат натрия 400 мг, ЭДТА 50 мг, метанол 18%; pH 4,35. Измерение содержания моноаминов и их метаболитов в структурах мозга проводили с использованием внутреннего стандарта ДГБА (вещество катехоламиновой природы, не обнаруживаемое в нативной ткани) в концентрации 100 нг/мл.

Для расчета содержания моноаминов и их метаболитов использовали коэффициент отклика (КО), который рассчитывали так:

$$\text{КО} = \frac{\text{площадь пика внутреннего стандарта}}{\text{площадь пика стандарта}} \times \text{концентрацию стандарта.}$$

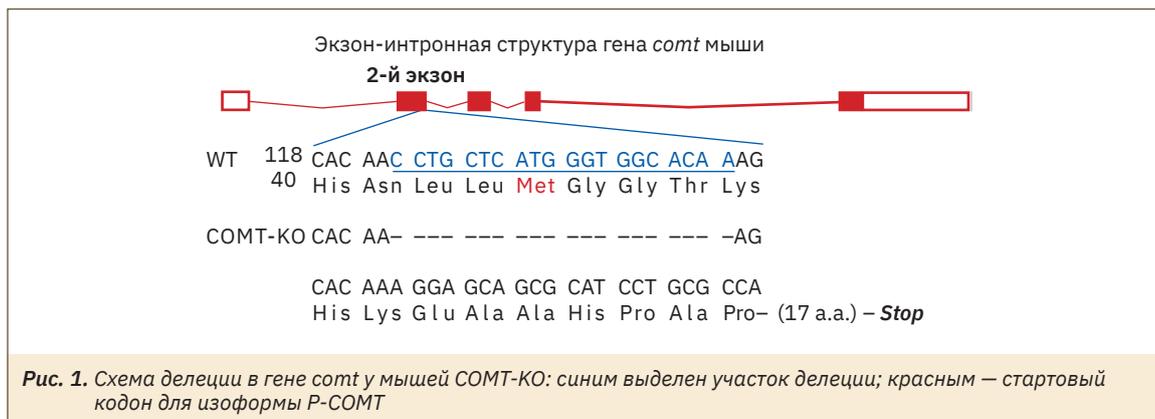
Концентрацию вещества в пробе (КВП) определяли следующим образом:

$$\text{КВП} = \frac{\text{площадь пика вещества в пробе}}{\text{площадь пика внутреннего стандарта в пробе}} \times \text{КО.}$$

Статистический анализ проводили при помощи критерия Манна—Уитни для сравнения значений между группами с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Нормализацию пиков выполняли по внутреннему стандарту — 2,3-дигидроксибензойной кислоте, а конечные значения моноаминов и метаболитов выражали в нанограммах на миллиграмм массы влажной ткани.

Результаты и обсуждение

У полученной линии мышей полностью отсутствовали обе формы КОМТ, так как полученная



делеция со сдвигом рамки считывания возникла в первом кодирующем экзоне в районе второго стартового кодона, с которого начинается трансляция P-COMT (рис. 1).

Оценка уровня ДА в префронтальной коре мышей с помощью ВЭЖХ не выявила существенных различий между самцами и самками. Однако при исследовании стриатума было обнаружено, что уровень ДА варьирует в ши-

роком диапазоне как у самок дикого типа (WT), так и у самок COMT-KO. Эту изменчивость потенциально можно объяснить тем, что самки находились на разных стадиях эстрального цикла. Ранее было показано, что самый высокий уровень ДА наблюдается во время проэструса и эструса, а более низкие уровни — во время метэструса и диэструса [21]. Наши исследования выявили значительные ген-

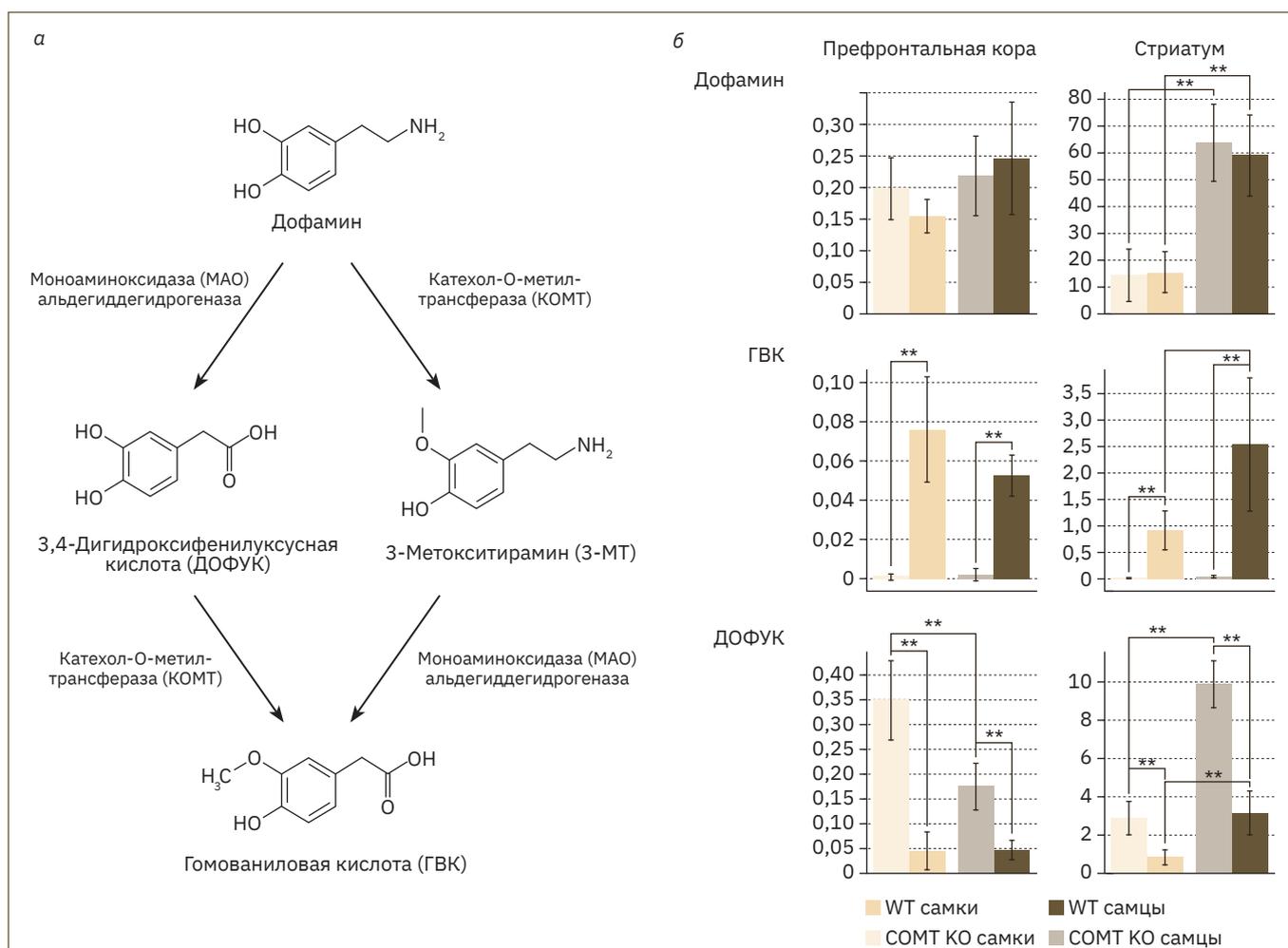
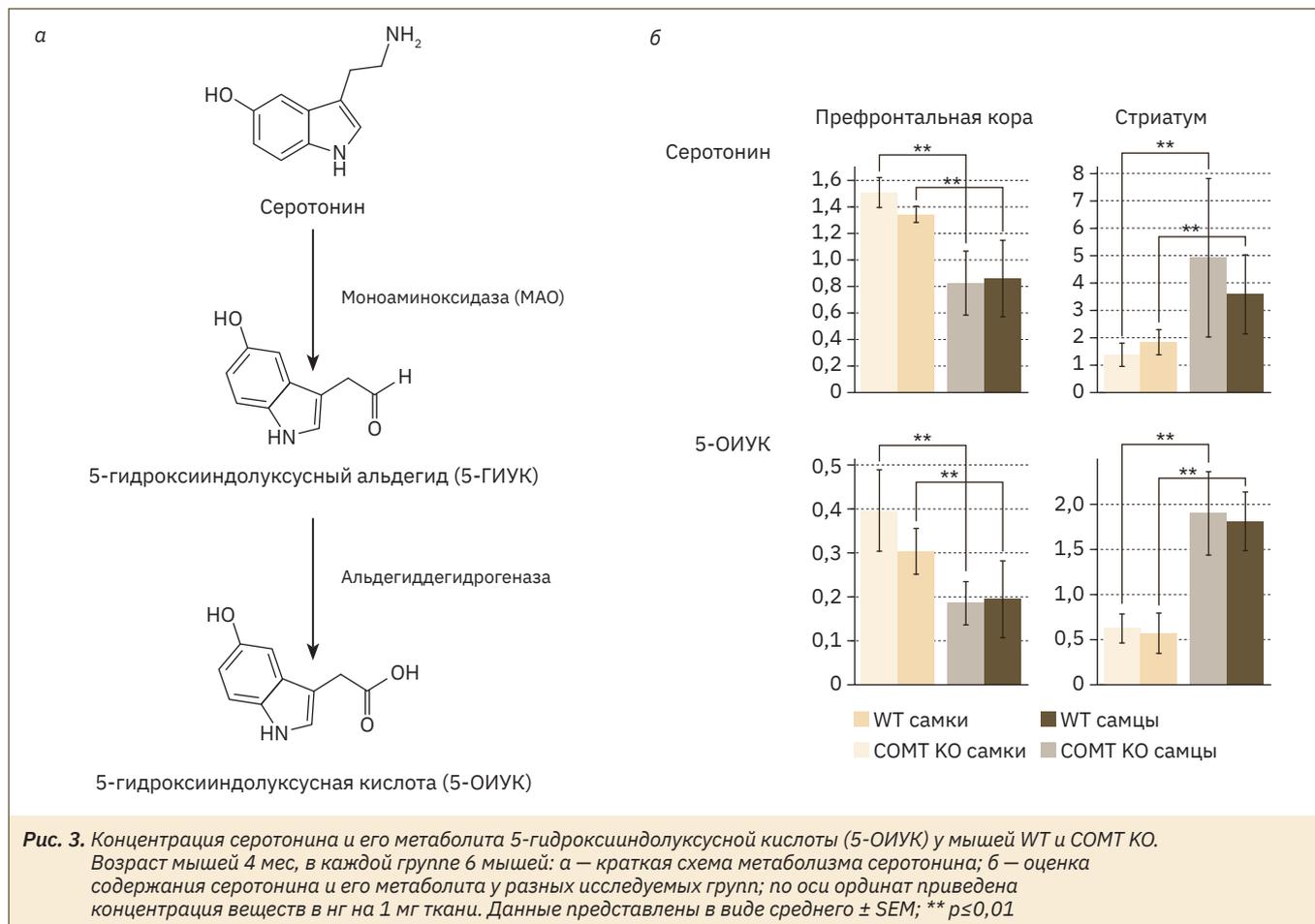


Рис. 2. Концентрация дофамина и его метаболитов: 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК). Возраст мышей в каждой группе 4 мес, в каждой группе 6 мышей: а — краткая схема метаболизма дофамина; б — оценка содержания дофамина и его метаболитов у разных исследуемых групп; по оси ординат приведена концентрация веществ в нг на 1 мг ткани. Данные представлены в виде среднего ± SEM; ** $p < 0,01$



дерные различия по уровню ДА в стриатуме, но не в префронтальной коре. Самцы дикого типа (WT) и самцы COMT KO демонстрировали значительно более высокие уровни ДА по сравнению с самками (WT) и самками COMT KO соответственно (рис. 2).

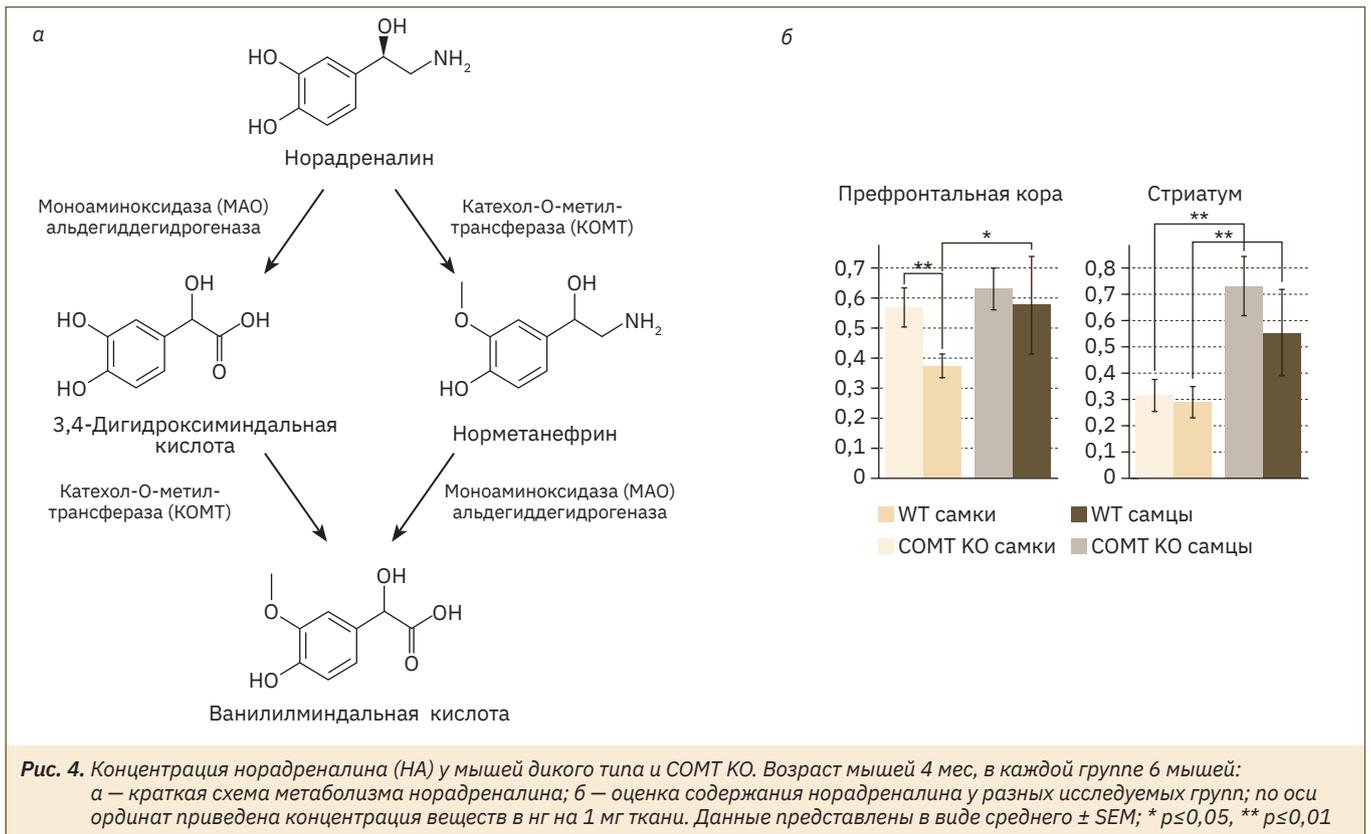
Согласно нашим результатам, уровень 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) — ключевого метаболита дофамина, продуцируемого моноаминоксидазой (MAO), был выше в префронтальной коре и в стриатуме у мышей COMT KO по сравнению с мышами дикого типа (см. рис. 2). Интересно, что у мышей COMT KO были отмечены гендерные различия: более высокие уровни ДОФУК наблюдались у самок в префронтальной коре, а более высокие уровни ДОФУК — у самцов в стриатуме (см. рис. 2, б).

Гомованилиновая кислота (ГВК), продукт метаболита ДОФУК, продуцируемого ферментом КОМТ, присутствовала лишь в некоторых пробах в следовом количестве у мышей COMT KO. При этом различие между самцами и самками мышей дикого типа наблюдалось только в стриатуме, где у самцов уровень ГВК был выше, чем у самок (см. рис. 2).

Полученные результаты подтверждают отсутствие активности КОМТ у нокаутных мышей. Хорошо известно, что ферменты MAO и КОМТ играют решающую роль в поэтапном

расщеплении ДА. В частности, MAO катализирует окислительное дезаминирование аминоксислоты ДА с образованием ДОФУК, тогда как КОМТ катализирует перенос метильной группы от S-аденозил-L-метионина к гидроксильной группе ДА с образованием 3-метокситирамина [22–24]. Конечным продуктом деградации ДА является ГВК, которая производится посредством либо MAO с использованием 3-метокситирамина в качестве субстрата, либо КОМТ при метаболизме ДОФУК [25]. Следовательно, удаление фермента КОМТ у полученных нокаутных мышей приводило к накоплению ДОФУК и отсутствию ГВК (см. рис. 2, а). Гендерные отличия по уровню ДОФУК у мышей COMT KO можно объяснить тем, что в префронтальной коре активность фермента MAO у самок выше по сравнению с самцами, и наоборот, в стриатуме активность фермента MAO выше у самцов.

Наши исследования не выявили отличий в уровне серотонина (5-HT) и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) между группами мышей WT и COMT KO (рис. 3). В то же время гендерные отличия были характерны как для мышей COMT KO, так и для мышей дикого типа и в префронтальной коре, и стриатуме. В частности, у самок обеих групп уровень серотонина в префронтальной коре был выше, чем у самцов. В стриатуме, наоборот,



уровень серотонина у самцов WT и COMT KO был выше по сравнению с самками. Что касается 5-ОИУК, то гендерные отличия также наблюдались и в опытной, и контрольной группах. У самок WT/COMT KO уровень 5-ОИУК в префронтальной коре был выше, чем у самцов WT/COMT KO. В стриатуме, наоборот, у самцов WT/COMT KO уровень 5-ОИУК был выше по сравнению с самками WT/COMT KO (рис. 4). Кроме того, гендерные различия в уровне серотонина и 5-ОИУК можно объяснить различиями в активности фермента MAO у самцов и самок. В частности, у самок наблюдалась более высокая активность фермента MAO в префронтальной коре, тогда как у самцов была более высокая активность в стриатуме. Эти результаты согласуются с полученными данными об уровне ДА (см. рис. 2).

Наш анализ выявил половые различия в содержании норадреналина (НА) в префронтальной коре у мышей дикого типа. У самцов WT уровень НА был незначительно выше по сравнению с самками WT, при этом уровень НА между самцами WT и COMT KO не отличался. У самок COMT KO, наоборот, уровень НА был значительно выше, чем у самок WT и не отличался от самцов COMT KO (см. рис. 4).

По содержанию НА в стриатуме не выявлено статистических различий между самками и самцами WT/COMT KO. Однако наблюдались гендерные различия в концентрации НА в группах WT и COMT KO — у самцов отмечался более высокий уровень НА по сравнению с самками (см. рис. 4). Эти результаты могут объ-

ясняться тем, что активность фермента MAO в стриатуме у самцов COMT KO ниже, по сравнению с самками COMT KO, а в префронтальной коре, наоборот, выше, чем у самок COMT KO.

Заключение

В качестве первого шага к пониманию влияния отсутствия КОМТ на метаболизм различных нейромедиаторов было проведено сравнение уровней дофамина и его метаболита ДОФУК и ГВК, серотонина и его метаболита 5-ОИУК в префронтальной коре и стриатуме головного мозга нокаутных мышей COMT KO и мышей дикого типа. У полученной новой генетически модифицированной линии мышей во всех исследованных областях мозга полностью отсутствует ГВК, при этом повышен уровень ДОФУК, что является прямым доказательством отсутствия активности двух форм фермента КОМТ. В отличие от ранее опубликованных результатов, полученных у мышей с нокаутом гена *comt* за счет интеграции неомицинположительной кассеты на сложном генетическом бэкграунде, у которых наблюдалось 2–3-кратное увеличение уровня дофамина в стриатуме у самцов COMT KO по сравнению с самцами дикого типа [26], по данным нашего исследования, уровень дофамина в стриатуме у нокаутных мышей (6 самок + 6 самцов в группе) не отличался от такового у контрольных групп (6 самок + 6 самцов в группе). Уровень норадреналина в префронтальной коре у самок COMT KO был незначительно выше, чем у самок дикого

типа, что также противоречило данным, полученным группой [26], согласно которым уровень норадреналина у самок COMT KO был ниже, чем у самок дикого типа. Мы предполагаем, что расхождения в результатах частично могут быть связаны с методами, использованными для создания нокаутных мышей. В ранее полученной модели [26] нокаут гена *comt* был получен путем интеграции генетической конструкции, содержащей неомицинположительную селективную кассету (Neo). Исследования показали, что экспрессия гена *Neo* может влиять на экспрессию соседних генов, потенциально искажая данные, полученные от нокаутных мышей [27]. Также свой вклад в несоответствие полученных результатов литературным данным может внести различный бэкграунд мышей, взятых в эксперимент. Мы получили нокаутную линию мышей COMT-KO путем прямого редактирования зигот мышей линии C57Bl/6. Для создания нокаутных мышей, использованных в ранее опубликованных работах [26], использовали 3 разных линии мышей, включая линию 129. В нашей работе применили CRISPR/Cas9-технологии, тогда как для ранее полученной нокаутной линии была использована технология внедрения модифицированных стволовых клеток в бластоцисту. Традиционно эмбриональные стволовые клетки для создания генетически измененных моделей мышей получали, используя мышей линии 129 [28]. Позднее сравнение генетического бэкграунда и экспрессии различных генов у линий 129 и C57Bl/6 выявило ряд различий [29, 30], что может сказаться на фенотипах получаемых мышей. Несмотря на то что у полученной линии мышей COMT-KO мы не наблюдали выраженных фенотипических проявлений, предполагаем, что при скрещивании с другими нокаутными линиями, в частности с линией DAT-KO с дефицитом транспортера дофамина (dopamine transporter, DAT), можно получить модель, полезную для исследования психических расстройств, особенно тех, которые устойчивы к лекарственной терапии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Desbonnet L. Mouse Models of Schizophrenia // Handbook of Behavioral Neuroscience. 2016. Vol. 23. P. 267–284.
- Tiihonen J., Hallikainen T., Lachman H. et al. Association between the functional variant of the catechol-*O*-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism // Mol. Psychiatry. 1999. Vol. 4. N. 3. P. 286–289. DOI: 10.1038/sj.mp.4000509.
- Cuartas Arias J.M., A Palacio Acosta C., Valencia J.G. et al. Exploring epistasis in candidate genes for antisocial personality disorder // Psychiatric Genetics. 2011. Vol. 21 N. 3. P. 115–124. DOI: 10.1097/YPG.0b013e3283437175.
- Jones G., Zammit S., Norton N. et al. Aggressive behaviour in patients with schizophrenia is associated with catechol-*O*-methyltransferase genotype // Br. J. Psychiatry. 2001. Vol. 179. N. 4. P. 351–355. DOI: 10.1192/bjp.179.4.351.
- Tosato S., Bonetto C., Di Forti M. et al. Effect of COMT genotype on aggressive behaviour in a community cohort of schizophrenic patients // Neuroscience Letters. 2011. Vol. 495. N. 1. P. 17–21. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.03.018.
- Wang M., Li H., Deater-Deckard K. et al. Interacting Effect of Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT) and Monoamine Oxidase A (MAOA) Gene Polymorphisms, and Stressful Life Events on Aggressive Behavior in Chinese Male Adolescents // Front. Psychol. 2018. Vol. 9. P. 1079. DOI: 10.3389/fpsyg.2018.01079.
- Robinson R.G., Smith S.M., Wolkenberg S.E. et al. Characterization of Non-Nitrocatechol Pan and Isoform Specific Catechol-*O*-methyltransferase Inhibitors and Substrates // ACS Chem. Neurosci. 2012. Vol. 3. N. 2. P. 129–140. DOI: 10.1021/cn200109w.
- Tenhunen J., Salminen M., Lundström K. et al. Genomic organization of the human catechol *O*-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters // European Journal of Biochemistry. 1994. Vol. 223. N. 3. P. 1049–1059. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb19083.x.
- Ulmanen I., Peränen J., Tenhunen J. et al. Expression and Intracellular Localization of Catechol *O*-methyltransferase in Transfected Mammalian Cells // European Journal of Biochemistry. 1997. Vol. 243. N. 1–2. P. 452–459. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.0452a.x.
- Jalkanen A., Lasssheikki V., Torsti T. et al. Tissue and interspecies comparison of catechol-*O*-methyltransferase mediated catalysis of 6-*O*-methylation of esculetin to scopoletin and its inhibition by entacapone and tolcapone // Xenobiotica. 2021. Vol. 51. N. 3. P. 268–278. DOI: 10.1080/00498254.2020.1853850.
- Myöhänen T.T., Schendzielorz N., Männistö P.T. Distribution of catechol-*O*-methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice // Journal of Neurochemistry. 2010. Vol. 113. N. 6. P. 1632–1643.
- Käenmäki M., Tammimäki A., Myöhänen T. et al. Quantitative role of COMT in dopamine clearance in the prefrontal cortex of freely moving mice // Journal of Neurochemistry. 2010. Vol. 114. N. 6. P. 1745–1755. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06889.x.
- Rivest J., Barclay C.L., Suchowersky O. COMT Inhibitors in Parkinson's Disease // Can. J. Neurol. Sci. 1999. Vol. 26. N. 2. P. S34–S38.
- Byrne R., Sinha S., Chaudhuri K.R. Restless legs syndrome: diagnosis and review of management options // Neuropsychiatric Disease and Treatment. 2006. Vol. 2. N. 2. P. 155–164.
- Litscher E.S., Wassarman P.M. Isolation and Manipulation of Mouse Gametes and Embryos // Methods in Enzymology. Elsevier. 2010. Vol. 476. P. 73–84.
- Doe B., Brown E., Boroviak K. Generating CRISPR/Cas9-Derived Mutant Mice by Zygote Cytoplasmic Injection Using an Automatic Microinjector // MPs. 2018. Vol. 1. N. 1. P. 5.
- Hasegawa A., Mochida K., Ogonuki N. et al. Efficient and scheduled production of pseudopregnant female mice for embryo transfer by estrous cycle synchronization // Journal of Reproduction and Development. 2017. Vol. 63. N. 6. P. 539–545.

18. Preece C., Alghadban S., Bouchareb A. et al. Replacement of surgical vasectomy through the use of wild-type sterile hybrids // *Lab. Anim.* 2021. Vol. 50. N. 6. P. 49–52. DOI: 10.1038/s41684-020-00692-w.
19. Truett G.E., Heeger P., Mynatt R.L. et al. Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT) // *BioTechniques*. 2000. Vol. 29. N. 1. P. 52–54. DOI: 10.2144/00291bm09.
20. Belov D.R., Efimova E.V., Fesenko Z.S. et al. Putative Trace-Amine Associated Receptor 5 (TAAR5) Agonist α -NETA Increases Electrocorticogram Gamma-Rhythm in Freely Moving Rats // *Cell Mol. Neurobiol.* 2020. Vol. 40. N. 2. P. 203–213. DOI: 10.1007/s10571-019-00716-1.
21. Zachry J.E., Nolan S.O., Brady L.J. et al. Sex differences in dopamine release regulation in the striatum // *Neuropsychopharmacol.* 2021. Vol. 46. N. 3. P. 491–499. DOI: 10.1038/s41386-020-00915-1.
22. Napolitano A., Cesura A.M., Da Prada M. The role of monoamine oxidase and catechol O-methyltransferase in dopaminergic neurotransmission // *J. Neural Transm. Suppl.* 1995. Vol. 45. P. 35–45.
23. Finberg J.P.M. Inhibitors of MAO-B and COMT: their effects on brain dopamine levels and uses in Parkinson's disease // *J. Neural Transm.* 2019. Vol. 126. N. 4. P. 433–448.
24. Norton N., Kirov G., Zammit S. Schizophrenia and functional polymorphisms in the MAOA and COMT genes: No evidence for association or epistasis // *Am. J. Med. Genet.* 2002. Vol. 114. N. 5. P. 491–496. DOI: 10.1002/ajmg.10517.
25. Muñoz P., Huenchuguala S., Paris I. et al. Dopamine Oxidation and Autophagy // *Parkinson's Disease*. 2012. Vol. 2012. P. 1–13. DOI: 10.1155/2012/920953.
26. Gogos J.A., Morgan M., Luine V. et al. Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. Vol. 95. N. 17. P. 9991–9996. DOI: 10.1073/pnas.95.17.9991.
27. Jin C., Kang H., Yoo T. et al. The Neomycin Resistance Cassette in the Targeted Allele of Shank3B Knock-Out Mice Has Potential Off-Target Effects to Produce an Unusual Shank3 Isoform // *Front. Mol. Neurosci.* 2021. Vol. 13. P. 614435. DOI: 10.3389/fnmol.2020.614435.
28. Keskinetepe L., Norris K., Pacholczyk G. et al. Derivation and comparison of C57BL/6 embryonic stem cells to a widely used 129 embryonic stem cell line // *Transgenic Res.* 2007. Vol. 16. N. 6. P. 751–758.
29. Clough B., Finethy R., Khan R.T. et al. C57BL/6 and 129 inbred mouse strains differ in Gbp2 and Gbp2b expression in response to inflammatory stimuli *in vivo* // *Wellcome Open Res.* 2019. Vol. 4. P. 124. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.15329.1.
30. Sandberg R., Yasuda R., Pankratz D.G. et al. Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. Vol. 97. N. 20. P. 11038–11043. DOI: 10.1073/pnas.97.20.11038.

Информация об авторах

И.И. Ахмаров¹, лаборант-исследователь
Центра трансгеноза и редактирования генома,
<https://orcid.org/0009-0008-8920-6705>

О.А. Кириллов¹, лаборант-исследователь
Центра трансгеноза и редактирования генома,
<https://orcid.org/0009-0004-3400-6678>

А.В. Чиринская¹, младший научный сотрудник
Центра трансгеноза и редактирования генома,
<https://orcid.org/0000-0002-7466-0680>

Е.Ю. Городилова², специалист
ресурсного центра «Развитие молекулярных
и клеточных технологий»

Ю.В. Сопова¹, ведущий научный сотрудник
Центра трансгеноза и редактирования генома,
<https://orcid.org/0000-0002-7825-273X>

Е.И. Леонова¹, директор Центра трансгеноза
и редактирования генома, e.leonova@spbu.ru,
<https://orcid.org/0000-0002-0236-3302>

¹ Центр трансгеноза и редактирования генома,
Санкт-Петербургский
государственный университет,
199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., д. 7–9.

² Ресурсный центр «Развитие молекулярных
и клеточных технологий», Санкт-Петербургский
государственный университет,
199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., д. 7–9.

Information about the authors

I.I. Akhmarov¹, research assistant at the center
for transgenesis and genome editing,
<https://orcid.org/0009-0008-8920-6705>

O.A. Kirillov¹, research assistant at the center
for transgenesis and genome editing,
<https://orcid.org/0009-0004-3400-6678>

A.V. Chirinskaite¹, junior Researcher at the center
for transgenesis and genome editing,
<https://orcid.org/0000-0002-7466-0680>

E.Yu. Gorodilova², resource center specialist

J.V. Sopova¹, PhD, Leading Researcher at the center
for transgenesis and genome editing,
<https://orcid.org/0000-0002-7825-273X>

E.I. Leonova¹, PhD, Head of the center
for transgenesis and genome editing,
e.leonova@spbu.ru,
<https://orcid.org/0000-0002-0236-3302>

¹ The center for transgenesis and genome editing,
Saint Petersburg state university,
199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab. 7–9.

² Research Resource Center for Molecular and Cell
Technologies, Saint Petersburg state university,
199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab. 7–9.

Вклад авторов в написание статьи

И.И. Ахмаров — исследование уровня моноаминов в мозге с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, подготовка рисунков.

О.А. Кириллов — пробоподготовка образцов мозга мышей, генотипирование мышей.

А.В. Чиринскайте — подбор последовательностей и синтез направляющей РНК, подготовка смеси для микроинъекций, подбор условий для генотипирования мышей.

Е.Ю. Городилова — проведение секвенирования.

Ю.В. Сопова — планирование экспериментов, написание публикации.

Е.И. Леонова — проведение микроинъекций, подсадки эмбрионов, вазектомии, концепция статьи и дизайн экспериментов.

Сведения о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дата поступления рукописи
в редакцию: 18.06.2024

Дата рецензии статьи: 12.09.2024

Дата принятия статьи к публикации: 11.10.2024

Authors contribution

I.I. Akhmarov — study of the level of monoamines in the brain using high-performance liquid chromatography, preparation of drawings.

O.A. Kirillov — sample preparation of mouse brain samples, genotyping of mice.

A.V. Chirinskaite — sequence selection and synthesis of guide RNA, preparation of a mixture for mice genotyping, guide RNA, preparation of mixture for microinjections, selection of conditions for the genotyping of mice.

E.Yu. Gorodilova — sequencing.

Y.V. Sopova — planning of experiments, writing a publication.

E.I. Leonova — performing microinjections, embryo transfer, vasectomy, concept of the article and design of experiments.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Received: 18.06.2024

Reviewed: 12.09.2024

Accepted for publication: 11.10.2024