

УДК 577.25

ВЛИЯНИЕ НОКДАУНА *Cc2d1a*/Freud-1 В ГИППОКАМПЕ У МЫШЕЙ ЛИНИИ ВТВР НА АУТИСТИЧЕСКИ-ПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ, СЕРТОНИНОВЫЕ 5-НТ_{1A} И ДОФАМИНОВЫЕ D2-РЕЦЕПТОРЫ, И НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ CREB И NF-κB

© 2022 И.И. Белокопытова, Е.М. Кондаурова, Е.А. Куликова,
Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко*, Н.К. Попова

ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: nauменко2002@mail.ru

Поступила в редакцию 24.06.2022

После доработки 29.07.2022

Принята к публикации 24.08.2022

Механизмы возникновения аутизма вызывают чрезвычайный интерес в связи с его высокой распространённостью в человеческой популяции. В этом контексте привлекает внимание транскрипционный фактор Freud-1 (кодируется геном *Cc2d1a*), который регулирует множество внутриклеточных сигнальных путей, является сайленсером 5-НТ_{1A} серотониновых и D2 дофаминовых рецепторов. Нарушение функции Freud-1 приводит к развитию различных психопатологий. В данной работе мы обнаружили повышение экспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе моделирующих аутистически-подобное поведение мышей линии ВТВР по сравнению с мышами линии С57В1/6J и исследовали как влияет нормализация экспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе мышей ВТВР на поведение, 5-НТ_{1A}- и D2-рецепторы и внутриклеточные сигнальные пути Creb и NF-κB. Через 5 недель после введения мышам ВТВР аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), несущего плазмиду рAAV_H1-2_shRNA-Freud-1_Syn_EGFP, кодирующую малую, образующую шпильку РНК, подавляющую экспрессию гена *Cc2d1a*/Freud-1 как на уровне мРНК, так и на уровне белка, было обнаружено усиление тревожности и увеличение времени нахождения платформы и времени, необходимого для преодоления расстояния до платформы, в водном лабиринте Морриса, что, вероятно, связано с усилением стратегии активного избегания стресса. Однако нокдаун *Cc2d1a*/Freud-1 не повлиял на пространственную память и фосфорилирование транскрипционного фактора CREB, хотя такой эффект был обнаружен в нашей предыдущей работе на мышах линии С57В1/6J. Эти результаты позволяют предположить, что у мышей линии ВТВР нарушен CREB-зависимый эффекторный путь, что может играть важную роль в формировании аутистически-подобного фенотипа. Нокдаун *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе мышей ВТВР не повлиял ни на экспрессию 5-НТ_{1A}- и D2-рецепторов, ни на экспрессию ключевых генов NF-κB сигнального пути (*Nfkb1* и *Rela*). Полученные нами данные позволяют заключить, что транскрипционный фактор Freud-1 играет существенную роль в патогенезе тревожности и активного избегания стресса при аутизме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нокдаун *Cc2d1a*/Freud-1, 5-НТ_{1A} серотониновый рецептор, D2 дофаминовый рецептор, CREB, NF-κB, мыши ВТВР, аутистически-подобное поведение.

DOI: 10.31857/S0320972522100165, EDN: KTMQIF

ВВЕДЕНИЕ

Расстройство аутистического спектра (РАС) – широкое понятие, которое используется для обозначения состояния, характеризующего дефицитом социального взаимодействия,

ограниченным повторяющимся поведением разной степени тяжести и, зачастую, нарушениями обучения. Хотя эти признаки и являются основой для диагностики аутизма, но механизмы развития этого состояния остаются неизвестными и, несомненно, сложными.

Принятые сокращения: РАС – расстройство аутистического спектра; AAV – аденоассоциированный вирусный вектор; *Cc2d1a*/Freud-1 – ген *Cc2d1a*, кодирующий транскрипционный фактор Freud-1; EGFP – зелёный флуоресцентный белок; 5-НТ_{1A}-рецепторы – серотониновые рецепторы.

* Адресат для корреспонденции.

Аутизм является одним из самых распространённых заболеваний среди детей. Современные оценки Центров по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) показывают, что 1 из 59 восьмилетних детей страдает аутизмом [1]. У людей с аутизмом наблюдаются изменения в строении и функционировании мозга. Так, например, возможно аномальное увеличение размера мозга, локальные аномалии в распределении серого и белого вещества, уменьшение мозолистого тела [2–5].

Транскрипционный фактор Freud-1 – это эволюционно консервативный белок, кодируемый геном *Cc2d1a* [6]. *Cc2d1a*/Freud-1 играет важную роль в дифференцировке нейронов [7] и независимо регулирует множество внутриклеточных сигнальных путей [8]. *Cc2d1a*/Freud-1 является мощным активатором NF-κB сигнального пути. NF-κB – это семейство факторов транскрипции, регулирующих иммунитет, воспаление и выживаемость клеток [9]. В соответствии с центральной ролью NF-κB-пути в воспалительных реакциях, существуют исследования нейробиологической основы некоторых психопатологий, которые предполагают участие NF-κB в этиологии этих расстройств [10]. Хотя точную патофизиологическую основу аутизма ещё предстоит найти, всё больше данных указывают на критическую роль нейровоспаления в механизме развития этого заболевания [11–14]. Кроме того, *Cc2d1a*/Freud-1 модулирует сигналинг транскрипционного фактора CREB, который связывается с регионом CRE (Ca^{2+} /сАМР-чувствительный элемент) в промоторах генов раннего ответа для их регуляции [8]. Было показано, что CREB регулирует дифференцировку, выживаемость нейронов, синаптическую пластичность и консолидацию памяти [15]. Мутации в гене *Cc2d1a*/Freud-1 связывают с различными психопатологиями, такими как шизофрения, умственная отсталость, социальный дефицит [16]. Исследования влияния сверхэкспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в серотониновых нейронах предполагают, что *Cc2d1a*/Freud-1 играет важную роль в регуляции серотониновых рецепторов (5-НТ_{1А}-рецепторов) при тревожности и депрессии [17]. При этом было показано, что полный нокаут гена *Cc2d1a*/Freud-1 летален [18–20]. Мыши с кондициональным нокаутом *Cc2d1a*/Freud-1 в серотониновых нейронах демонстрируют тревожно-депрессивное поведение, устойчивое к длительному лечению классическим антидепрессантом флуоксетином [21]. Нокаут *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе мышей приводит к выраженному антиде-

прессивному эффекту, сопровождающемуся нарушением пространственной памяти [22].

Нарушения развития нервной системы у людей, страдающих аутизмом, могут быть результатом дефектов нейрональной пластичности и проблем с синаптической передачей сигналов. Некоторые из этих проблем могут быть связаны с аномальными уровнями моноаминов (серотонин, дофамин, адреналин и норадреналин) в разных областях мозга [23]. Теория о связи развития аутизма с серотониновой системой возникла из большого числа противоречивых на сегодняшний момент данных, свидетельствующих об отклонениях в функционировании 5-НТ-системы у людей с аутизмом [24]. Известно, что транскрипционный фактор Freud-1 связывается с сайтами 5'-DRE и 3'-DRE в промоторе гена 5-НТ_{1А}-рецептора и блокирует транскрипцию гена этого рецептора [25]. В гене дофаминового рецептора D2 также были найдены последовательности, высокоомологичные DRE-элементам (D2-DRE). Было показано, что Freud-1 является сайленсером как дофаминовых D2-рецепторов, так и серотониновых 5-НТ_{1А}-рецепторов [26]. Рецепторы D2 играют важную роль в функционировании дофаминовой системы, которая участвует в механизмах мотивации, обучения и в регуляции двигательной активности [27, 28].

Несомненно, для исследования такой сложной психопатологии как аутизм необходимо иметь адекватные модельные объекты для исследований. Наиболее широко используемой на сегодняшний день моделью аутизма являются мыши линии T⁺Itpr^{3^{fl}}/J (BTBR). Эти животные отличаются поведенческими чертами, напоминающими симптомы аутизма у людей. К таким особенностям фенотипа исследователи относят дефицит социального взаимодействия и стереотипно повторяющееся поведение [29]. Кроме поведенческого сходства, мыши линии BTBR имеют нейроанатомические и физиологические черты, характерные для людей, страдающих аутизмом [30–32].

В предварительных исследованиях мы обнаружили повышение экспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе мышей линии BTBR по сравнению с мышами линии C57Bl/6J (рис. 1). На основе известных данных о ключевой роли *Cc2d1a*/Freud-1 в регуляции NF-κB-пути, серотониновой и дофаминовой систем, а также пути CREB можно предположить, что чрезмерная экспрессия гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе может играть значительную роль в формировании аутистически-подобного поведения у мышей BTBR. Для исследования этой гипотезы

тезы мы ввели в гиппокамп мышей ВТВР аденоассоциированный вирусный вектор (AAV), несущий плазмиду, которая кодирует малую образующую шпильку РНК (shRNA) для подавления экспрессии гена *Cc2d1a/Freud-1*. Через 5 недель после введения вектора мы исследовали влияние локального снижения уровня гена *Cc2d1a/Freud-1* в гиппокампе мышей ВТВР на пространственное обучение и память, на стереотипное и социальное поведение, на тревожность и на экспрессию основных генов, регулируемых транскрипционным фактором *Freud-1* (*Htr1a*, *Drd2*, *Creb1*, *Nfkb1*, *Rela*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Первую серию экспериментов проводили на самцах мышей инбредных линий ВТВР и С57В1/6J только для определения уровня мРНК гена *Cc2d1a* в гиппокампе и префронтальной коре. За 46–48 ч до выведения животных из эксперимента мышей линий ВТВР и С57В1/6J рассаживали по индивидуальным вентилируемым клеткам Optimice («Animal Care Systems», США) для снятия групповых эффектов.

Вторую серию экспериментов проводили только на самцах мышей инбредной линии ВТВР. Для тестирования поведения мышей ВТВР (через 5 недель после введения конструктов) за 46–48 ч до поведенческих тестов взвешивали (их средний вес составил ~ 35 г) и рассаживали по индивидуальным вентилируемым клеткам (Optimice, «Animal Care Systems») для снятия групповых эффектов. Оценку поведения проводили во время сумерек и начала ночной фазы (15:00–18:00). Всех животных во всех сериях эксперимента содержали в стандартных условиях SPF-вивария ИЦиГ СО РАН при искусственном 14-часовом освещении, постоянных влажности (60%) и температуре (23 °С) и свободном доступе к сбалансированному корму и воде.

Плазмида. Последовательности shRNA для подавления гена *Cc2d1a*, кодирующего *Freud-1*, были следующими: смысловая – 5'-gatccccagatcacctctgaggctgtcttcaagagagacagcctcagaggtatcttttttttgaaag-3' и антисмысловая – 5'-tcgactttccaaaaaagatcacctctgaggctgtctctctgaagacagcctcagaggtatctggg-3'.

Двухцепочечный олигонуклеотид был вставлен в вектор pAAV-Syn (0.5)-EGFP-H1-2 по сайтам эндонуклеаз рестрикции BglII и SalI под контроль промотора H1 [33]. Полученный вектор также содержал зелёный флуоресцентный белок (EGFP; плазмида, несущая ген *egfp*,

получена от профессора Е.Г. Понимаскина (МНН, Ганновер, Германия)) для контроля эффективности экспрессии плазмиды. Все этапы клонирования были проверены секвенированием по Сэнгеру. Плазмида, кодирующая случайную shRNA (не имеющая сродства к геному мыши), была получена от профессора Е.Г. Понимаскина. Оба аденоассоциированных вектора использовали промотор H1 как для экспрессии shRNA-Freud-1 в опытной группе животных, так и для случайной shRNA – в контрольной группе, в то время как EGFP находился под контролем синапсного промотора.

Клеточная культура и трансфекция клеток. Клетки HEK293FT субкультивировали в среде Eagle's medium с модификацией Dulbecco's (DMEM) («Sigma», США), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Gibco», США), 1% Gluta MAX («Gibco») и 1% пенициллина-стрептомицина («Gibco»). Клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Каждые 2–3 дня (при достижении 70% конфлюэнтности) клетки разделяли и меняли среду. Клетки HEK293FT трансфицировали плазмидами с использованием полиэтиленимина (PEI; «Polysciences», США), следуя инструкциям производителя.

Получение аденоассоциированного вируса. Упаковку pAAV_SynH1-2_shRNA-Freud-1_Syn-EGFP или плазмиды, несущей случайную контрольную РНК, в аденоассоциированные вирусные капсиды выполняли путём котрансфекции плазмидами AAV-DJ и pHelper («Cell Biolabs, Inc.», США) в клетки HEK293FT [33]. Вирусные частицы собирали через 48 ч в соответствии с протоколом, описанным в 2003 г. Grimm et al. [34]. Количество полученных вирусных частиц определяли при проведении количественного ПЦР-анализа в реальном времени с праймерами (F: 5'-cctggtgctgtctcttatgagg-3'; R: 5'-tgacagtggtggcaatgc-3'). Серию разведенной исходной плазмиды известной концентрации использовали в качестве стандарта для определения количества вирусных частиц. Оба вектора, использованные в этом исследовании, показали сходные геномные титры (10⁹ вирусных частиц/мкл).

Стереотаксическая инъекция в гиппокамп. Для наркотизации животных использовали 400 мкл смеси (1/1) 2,2,2-трибромэтанола («Sigma») и 2-метил-2-бутанола («Sigma»), кожу на голове вскрывали, после этого мышей помещали в стереотаксическую рамку («TSE Systems», Германия). Затем в черепе делали 4 отверстия согласно координатам (AP: –1 мм, L: ± 1 мм, DV: 2,5 мм и AP: –2 мм, L: ± 2 мм, DV: 1,5 мм) [35]. Вирусные частицы, несущие

pAAV_SynH1-2_shRNA-Freud-1_Syn_EGFP (группа «опыт»), медленно вводили по 1 мкл в каждый гиппокамп с помощью шприца Гамильтона со скоростью 0,1 мкл/мин в течение 10 мин. После инъекции иглу удерживали в месте укола ещё 2 мин, чтобы минимизировать вытекание вирусной суспензии при извлечении иглы. В качестве контроля вводили таким же образом AAV, несущий случайную shRNA, не имеющую сродства к геному мыши (группа «контроль»). После двустороннего введения вирусных частиц разрез зашивали прерывистыми швами шёлковыми нитями, а животное помещали в клетку с подогревом до пробуждения от наркоза.

Через 5 недель мы проводили тестирование поведения (тесты «закапывание шариков», «водный лабиринт Морриса», «трёхкамерный социальный тест» и «приподнятый крестообразный лабиринт»). Все тесты, кроме теста закапывания шариков, были проведены с использованием видеосъемки и алгоритмов программного обеспечения Ethostudio, разработанных в нашей лаборатории [36]. Затем были выделены образцы гиппокампа и префронтальной коры для ОТ-ПЦР в реальном времени и Вестерн-блот-анализа. Количество протестированных животных: в опытной группе $n = 12$, в контрольной — $n = 13$.

Тест закапывание шариков. Восемнадцать шариков из стекла ($d = 1$ см) помещали на слой опилок толщиной 4 см в клетку Optimise. Мышь помещали в клетку с шариками на 30 мин. Спустя необходимое время мышь убирала и подсчитывали количество шариков. Шарик рассматривался как закопанный, если опилки покрывали его более чем на две трети.

Водный лабиринт Морриса. Эксперимент проводили, как было описано ранее [37]. Использовали круглый пластиковый матовый резервуар ($d = 100$ см и $h = 40$ см) белого цвета с полупрозрачным дном. Для наблюдения за животными использовалась методика проходящего освещения [38]. С помощью обезжиренного сухого молока воду ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) делали непрозрачной. Поверхность воды была разделена на 4 сектора. В центре одного из секторов была расположена стеклянная платформа ($d = 5$ см и $h = 14,5$ см) на 1,0 см ниже уровня жидкости. На ближайшей к платформе стенке резервуара помещали черный треугольник (ближний ориентир). В течение 4-х дней мыши имели по 3 попытки в день для обучения находить скрытую платформу. Во время обучения мышь последовательно опускали в секторы на 60 с (перерыв между попытками — 15 с). Если мышь не смогла сама найти платформу, то её помещали на плат-

форму на 15 с. Во время учебных попыток измеряли следующие параметры: время достижения цели (с), длина пути к платформе (м) и кумулятивная дистанция — суммарное расстояние от животного до платформы (м). Далее, исходя из данных за 4 дня, были рассчитаны средние значения параметров.

На 5-й день платформа из резервуара была убрана, а мышь выпускали в центре резервуара. Мышам были предоставлены три попытки по 60 с, разделённые 15-секундными перерывами, при этом измеряли время в целевом секторе (%). Далее были рассчитаны средние значения для трёх испытаний.

Трёхкамерный социальный тест. Установка для тестирования представляла собой ящик, состоящий из двух боковых и одной центральной камеры с переходами между отсеками. На 1-м этапе тестирования животному предоставляли возможность ознакомиться со всеми камерами; на 2-м этапе в один из боковых отсеков помещали клетку с другим самцом, а в другой — клетку с неживым объектом (пластиковый кубик 4×4 см). Длительность каждого этапа составляла 10 мин. На 2-м этапе фиксировали время нахождения (с) около пустой клетки и около клетки с другим самцом мыши.

Приподнятый крестообразный лабиринт. Тест проводился в установке из серого пластика, у которой было две закрытых и две открытых части (длина — 30 см; ширина — 5 см). Закрытые части обрамлялись пластиковыми стенками (высота — 30 см). Конструкция была поднята над полом на 60 см и слабо освещалась рассеянным светом галогеновой лампы (25 Вт), которая располагалась на 1 м выше лабиринта. На 60 см выше установки располагался датчик для регистрации поведения животного. Мышь помещали в центр лабиринта головой в сторону закрытого рукава установки. С помощью программного обеспечения EthoStudio оценивалось время, проведённое в закрытых и открытых частях (%). Установка очищалась после каждого животного.

Извлечение гиппокампа и префронтальной коры. В первой серии экспериментов через 46–48 ч после рассадки по индивидуальным клеткам мышей линий BTBR и C57Bl/6J выводили из эксперимента методом декапитации, а их гиппокамп и префронтальную кору извлекали на льду, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до выделения общей РНК.

Во второй серии экспериментов через 46–48 ч после тестирования поведения мышей линии BTBR выводили из эксперимента методом декапитации, а их гиппокамп и пре-

фронтальную кору извлекали на льду, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до выделения общей РНК и белка.

ОТ-ПЦР. Выделение общей РНК. Общая РНК была выделена с помощью TRIzol Reagent («Lifetechnologies», США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную РНК разводили водой до концентрации 0,125 мкг/мкл и хранили при -70°C . Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [39, 40].

Экспрессию генов определяли с помощью разработанного в нашей лаборатории количественного метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) со специфическими праймерами (таблица) [39–41]. Использовали два типа стандартов: внешний и внутренний. Внутренний стандарт (мРНК *Polr2a*) применяли для контроля обратной транскрипции в качестве основы для расчёта уровня мРНК исследуемых генов. В предварительных опытах не были выявлены различия в уровне мРНК *Polr2a* в исследуемых структурах мозга. Внешним стандартом служила ДНК мыши известной концентрации, что позволяло контролировать ПЦР и определять число копий мРНК исследуемых генов и *Polr2a* в образцах.

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 мкмольями стерильного КСl в объёме 16 мкл, денатурирована при 94°C в течение 5 мин на амплификаторе «БИС» М-120 («БИС-Н», Россия), после чего

был проведён отжиг при 41°C в течение 15 мин; затем было добавлено 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу М-MLV (200 ед.), Tris-HCl (рН = 8,3, 0,225 мкмоль), смесь dNTP (0,015 мкмоль каждого), DTT (0,225 мкмоль) и MnCl_2 (0,03 мкмоль). Полученная смесь (конечный объём – 31 мкл) была инкубирована при 41°C в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при температуре -20°C .

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (таблица), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании «Биосан» 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 стерильную воду (до конечного объёма 20 мкл). При приготовлении реакционной смеси были использованы наборы реагентов фирмы «Синтол» Россия. ПЦР была проведена на амплификаторе LightCycler 480 System («Roche», Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин при 94°C , 1 цикл; 10 сек при 94°C , 30 сек при соответствующей температуре отжига (таблица); 30 сек при 72°C , 40 циклов. Серию разведений геномной ДНК (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл) амплифицировали одновременно в отдельных пробирках и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кри-

Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{\text{отж.}}$, $^{\circ}\text{C}$	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>Cc2d1a</i>	F: 5'-gcaagccgggcaacatcatc-3' R: 5'-tagcagaggtgggtgtagtgg-3'	60	181
<i>Htr1a</i>	F: 5'-ctgtgacctgtttatcgccttg-3' R: 5'-gtagtctatagggtcgggtattgc-3'	62	109
<i>Drd2</i>	F: 5'-cctggtacgatgatctggag-3' R: 5'-gcatggcatagtagtttagtggg-3'	63	99
<i>Creb1</i>	F: 5'-ctgcctcaggcagatgacaa-3' R: 5'-ttcattagacggacctctcttc-3'	63	145
<i>Nfkb1</i>	F: 5'-cgtctgtctctctctctcagac-3' R: 5'-ctgcctcgggtactctctctc-3'	64	152
<i>Rela</i>	F: 5'-gcacctgtccaagagcac-3' R: 5'-gagttgtccacagatgccagg-3'	64	93
<i>Polr2a</i>	F: 5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R: 5'-ctctcttagtgaatttgcgtact-3'	61	194

вая в координатах Ct (значение порогового цикла) – $\log P$ (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 *rPol2a*, выполняющей функцию внутреннего стандарта.

Вестерн-блот-анализ. Образцы гомогенизировали в 300 мкл лизирующего буфера (300 мМ NaCl, 100 мМ Tris-HCl (pH 8,4), 4 мМ EDTA, 0,2% (w/v) Triton X-100, 1 мМ Na_3VO_4 , 2 мМ PMSF («Sigma») и коктейль ингибиторов протеазы («Thermo Fisher Scientific Inc.», США)), инкубировали в течение 60 мин на льду и центрифугировали (12 000 g в течение 15 мин). Супернатант переносили в чистые пробирки и хранили при температуре -80°C . Концентрацию белка оценивали спектрофотометрически с использованием набора для анализа белка Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific Inc.») на NanoDrop 2000C («Thermo Fisher Scientific Inc.») и разводили до равной концентрации с помощью 2× буфера Лэммли. Белки денатурировали, прогревая пробы 10 мин при 65°C . Выделенные белки (по 20 мкл каждого образца) разделяли методом электрофореза в 10%-ном SDS-PAAG, затем переносили на нитроцеллюлозную (для Freud-1, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, D2) или PVDF-мембрану (для CREB и pCREB) («Bio-rad Laboratories Ltd.», США) с помощью полусухого электроблоттинга Trans-Blot Turbo («Bio-rad Laboratories Inc») в течение 2 ч. Для иммунодетекции белка мембрану блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком (для Freud-1, 5-HT_{1A}, D2) или 5%-ным BSA (для CREB и pCREB), разведённым в буфере TBS-T (Tris Bufferd Saline, «Bio-Rad Laboratories, Inc.») с добавлением 0,1% (v/v) Tween 20. Все мембраны блокировали 1 ч, промывали, а затем инкубировали с первичными антителами (кроличьи моноклональные или поликлональные первичные антитела к белкам Freud-1 (1 : 2000, «Abcam», Великобритания); 5-HT_{1A} (1 : 1000, «Abcam»); D2DR (1 : 200, «Santa Cruz», США); pCREB (1 : 1000, «Abcam»); CREB (1 : 1000, «Abcam») и мышинные поликлональные первичные антитела к белку GAPDH (CAB932Hu01, 1 : 2500, «Cloud-Clone Corp.», США) в 5%-ном сухом молоке с TBS-T или в 5%-ной FBS с TBS-T, 16 ч при 4°C . После детекции белка (как описано далее) мембрану отмывали от антител для повторной гибридизации с первичными антителами к GAPDH (внутренний контроль). Для детекции белка мембраны промывали в TBS-T (5 × 5 мин) с последующей инкубацией

со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (вторичные козы антитела против кроличьих иммуноглобулинов (1 : 10 000, «Invitrogen», США) в 5%-ном сухом молоке с TBS-T и антитела против мышинных иммуноглобулинов (1 : 20 000, «Abcam») в 5%-ной FBS с TBS-T), 1 час при комнатной температуре. После промывки мембрану обрабатывали субстратом Clarity Western ECL («Bio-Rad Laboratories Inc», США) в соответствии с инструкцией производителя. Полосы белка были визуализированы хемилюминесцентным сканером C-DiGit («LI-COR», США). Количественную оценку белковых полос проводили с помощью Image Studio («LI-COR»). Экспрессию белка выражали в относительных единицах, нормировали на экспрессию GAPDH, конститутивную для клеток мозга. Количество проанализированных образцов – $n \geq 9$ (в связи с использованием критерия Диксона для выявления и исключения крайних отклонений из анализа число образцов варьировало. Дополнительно количество проанализированных образцов указано на подписях к рисункам).

Флуоресцентная микроскопия срезов мозга мышей. Мышей транскардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) и 4%-ным раствором параформальдегида под анестезией через 5 недель после инъекции AAV. Мозг извлекали и дополнительно фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 6 ч, затем погружали в 30%-ный раствор сахарозы в PBS на 2 дня. Последовательные срезы толщиной 14 мкм делали в криостате («Thermo Scientific», США). Ядра клеток окрашивали раствором бис-бензида (краситель Hoechst 33258, 5 мкг/мл в PBS, «Sigma-Aldrich», Германия). Наконец, срезы помещали в антиквантную среду (Fluoromount G; «Southern Biotechnology Associates», США) с последующим микроскопическим анализом с использованием микроскопа Zeiss AxioImager («Zeiss», Германия) с 10× и 40× объективами с воздушной иммерсией.

Статистический анализ. Результаты были представлены как $m \pm SEM$ (где m – среднее; SEM – стандартная ошибка среднего), а в тесте «закапывание шариков» добавлено значение медианы. Сравнение выборок проводилось с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным множественным сравнением по Фишеру для всех методов, кроме «водного лабиринта Морриса» и теста «закапывание шариков». Для теста «водный лабиринт Морриса» параметры в различные дни обучения анализировались с помощью ANOVA, используемым при повторных измерениях, с последующим сравнением по Фишеру.

Значения времени в целевом секторе в тесте без платформы сравнивали со случайным (25%) с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для теста «закапывание шариков» использовался непараметрический критерий Манна–Уитни. Достоверными считались различия при критерии значимости $p < 0,05$. Нормальности дисперсий проверялись с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Критерий Диксона использовался для выявления и исключения крайних отклонений из анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение уровня мРНК гена *Cc2d1a* в гиппокампе и префронтальной коре. Было показано существенное ($F_{1,20} = 5,22, p = 0,005$) повышение экспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе интактных мышей линии ВТВР по сравнению с интактными мышами линии С57В1/6J (рис. 1) ($n = 11$ в каждой группе). В связи с этим была проведена дальнейшая работа по исследованию

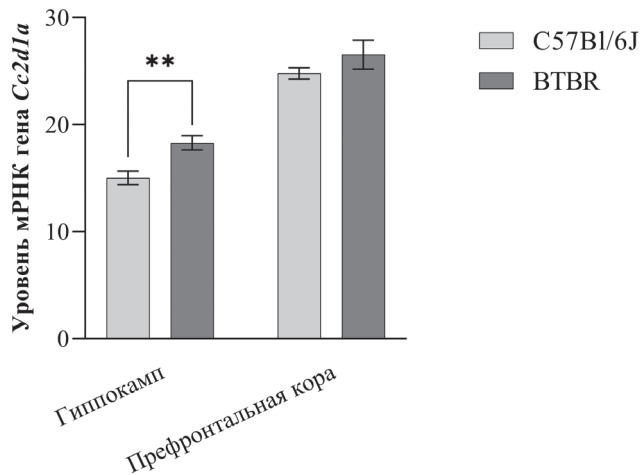


Рис. 1. Уровень мРНК гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линий ВТВР и С57В1/6J. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *Polr2a*, $n = 11$. ** $p < 0,01$ – достоверное отличие при сравнении групп ВТВР и С57В1/6J

влияния снижения экспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе мышей линии ВТВР до уровня, обнаруженного в мозге интактных мышей линии С57В1/6J.

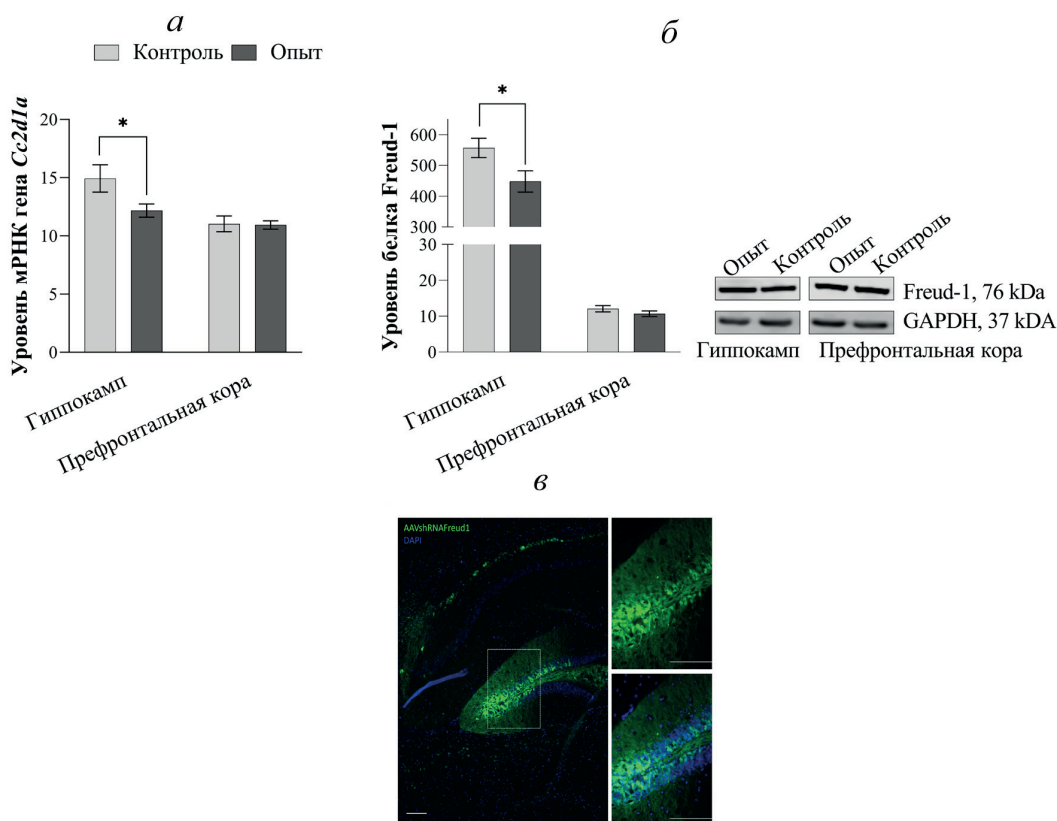


Рис. 2. Уровни мРНК гена *Cc2d1a* (а) и белка Freud-1 (б) в гиппокампе мышей ВТВР. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *Polr2a*. Уровень белка представлен в относительных единицах хемилюминесцентного сигнала и нормирован на уровень белка GAPDH, $n = 11-13$. На рисунке показана количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала и результат иммуноблота на мембране. в – Об успешной AAV-опосредованной трансфекции свидетельствует экспрессия флуоресцентного зелёного белка EGFP, обнаруживаемая в клетках области СА1 и зубчатой извилины. Шкала – 100 мкм. * $p < 0,05$ – достоверное отличие при сравнении групп «контроль» и «опыт»

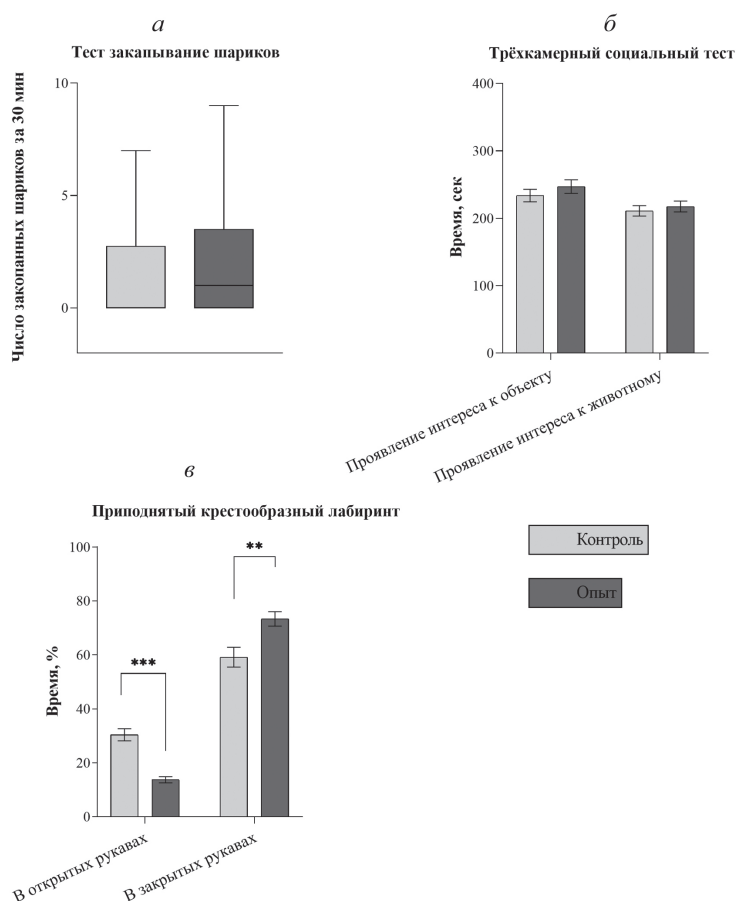


Рис. 3. Влияние снижения экспрессии гена *Cc2d1a* на число полностью закопанных шариков в тесте «закапывание шариков» (а), время проявления интереса к животному или объекту в трёхкамерном социальном тесте (б) и время в открытых и закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (в), $n = 10-13$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверное отличие при сравнении групп «контроль» и «опыт»

Влияние нокдауна гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии ВТВР на экспрессию гена *Cc2d1a*/Freud-1. Нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе привёл к достоверному падению уровня мРНК гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей из группы «опыт» ($F_{1,23} = 4,69$, $p = 0,04$), в префронтальной коре экспрессия этого гена осталась без изменений ($F_{1,24} = 1,26$, $p = 0,90$) (рис 2, а). Вестерн-блот-анализ показал достоверное снижение уровня белка Freud-1 в гиппокампе у опытной группы животных ($F_{1,20} = 5,43$, $p = 0,03$). В префронтальной коре изменения в экспрессии этого белка отсутствовали ($F_{1,20} = 1,38$, $p = 0,25$) (рис. 2, б) ($n = 13$ – в опытной группе, $n = 12$ – в контрольной группе). Кроме того, экспрессия плазмиды в месте инъекции была подтверждена при помощи флуоресцентной микроскопии срезов головного мозга (рис. 2, в).

Влияние нокдауна *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии ВТВР на поведение. Тест закапывание шариков. Количество закопанных шариков отражает выраженность стереотипного поведения животного. Влияния нокдауна *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе на

количество закопанных шариков выявлено не было, т.е. стереотипное поведение осталось без изменений ($U = 69$, $p = 0,61$) (рис. 3, а).

Трёхкамерный социальный тест. Трёхкамерный социальный тест служит для оценки степени выраженности социального поведения у животных. В результате анализа поведения животных в этой установке не было обнаружено достоверных отличий для мышей всех групп в исследовательском предпочтении к объекту ($F_{1,22} = 0,07$, $p = 0,79$) или другому животному ($F_{1,21} = 0,33$, $p = 0,56$) (рис. 3, б).

Приподнятый крестообразный лабиринт. Анализ данных теста «приподнятый крестообразный лабиринт» позволяет оценить тревожность животных. В группе «опыт» было обнаружено достоверное снижение времени нахождения в открытых рукавах лабиринта ($F_{1,23} = 46,10$, $p = 0,0009$) и увеличение – в закрытых ($F_{1,23} = 10,05$, $p = 0,004$) (рис. 3, в), что может говорить об усилении тревожности животных группы «опыт» по сравнению с контрольной группой животных.

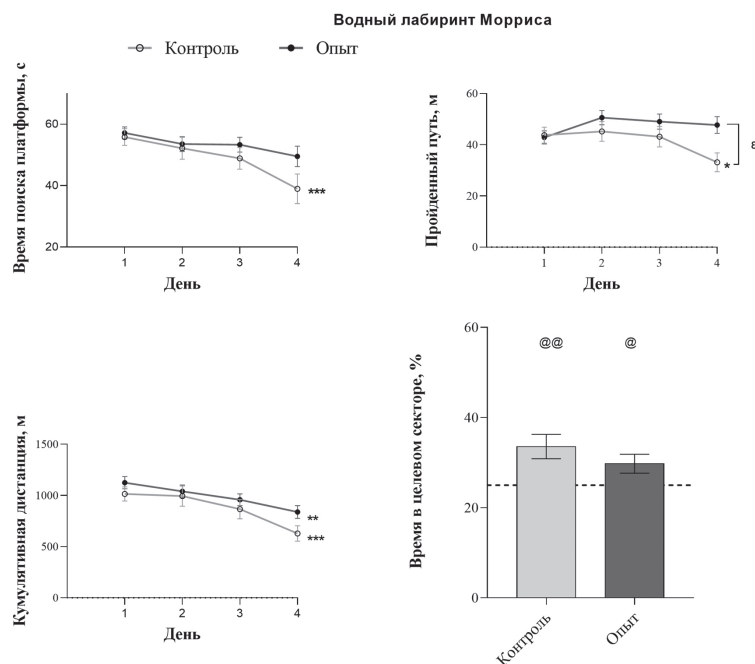


Рис. 4. Динамика изменения времени поиска платформы, пройденного пути, кумулятивной дистанции, а также время в целевом секторе на 5-й день в водном лабиринте Морриса; $n = 11-13$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверное отличие по сравнению с 1-м днём для групп «контроль» и «опыт»; $^{\epsilon} p < 0,05$ – достоверное отличие при сравнении групп «контроль» и «опыт» на 4-й день; $@ p < 0,01$, $@@ p < 0,01$ – достоверное отличие по сравнению со случайным нахождением в секторе (25%)

Водный лабиринт Морриса. Данный тест позволяет оценить память и способность мышей к обучению. Анализ ANOVA для повторных измерений показал эффект группы ($F_{1,23} = 4,98$, $p = 0,036$) – для пройденного пути и эффект измерения – для кумулятивной дистанции ($F_{3,69} = 9,6$, $p = 0,0001$) и для времени поиска платформы ($F_{3,69} = 6,3$, $p = 0,0007$). Мыши контрольной группы успешно обучались находить скрытую платформу, что отражалось в снижении времени поиска платформы ($p = 0,0001$) и пройденного пути к 4-му дню ($p = 0,018$) по сравнению с 1-м днём тестирования. Введение конструкта, несущего плазмиду rAAV_SynH1-2_shRNA-Freud-1, значительно повлияло на поведение животных в данном тесте. Время поиска платформы ($p = 0,06$) и длина пройденного пути ($p = 0,26$) у мышей опытной группы на 4-й день обучения достоверно не отличалось от такового на 1-й день обучения. При этом на 4-й день тестирования было обнаружено достоверное различие в длине пройденного пути ($p = 0,016$) между группами «опыт» и «контроль». Кумулятивная дистанция, однако, уменьшилась как в группе «контроль» ($p = 0,0001$), так и в группе «опыт» ($p = 0,002$). Интересно, что проверка запоминания положения платформы на 5-й день показала, что мыши обеих групп проводили достоверно больше времени в целевом секторе по сравнению со случайным значением – 25% («контроль»: $n = 12$, $t = 3,16$,

$p = 0,009$; «опыт»: $n = 13$, $t = 2,25$, $p = 0,04$). Статистически значимой разницы между опытными и контрольными животными по времени нахождения в целевом секторе найдено не было ($F_{1,23} = 1,25$, $p = 0,27$) (рис. 4).

Влияние нокдауна *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии ВТВР на экспрессию исследуемых генов и белков. Нокдаун гена *Cc2d1a* не повлиял достоверно на уровень мРНК гена *Htr1a* как в гиппокампе ($F_{1,24} = 0,63$, $p = 0,43$), так и в префронтальной коре ($F_{1,24} = 0,76$, $p = 0,39$) (рис. 5 а). Снижение уровня экспрессии гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей не повлияло на уровень белка 5-НТ_{1А} серотонинового рецептора как в гиппокампе ($F_{1,22} = 0,63$, $p = 0,43$), так и в префронтальной коре ($F_{1,20} = 0,76$, $p = 0,78$) (рис. 5, б).

Нокдаун гена *Cc2d1a* не повлиял на экспрессию гена *Drd2* в гиппокампе ($F_{1,26} = 0,17$, $p = 0,67$) и префронтальной коре ($F_{1,26} = 0,08$, $p = 0,77$) (рис. 5, в). Введение аденоассоциированного вирусного вектора не изменило экспрессию белка D2 дофаминового рецептора как в гиппокампе ($F_{1,22} = 0,73$, $p = 0,42$), так и в префронтальной коре ($F_{1,22} = 0,63$, $p = 0,53$) (рис. 5, г).

Экспрессия гена *Creb1* не отличалась в опытной и контрольной группах в гиппокампе ($F_{1,24} = 0,14$, $p = 0,71$). Однако в префронтальной коре уровень мРНК гена *Creb1* в группе «опыт» снизился относительно контрольной группы

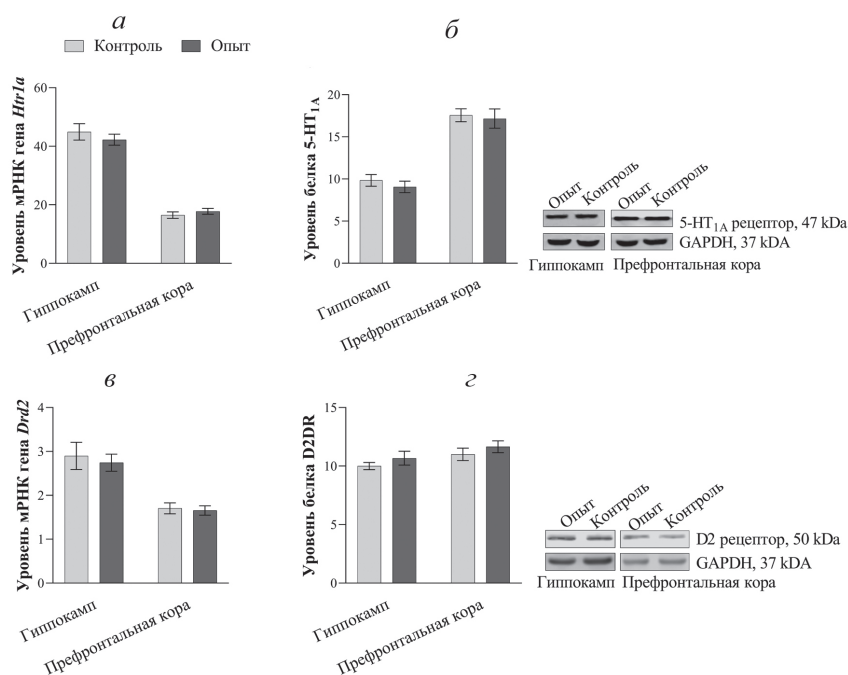


Рис. 5. Уровни мРНК генов *Htr1a*, *Drd2* (а и в) и белка 5-НТ_{1А}, D2-рецепторов (б и г) в гиппокампе и префронтальной коре мозга мышей. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *Polr2a*. Уровень белка представлен в относительных единицах хемилюминесцентного сигнала и нормирован на уровень белка GAPDH. На рисунке показана количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала и результат иммуноблота на мембране, $n = 11-13$

животных ($F_{1,21} = 5,55$, $p = 0,028$) (рис. 6, а). Были измерены уровни белков CREB и pCREB, чтобы оценить степень фосфорилирования белка CREB. Было обнаружено, что снижение экспрессии гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей ВТВР не повлияло на фосфорилирование белка CREB ни в гиппокампе ($F_{1,18} = 1,02$, $p = 0,32$), ни в префронтальной коре ($F_{1,21} = 0,10$, $p = 0,74$) (рис. 6, б). Также экспрессия гена *Nfkb1* не различалась между контрольной и опытной группами животных как в гиппокампе ($F_{1,24} = 0,68$, $p = 0,79$), так и в префронтальной коре ($F_{1,24} = 0,66$, $p > 0,42$) (рис. 6, в). Кроме того, снижение уровня экспрессии гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей ВТВР достоверно не повлияло на уровень мРНК гена *Rela* как в гиппокампе ($F_{1,20} = 0,37$, $p = 0,54$), так и в префронтальной коре ($F_{1,25} = 0,29$, $p = 0,59$) (рис. 6, г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Расстройства аутистического спектра – это наследуемая и весьма гетерогенная группа фенотипов психического развития, диагностируемая более чем у 1% детей. Совокупность генетических факторов вносит существенный вклад в развитие этого синдрома, но на сегодняшний день ни одна индивидуальная мутация гена не была надёжно связана с РАС [42]. В этом исследовании в качестве гена кандидата, ответствен-

ного за развитие симптомов аутизма, рассмотрен ген *Cc2d1a*. Этот ген участвует в развитии нервной системы, регулирует большое количество внутриклеточных сигнальных путей и уже отмечен многими исследователями как ген, связанный с дефицитом коммуникативных и когнитивных способностей [16, 43–45].

В ходе данного исследования было обнаружено, что экспрессия гена *Cc2d1a* существенно выше в гиппокампе мышей линии ВТВР по сравнению с мышами контрольной линии С57В1/6J. Принимая во внимание тот факт, что чрезмерная экспрессия *Cc2d1a* может лежать в основе развития различных психопатологий [17], мы предположили, что снижение экспрессии *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии ВТВР до уровня, наблюдаемого в гиппокампе мышей линии С57В1/6J, может привести к коррекции каких-либо аутистически-подобных поведенческих черт у исследуемых животных.

Введение аденоассоциированного вирусного вектора, несущего плазмиду рAAV_SynH1-2_shRNA-Freud-1, значительно снизило экспрессию гена *Cc2d1a*, который кодирует транскрипционный фактор Freud-1. Следует отметить, что снижение уровня мРНК гена *Cc2d1a* составляет примерно 20%, что соответствует различиям в экспрессии *Cc2d1a*, наблюдаемым между мышами ВТВР и С57В1/6J. Уменьшение количества белка Freud-1 стало законо-

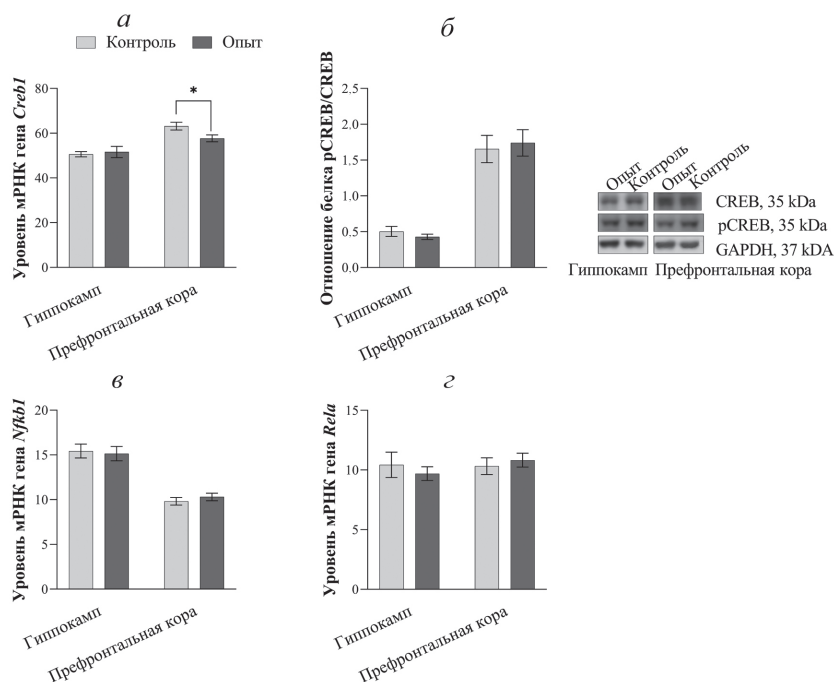


Рис. 6. Экспрессия генов *Creb1* (а), *Nfkb1* (в), *Rela* (г) и уровень фосфорилирования белка CREB (б) в гиппокампе и префронтальной коре мозга мышей. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *Polr2a*. Уровень белка представлен в относительных единицах хемилюминесцентного сигнала и нормирован на уровень белка GAPDH. На рисунке показано количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала и результат иммуноблота на мембране, $n = 9-13$. * $p < 0,05$ – достоверное отличие при сравнении групп «контроль» и «опыт»

мерным следствием уменьшения уровня мРНК гена *Cc2d1a*.

Привнесённые в экспрессию гена *Cc2d1a* изменения привели к значительному усилению тревожности, отражённому в сокращении времени, проводимом животными в открытых рукавах, и соответственно увеличению времени в закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта. В целом, полученные данные согласуются с данными о протревожном эффекте нокдауна гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии C57Bl/6J [22]. Необходимо отметить, что тревожность является одним из сопутствующих симптомов аутизма. Эта проблема распространена среди людей, страдающих аутизмом, с частотой от 11 до 84% [46]. Наши данные указывают на то, что ген *Cc2d1a* участвует в механизмах тревожности и, в частности, в механизмах тревожности при аутистически-подобном поведении.

В ходе данного исследования нами также было обнаружено, что нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей ВТВР приводит к значительному увеличению времени нахождения платформы и преодолённого расстояния до платформы в водном лабиринте Морриса у исследуемых животных. Можно было бы предположить, что нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе приводит к нарушению пространственного обучения и памяти, однако в день ре-теста без

платформы мыши ВТВР проводили более 25% времени в секторе, где ранее располагалась платформа. Это указывает на то, что животные запомнили местоположение платформы. Следовательно, можно предположить, что увеличение времени нахождения платформы и преодолённого расстояния до платформы у мышей ВТВР связано с высоким уровнем активного избегания стресса, наблюдаемого у этих животных [47], который ещё больше возрос в связи с протревожным эффектом нокдауна гена *Cc2d1a*. Крайне важно отметить, что, как нами было показано ранее, пространственная память нарушалась у мышей стандартной линии C57Bl/6J после нокдауна гена *Cc2d1a* в гиппокампе: в день ре-теста экспериментальные животные проводили в секторе, где ранее располагалась платформа, менее 25% времени [22].

Из литературных данных известно, что мыши с нокаутом по гену *Cc2d1a* имеют целый ряд поведенческих нарушений: когнитивный и социальные дефициты, тревога, гиперактивность и повторяющееся поведение [44]. Однако локальный нокдаун *Cc2d1a* в гиппокампе не оказал существенного влияния на социальный дефицит и стереотипное поведение мышей ВТВР.

Несмотря на важную роль Freud-1 в регуляции 5-НТ_{1A} [17] и D2-рецепторов [26], обнару-

жить эффект нокдауна *Cc2d1a* в гиппокампе на экспрессию генов этих рецепторов не удалось. Возможно, это связано с компенсаторными механизмами, запускающимися через 5 недель после нокдауна гена *Cc2d1a* [22].

Нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей BTBR не оказал существенного влияния ни на экспрессию ключевого эффектора Freud-1 – транскрипционного фактора CREB, ни на его фосфорилирование. Это указывает на то, что CREB не принимает участие в выявленных нами эффектах нокдауна гена *Cc2d1a* на поведение. Однако, как было показано в нашей предыдущей работе, у мышей стандартной линии C57Bl/6J нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе приводил к значительному снижению как уровня мРНК *Creb*, так и фосфорилирования белка [22]. Кроме того, подобное влияние на CREB было продемонстрировано и другим научным коллективом на мышах с дефицитом *Cc2d1a* [8]. Известно, что транскрипционный фактор CREB имеет критическое значение для формирования памяти [48]. В более ранних исследованиях показано, что нокдаун гена *Cc2d1a* нарушает пространственно-временную память в водном лабиринте Морриса [16, 22]. Однако у мышей BTBR нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе не повлиял ни на пространственную память, ни на фосфорилирование транскрипционного фактора CREB, в то время как у мышей C57Bl/6J было обнаружено и ухудшение пространственной памяти, и снижение фосфорилирования CREB [22]. Совместно эти данные указывают на нарушение CREB-зависимого эффекторного пути транскрипционного фактора Freud-1 в мозге мышей линии BTBR.

Широкий спектр внеклеточных лигандов и мембраносвязанных рецепторов активирует каскад NF-κB. Активация NF-κB в основном происходит по каноническим и неканоническим сигнальным путям. Канонический путь основывается на индуцируемой деградации IκB, что вызывает перемещение NF-κB (p65- и p50-субъединицы) в ядро и связывание с κB-сайтами ДНК в промоторах и энхансерах генов-мишеней [49]. Активация этого пути может как уменьшать, так и увеличивать сложность дендритов [50, 51], а также приводить к нейровоспалению и связанным с ним симптомам PAC [16]. Несмотря на то что роль Freud-1 в активации NF-κB сигнального пути не вызывает сомнения, локальный нокдаун *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии BTBR не оказал существенного влияния на уровни мРНК генов канонического сигнального пути NF-κB *Rela* (кодирует субъединицу p65 NF-κB-фактора) и *Nfkb1* (кодирует субъединицу p50 NF-κB-

фактора), что может указывать на нарушения в работе каких-то элементов данного сигнального пути. Также нельзя исключать существование дополнительных, ещё не изученных механизмов реализации эффектов Freud-1 на поведение, не связанных с CREB и NF-κB сигнальными путями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, транскрипционный фактор Freud-1 играет роль в патогенезе тревожности и в механизмах активного избегания стресса при аутизме. При этом нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей с аутистически-подобным поведением не нарушает их пространственную память, как у «нормальных» животных линии C57Bl/6J. Совместно с данными об отсутствии эффекта нокдауна гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей BTBR на фосфорилирование CREB наши результаты позволяют предположить, что у мышей линии BTBR нарушен CREB-зависимый эффекторный путь, что может играть важную роль в формировании аутистически-подобного фенотипа.

Вклад авторов. В.С. Науменко, Н.К. Попова, Е.М. Кондаурова – концепция и руководство работой; Е.А. Куликова, Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко, И.И. Белокопытова – проведение экспериментов; В.С. Науменко, Е.М. Кондаурова – обсуждение результатов исследования; И.И. Белокопытова, В.С. Науменко – написание текста; В.С. Науменко, Н.К. Попова, Е.М. Кондаурова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00028). Содержание животных осуществлялось за счёт средств бюджетного проекта FWRN-2022-0023.

Благодарности. Исследование выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ФНИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН (RFMEFI62119X0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с международными правилами обращения с животными (Directive 2010/63/EU EC) и Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (зарегистрирован 15.08.2016 № 43232).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Christensen, D. L., Baio, J., Van Naarden Braun, K., Bilder, D., Charles, J., et al. (2016) Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2012, *Morbid. Mortal. Weekly Rep. Surveill. Summaries*, **65**, 1-23, doi: 10.15585/mmwr.ss6503a1.
2. Alexander, A. L., Lee, J. E., Lazar, M., Boudos, R., DuBray, M. B., et al. (2007) Diffusion tensor imaging of the corpus callosum in autism, *NeuroImage*, **34**, 61-73, doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.08.032.
3. Ecker, C., Suckling, J., Deoni, S. C., Lombardo, M. V., Bullmore, E. T., et al. (2012) Brain anatomy and its relationship to behavior in adults with autism spectrum disorder: a multicenter magnetic resonance imaging study, *Arch. Gen. Psychiatry*, **69**, 195-209, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.1251.
4. Hoischen, A., Krumm, N., and Eichler, E. E. (2014) Prioritization of neurodevelopmental disease genes by discovery of new mutations, *Nat. Neurosci.*, **17**, 764-772, doi: 10.1038/nn.3703.
5. Lainhart, J. E. (2006) Advances in autism neuroimaging research for the clinician and geneticist, *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, **142C**, 33-39, doi: 10.1002/ajmg.c.30080.
6. Basel-Vanagaite, L., Attia, R., Yahav, M., Ferland, R. J., Anteki, L., et al. (2006) The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation, *J. Med. Genet.*, **43**, 203-210, doi: 10.1136/jmg.2005.035709.
7. Nakamura, A., Naito, M., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008) Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling, *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 5996-6009, doi: 10.1128/MCB.00114-08.
8. Zamarbide, M., Mossa, A., Munoz-Llancao, P., Wilkinson, M. K., Pond, H. L., et al. (2019) Male-specific cAMP signaling in the hippocampus controls spatial memory deficits in a mouse model of autism and intellectual disability, *Biol. Psychiatry*, **85**, 760-768, doi: 10.1016/j.biopsych.2018.12.013.
9. Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009) The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a000034, doi: 10.1101/cshperspect.a000034.
10. Liao, X., and Li, Y. (2020) Nuclear factor kappa B in autism spectrum disorder: a systematic review, *Pharmacol. Res.*, **159**, 104918, doi: 10.1016/j.phrs.2020.104918.
11. El-Ansary, A., and Al-Ayadhi, L. (2012) Neuroinflammation in autism spectrum disorders, *J. Neuroinflamm.*, **9**, 265, doi: 10.1186/1742-2094-9-265.
12. Matta, S. M., Hill-Yardin, E. L., and Crack, P. J. (2019) The influence of neuroinflammation in autism spectrum disorder, *Brain Behav. Immun.*, **79**, 75-90, doi: 10.1016/j.bbi.2019.04.037.
13. Theoharides, T. C., Asadi, S., and Patel, A. B. (2013) Focal brain inflammation and autism, *J. Neuroinflamm.*, **10**, 46, doi: 10.1186/1742-2094-10-46.
14. Young, A. M., Chakrabarti, B., Roberts, D., Lai, M. C., Suckling, J., et al. (2016) From molecules to neural morphology: understanding neuroinflammation in autism spectrum condition, *Mol. Autism*, **7**, 9, doi: 10.1186/s13229-016-0068-x.
15. Impey, S., McCorkle, S. R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J. M., Yochum, G. S., et al. (2004) Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions, *Cell*, **119**, 1041-1054, doi: 10.1016/j.cell.2004.10.032.
16. Zamarbide, M., Oaks, A. W., Pond, H. L., Adelman, J. S., and Manzini, M. C. (2018) Loss of the intellectual disability and autism gene *Cc2d1a* and its homolog *Cc2d1b* differentially affect spatial memory, anxiety, and hyperactivity, *Front. Genet.*, **9**, 65, doi: 10.3389/fgene.2018.00065.
17. Ou, X. M., Lemonde, S., Jafar-Nejad, H., Bown, C. D., Goto, A., et al. (2003) Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene, *J. Neurosci.*, **23**, 7415-7425, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-19-07415.2003.
18. Al-Tawashi, A., Jung, S. Y., Liu, D., Su, B., and Qin, J. (2012) Protein implicated in nonsyndromic mental retardation regulates protein kinase A (PKA) activity, *J. Biol. Chem.*, **287**, 14644-14658, doi: 10.1074/jbc.M111.261875.
19. Zhao, M., Raingo, J., Chen, Z. J., and Kavalali, E. T. (2011) *Cc2d1a*, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses, *J. Neurophysiol.*, **105**, 1506-1515, doi: 10.1152/jn.00950.2010.
20. Chen, K. R., Chang, C. H., Huang, C. Y., Lin, C. Y., Lin, W. Y., et al. (2012) TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE)/CC2D1A is a key regulator linking RIG-I-like receptors to antiviral immunity, *J. Biol. Chem.*, **287**, 32216-32221, doi: 10.1074/jbc.C112.394346.
21. Vahid-Ansari, F., Daigle, M., Manzini, M. C., Tanaka, K. F., Hen, R., et al. (2017) Abrogated Freud-1/*Cc2d1a* repression of 5-HT1A autoreceptors induces fluoxetine-resistant anxiety/depression-like behavior, *J. Neurosci.*, **37**, 11967-11978, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1668-17.2017.
22. Kondaurova, E. M., Plyusnina, A. V., Ilchibaeva, T. V., Eremin, D. V., Rodnyy, A. Y., et al. (2021) Effects of a *Cc2d1a*/Freud-1 knockdown in the hippocampus on behavior, the serotonin system, and BDNF, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms222413319.
23. Farook, M. F., DeCuypere, M., Hyland, K., Takumi, T., LeDoux, M. S., et al. (2012) Altered serotonin, dopamine and norepinephrine levels in 15q duplication

- and Angelman syndrome mouse models, *PLoS One*, **7**, e43030, doi: 10.1371/journal.pone.0043030.
24. Faraji, J., Karimi, M., Lawrence, C., Mohajerani, M. H., and Metz, G. A. S. (2018) Non-diagnostic symptoms in a mouse model of autism in relation to neuroanatomy: the BTBR strain reinvestigated, *Translat. Psychiatry*, **8**, 234, doi: 10.1038/s41398-018-0280-x.
25. Lemonde, S., Turecki, G., Bakish, D., Du, L., Hrdina, P. D., et al. (2003) Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide, *J. Neurosci.*, **23**, 8788-8799, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-25-08788.2003.
26. Rogaeva, A., Ou, X. M., Jafar-Nejad, H., Lemonde, S., and Albert, P. R. (2007) Differential repression by *freud-1/CC2D1A* at a polymorphic site in the dopamine-D2 receptor gene, *J. Biol. Chem.*, **282**, 20897-20905, doi: 10.1074/jbc.M610038200.
27. Ford, C. P. (2014) The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission, *Neuroscience*, **282**, 13-22, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.025.
28. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., and Caron, M. G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function, *Physiol. Rev.*, **78**, 189-225, doi: 10.1152/physrev.1998.78.1.189.
29. Stephenson, D. T., O'Neill, S. M., Narayan, S., Tiwari, A., Arnold, E., et al. (2011) Histopathologic characterization of the BTBR mouse model of autistic-like behavior reveals selective changes in neurodevelopmental proteins and adult hippocampal neurogenesis, *Mol. Autism*, **2**, 7, doi: 10.1186/2040-2392-2-7.
30. Gould, G. G., Burke, T. F., Osorio, M. D., Smolik, C. M., Zhang, W. Q., et al. (2014) Enhanced novelty-induced corticosterone spike and upregulated serotonin 5-HT1A and cannabinoid CB1 receptors in adolescent BTBR mice, *Psychoneuroendocrinology*, **39**, 158-169, doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.09.003.
31. Gould, G. G., Hensler, J. G., Burke, T. F., Benno, R. H., Onaivi, E. S., et al. (2011) Density and function of central serotonin (5-HT) transporters, 5-HT1A and 5-HT2A receptors, and effects of their targeting on BTBR T+tf/J mouse social behavior, *J. Neurochem.*, **116**, 291-303, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07104.x.
32. Guo, Y. P., and Commons, K. G. (2017) Serotonin neuron abnormalities in the BTBR mouse model of autism, *Autism Res.*, **10**, 66-77, doi: 10.1002/aur.1665.
33. Wirth, A., Chen-Wacker, C., Wu, Y. W., Gorinski, N., Filippov, M. A., et al. (2013) Dual lipidation of the brain-specific Cdc42 isoform regulates its functional properties, *Biochem. J.*, **456**, 311-322, doi: 10.1042/BJ20130788.
34. Grimm, D., Kay, M. A., and Kleinschmidt, J. A. (2003) Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6, *Mol. Ther.*, **7**, 839-850, doi: 10.1016/s1525-0016(03)00095-9.
35. Slotnick, B. M., and Leonard, C. M. (1975) *A Stereotaxic Atlas of the Albino Mouse Forebrain*, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Rockville, Maryland.
36. Khotskin, N. V., Plyusnina, A. V., Kulikova, E. A., Bazhenova, E. Y., Fursenko, D. V., et al. (2019) On association of the lethal yellow (A(Y)) mutation in the agouti gene with the alterations in mouse brain and behavior, *Behav. Brain Res.*, **359**, 446-456, doi: 10.1016/j.bbr.2018.11.013.
37. Kulikov, A. V., Fursenko, D. V., Khotskin, N. V., Bazovkina, D. V., Kulikov, V. A., et al. (2014) Spatial learning in the Morris water maze in mice genetically different in the predisposition to catalepsy: the effect of intraventricular treatment with brain-derived neurotrophic factor, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **122**, 266-272, doi: 10.1016/j.pbb.2014.04.009.
38. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., and Kulikov, V. A. (2008) Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 345-351, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.024.
39. Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., Voronova, I. P., Tikhonova, M. A., and Popova, N. K. (2005) Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard, *J. Neurosci. Methods*, **141**, 97-101, doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.06.005.
40. Naumenko, V. S., and Kulikov, A. V. (2006) Quantitative assay of 5-HT(1A) serotonin receptor gene expression in the brain, *Mol. Biol. (Mosk)*, **40**, 37-44.
41. Naumenko, V. S., Osipova, D. V., Kostina, E. V., and Kulikov, A. V. (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 197-203, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.008.
42. Grove, J., Ripke, S., Als, T. D., Mattheisen, M., Walters, R. K., et al. (2019) Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder, *Nat. Genet.*, **51**, 431-444, doi: 10.1038/s41588-019-0344-8.
43. Manzini, M. C., Xiong, L., Shaheen, R., Tambunan, D. E., Di Costanzo, S., et al. (2014) CC2D1A regulates human intellectual and social function as well as NF-kappaB signaling homeostasis, *Cell Rep.*, **8**, 647-655, doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.039.
44. Oaks, A. W., Zamarbide, M., Tambunan, D. E., Santini, E., Di Costanzo, S., et al. (2017) *Cc2d1a* loss of function disrupts functional and morphological development in forebrain neurons leading to cognitive and social deficits, *Cereb. Cortex*, **27**, 1670-1685, doi: 10.1093/cercor/bhw009.
45. Sener, E. F., Uytun, M. C., Bayramov, K. K., Zararsiz, G., Oztop, D. B., et al. (2016) The roles of CC2D1A and HTR1A gene expressions in autism spectrum disorders, *Metab. Brain Dis.*, **31**, 613-619, doi: 10.1007/s11011-016-9795-0.

46. White, S. W., Oswald, D., Ollendick, T., and Scahill, L. (2009) Anxiety in children and adolescents with autism spectrum disorders, *Clin. Psychol. Rev.*, **29**, 216-229, doi: 10.1016/j.cpr.2009.01.003.
47. Defensor, E. B., Pearson, B. L., Pobbe, R. L., Bolivar, V. J., Blanchard, D. C., et al. (2011) A novel social proximity test suggests patterns of social avoidance and gaze aversion-like behavior in BTBR T+ tf/J mice, *Behav. Brain Res.*, **217**, 302-308, doi: 10.1016/j.bbr.2010.10.033.
48. Kida, S., Josselyn, S. A., Pena de Ortiz, S., Kogan, J. H., Chevere, I., et al. (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories, *Nat. Neurosci.*, **5**, 348-355, doi: 10.1038/nn819.
49. Sun, S. C. (2011) Non-canonical NF-kappaB signaling pathway, *Cell Res.*, **21**, 71-85, doi: 10.1038/cr.2010.177.
50. Gavalda, N., Gutierrez, H., and Davies, A. M. (2009) Developmental switch in NF-kappaB signalling required for neurite growth, *Development*, **136**, 3405-3412, doi: 10.1242/dev.035295.
51. Gutierrez, H., O'Keefe, G. W., Gavalda, N., Gallagher, D., and Davies, A. M. (2008) Nuclear factor kappa B signaling either stimulates or inhibits neurite growth depending on the phosphorylation status of p65/RelA, *J. Neurosci.*, **28**, 8246-8256, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1941-08.2008.

**EFFECT OF A *Cc2d1a*/Freud-1 KNOCKDOWN
IN THE HIPPOCAMPUS IN BTBR MICE
ON AUTISTIC-LIKE BEHAVIOR, SEROTONIN 5-HT_{1A}
AND D2 DOPAMINE RECEPTORS
AND INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAYS CREB AND NF-κB**

**I. I. Belokopytova, E. M. Kondaurova, E. A. Kulikova, T. V. Ilchibaeva,
V. S. Naumenko*, and N. K. Popova**

*Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: naumenko2002@mail.ru*

The mechanisms of autism are of extreme interest due to its high prevalence in the human population. In this regard, the transcription factor Freud-1 (encoded by the *Cc2d1a* gene), which regulates many intracellular signaling pathways and serves as a silencer for serotonin 5-HT_{1A} and dopamine D2 receptors. Disruptions of Freud-1 function leads to the development of various psychopathologies. In this study, we found an increase in the expression of the *Cc2d1a*/Freud-1 gene in the hippocampus of modeling autism-like behavior BTBR mice in comparison with C57Bl/6J mice and examined how the normalization of the *Cc2d1a*/Freud-1 gene expression in the hippocampus of BTBR mice affects behavior, 5-HT_{1A} and D2 receptors and Creb and NF-κB intracellular signaling pathways. 5 weeks after administration of an adeno-associated viral vector (AAV) carrying the pAAV_H1-2_shRNA-Freud-1_Syn_EGFP plasmid encoding a small hairpin RNA that suppresses the expression of the *Cc2d1a*/Freud-1 gene at both the mRNA and protein levels, we revealed an enhancement of anxiety and an increase in the time spent to find the platform and the distance traveled to the platform in the Morris water maze, which is probably associated with an increase in the strategy of active stress avoidance. However, *Cc2d1a*/Freud-1 knockdown did not affect spatial memory and CREB transcription factor phosphorylation, although such effect was found in our previous work on C57Bl/6J mice. These results suggest that the CREB-dependent effector pathway is impaired in BTBR mice, which may play an important role in the development of the autism-like phenotype. Knockdown of *Cc2d1a*/Freud-1 in the hippocampus of BTBR mice did not affect either the expression of 5-HT_{1A} and D2 receptors or the expression of key NF-κB signaling genes (*Nfkb1* and *Rela*). Our data allow us to conclude that the Freud-1 transcription factor plays a significant role in the pathogenesis of anxiety and active stress avoidance in autism.

Keywords: *Cc2d1a*/Freud-1 knockdown, 5-HT_{1A} serotonin receptor, D2 dopamine receptor, CREB, NF-κB, BTBR mice, autistic-like behavior