

ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ДОФАМИНОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА (CDNF) В ГИППОКАМПЕ НА ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОМУ ПОВЕДЕНИЮ

© 2023 Я.П. Каминская, Т.В. Ильчибаева, Н.В. Хоцкин, В.С. Науменко, А.С. Цыбко*

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: antoncybko@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2023

После доработки 08.06.2023

Принята к публикации 09.06.2023

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF) является перспективным средством для лечения болезни Паркинсона. Однако его роль в регуляции немоторного поведения, в том числе в разного рода психопатологиях, остаётся неясной. В связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния сверхэкспрессии CDFN в гиппокампе на поведение мышей линии ASC (Antidepressant Sensitive Cataleptics) с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению. Сверхэкспрессию CDFN в нейронах гиппокампа мышей индуцировали с помощью аденоассоциированного вирусного вектора (AAV). Через 4 недели после стереотаксической инъекции вектора AAV-CDNF в дорсальный гиппокамп оценивалось поведение в условиях домашней клетки, исследовательское, тревожно-подобное и депрессивно-подобное поведение, а также пространственное и ассоциативное обучение. Мы обнаружили значительные улучшения в динамике пространственного обучения в водном лабиринте Морриса у животных со сверхэкспрессией CDFN. В то же время не было обнаружено эффекта CDFN на другие исследованные формы поведения. Поведение опытных животных в условиях домашней клетки не отличалось от такового в контрольной группе, за исключением снижения общего количества съеденной пищи и некоторого увеличения количества эпизодов сна в светлую фазу суток. В данном исследовании также была предпринята попытка определить молекулярную основу упомянутых выше изменений посредством экспрессионного анализа. Нами не было обнаружено значительных изменений в уровне мРНК генов, кодирующих рецепторы основных нейротрансмиттерных систем, вовлечённых в нейропластичность, выживание нейронов, а также ключевых киназ. Однако у животных со сверхэкспрессией CDFN было выявлено повышение уровня мРНК сплайсированной формы Xbp, что может говорить об активации Ire1α/Xbp1-пути, традиционно ассоциируемого со стрессом эндоплазматического ретикулума (ЭПР). С помощью иммуногистохимического анализа было показано, что CDFN колокализован с маркером ЭПР кальретикулином. Таким образом, обнаруженные нами эффекты CDFN на поведение могут быть опосредованы специфическим молекулярным каскадом, что подчёркивает его отличие от классических нейротрофических факторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейротрофические факторы, дофаминовый нейротрофический фактор мозга CDFN, депрессивно-подобное поведение, обучение, стресс ЭПР, реакция несвёрнутых белков UPR.

DOI: 10.31857/S0320972523080031, **EDN:** IHUIUU

ВВЕДЕНИЕ

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor, CDFN) был открыт относительно недав-

но, в 2007 году, но с тех пор привлёк большое внимание исследователей. Известно, что CDFN значительно отличается от других нейротрофических факторов (НТФ). Так, его гомология с астроцитарным мезэнцефальным

Принятые сокращения: БП – болезнь Паркинсона; НТФ – нейротрофические факторы; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; AAV – аденоассоциированный вирусный вектор; ASC – линия мышей с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению; CDFN – дофаминовый нейротрофический фактор мозга; IRE1α – эндорибонуклеаза инозитол-требующий фермент 1 α; MANF – мезэнцефалический астроцитарный нейротрофический фактор; UPR – реакция развёрнутых белков; XBP1 – X-box-связывающий белок.

* Адресат для корреспонденции.

НТФ (MANF) составляет 59%, а с другими НТФ гомология не прослеживается; CDNF не связывается с общими для остальных НТФ рецепторами, не имеет проформы [1]. Кроме того, для него не были идентифицированы рецепторы на клеточной мембране, что позволило выделить его и MANF в отдельное семейство. Оба этих белка имеют двойственную природу и могут как секретироваться клеткой, так и оказывать протективное действие изнутри, «заякореваясь» в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [2].

Повышенный интерес к CDNF связан в первую очередь с его нейропротекторными свойствами. Принято выделять два механизма, которые их обеспечивают. Первый обусловлен нахождением белка в просвете ЭПР и заключается в модуляции реакции несвёрнутых белков (unfolded protein response, UPR), которая позволяет избежать стресса ЭПР и нейровоспаления. Второй же механизм предполагает высвобождение CDNF и его связывание с неидентифицированным рецептором, активирующим внутриклеточные сигнальные каскады. Рекомбинантный белок CDNF проявил выраженное нейропротекторное действие на дофаминергические нейроны среднего мозга в двух фармакологических моделях болезни Паркинсона (БП): на получавших 6-гидроксидофамин (6-OHDA) крысах [1, 3] и получавших 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (MPTP) мышах [4]. Позже нейропротекторный эффект CDNF был показан также на получавших 6-OHDA мармозетках, однако он оказался менее выраженным, чем у грызунов [5].

Описанные выше отличительные особенности CDNF продиктованы его молекулярной структурой. В структуре CDNF выделяют неструктурированный С-конец и глобулярный N-конец, которые соединены гибким линкером [6]. N-Конец содержит сигнальную последовательность, необходимую для трансляции в ЭПР, а также сапозиноподобный домен, способный контактировать с мембранами и липидами [2, 7]. На С-конце, в свою очередь, у CDNF находится последовательность, ответственная за удержание CDNF в просвете ЭПР (ER retention sequence; ERS) [8, 9]. С-Концевой мотив CXXC традиционно ассоциируют с цитопротекторным и антиапоптотическим действием, в то время как наличие N-терминального домена предполагает нейротрофные функции [10, 11].

Однако нейротрофические функции CDNF остаются слабо изученными. В первую очередь это касается его роли в регуляции нор-

мального и патологического поведения. Было проведено небольшое количество исследований, призванных установить влияние CDNF на поведение животных, но зачастую исследователи ограничивались лишь оценкой моторного поведения на различных моделях БП. Интересно, что нокаут гена *Cdnf* на мышах не привёл к существенным различиям в базовой двигательной активности, привыкании к новой среде, депрессивно-подобном или тревожно-подобном поведении [12]. В то время как у рыбок *Danio rerio* нокаут гена *Cdnf* вызывает нарушение социального поведения, снижение тревожности и повышение судорожной активности. Более того, у таких мутантных по гену *Cdnf* рыбок были зафиксированы нарушения не только со стороны дофаминовой системы, но и дефицит ГАМКергических и гистаминергических нейронов, что подтверждает роль CDNF как универсального регулятора нейрогенеза, необходимого для формирования медиатор-специфических типов нейронов [13]. Ранее было показано, что введение в гиппокамп CDNF или трансгена CDNF улучшает долговременную память, не влияя на исследовательское поведение, неophobia и пространственное обучение в экспериментальной модели болезни Альцгеймера – у мышей линии APP/PS1 [14]. Кроме того, было показано, что CDNF способен активировать PI3K/Akt-сигнальный путь как *in vitro*, так и *in vivo*, причём даже в неповреждённом мозге [15]. Поскольку указанный сигнальный путь является необходимым компонентом процесса долговременной потенциации, можно предположить, что CDNF принимает самое активное участие в процессах нейропластичности, связанных с обучением и памятью. Учитывая, что гиппокамп, особенно его дорсальная часть, – критически важная структура для обучения [16], памяти [17], пространственной навигации [18] и регуляции настроения [19] – большой интерес представляет изучение функций CDNF в регуляции гиппокамп-зависимого поведения. Однако на сегодняшний день этот аспект остаётся малоизученным. Также ничего не известно об участии CDNF в механизмах депрессии и действия антидепрессантов.

Линия мышей ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) была выведена путём длительной селекции на высокую предрасположенность к катаlepsии популяции беккроссов (CBA × (CBA × AKR)) от скрещивания чувствительной (CBA) и устойчивой (AKR) к катаlepsии линий [20, 21]. Мыши линии ASC демонстрировали каталептическое замирание [22], которое значительно снижалось при хроническом

введении классических антидепрессантов имипрамина и флуоксетина [23, 24]. Было установлено, что, в отличие от родительских линий, для ASC характерно увеличение неподвижности в тестах «принудительное плавание» и тесте «подвешивание за хвост», а также снижение двигательной активности, что интерпретируется как депрессивно-подобное поведение [25]. Подтверждением валидности модели ASC является также снижение депрессивно-подобного поведения в ответ на внутрижелудочковое введение рекомбинантного BDNF [26], которому в настоящее время отводится одно из ключевых мест в механизме депрессивных расстройств [27–29]. Кроме того, мыши линии ASC демонстрируют повышенную тревожность по сравнению с родительской линией [30]. Таким образом, линия мышей ASC была предложена в качестве новой животной модели для изучения механизмов депрессии [26], действия антидепрессантов и хорошо подходит для исследования эффектов CDNF в контексте патологий поведения.

Целью настоящей работы являлось исследование эффектов сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на поведение и экспрессию ряда ключевых генов, вовлечённых в процессы нейрональной пластичности у мышей линии ASC с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению. Гены-кандидаты (согласно базе данных KEGG; https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=mtmu) включали следующие группы: рецепторы основных нейромедиаторных систем (серотониновые, дофаминовые, глутаматные); белки, вовлечённые в нейропластичность (*Arc*, *c-Fos*, *Syn*, *Bdnf*); белки, регулирующие выживание нейронов (*Bax*, *Bcl-xl*); белки системы протеостаза (*Atf6*, *Grp78*, *Perk*, *Ire1a*); транскрипционные факторы (*Creb*, *Nfxb*, *Xbp1*); а также киназы (*Akt1*, *Mapk3*, *Pik3r1*, *Kalrn*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн эксперимента. Эксперимент производился в три этапа (рис. 1). Первый этап: введение аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), кодирующего целевой белок или флуоресцентную метку, и тестирование животных в условиях домашней клетки спустя 4 недели с момента инъекции. Такой временной промежуток после введения AAV является оптимальным для достаточной наработки исследуемого белка и подобран на основании литературных данных [31] и исследований, проводившихся в нашей лаборатории [32, 33].

В группе, получавшей AAV-EGFP, – 11 животных; в группе, получавшей AAV-CDNF, – 11 животных.

Второй этап: введение вирусного вектора, кодирующего целевой белок или флуоресцентную метку, и тестирование животных для определения депрессивно-подобного, тревожно-подобного, исследовательского поведения, а также пространственного обучения. Размер выборки в каждой группе $n \geq 8$.

Дополнительно было оценено депрессивно-подобное поведение в тесте принудительного плавания, и так как этот тест обладает выраженным стрессирующим воздействием, данный тест был проведён отдельно – третьим этапом. В группе, получавшей AAV-EGFP, – 6 животных; в группе, получавшей AAV-CDNF, – 7 животных.

Животные. Эксперименты проводились на взрослых самцах мышей линии ASC, которая была выведена путём длительной селекции на предрасположенность к каталепсии в лаборатории нейрогеномики поведения Института цитологии и генетики СО РАН. Инъекцию обеим группам животных осуществляли в возрасте 2 мес.

Животных содержали в ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН по 4–5 особей в стандартных лабораторных условиях со свободным доступом к воде и пище. За 2 дня до проведения поведенческих тестов животных рассаживали в отдельные клетки для снятия групповых эффектов.

Плазмиды. В лаборатории был создан и верифицирован аденоассоциированный вирусный вектор, несущий плазмиду pAAV-Syn-CDNF-EGFP, которая кодирует ген *Cdnf* мыши, а также зелёный флуоресцентный белок (*EGFP*), необходимый для контроля эффективности экспрессии плазмиды в нейронах млекопитающих. Контрольная группа получала аналогичный вектор, кодирующий только *EGFP*. Карты плазмид AAV-Syn-Cdnf-EGFP и AAV-Syn-EGFP, использованных в настоящем исследовании, показаны на рис. 2, а. Все этапы клонирования были проверены секвенированием по Сэнгеру.

Клеточная культура и трансфекция. Клетки НЕК 293FT # РТА-5077 («АТСС», США) использовали для получения векторов рекомбинантного аденоассоциированного вируса.

Линию клеток поддерживали в среде DMEM, содержащей 10% FBS («Sigma-Aldrich», США) и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина («Sigma-Aldrich»), при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Клетки пассировали при конfluентности не менее 70%, и культуральную среду обновляли каждые 2–3 дня.

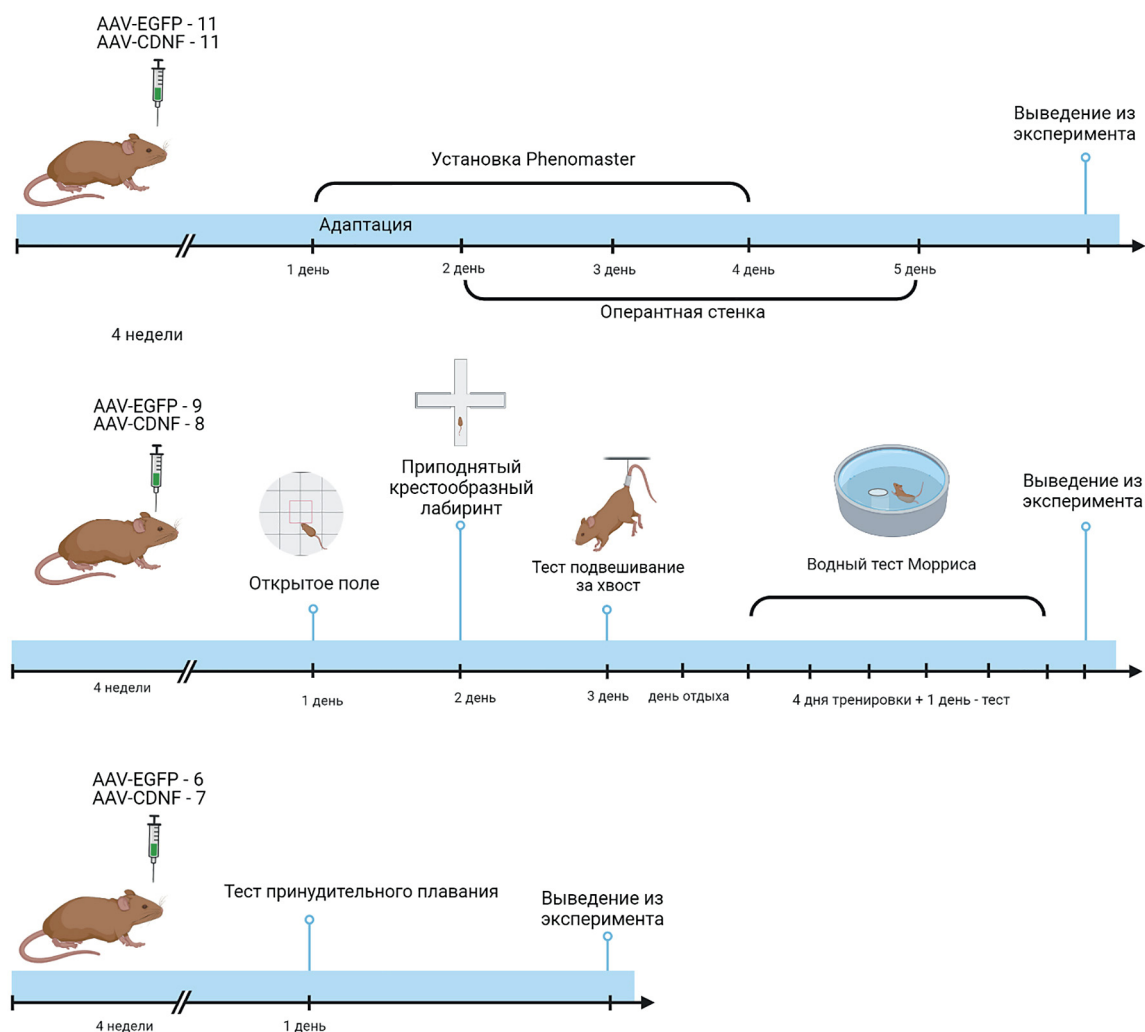


Рис. 1. Дизайн эксперимента. Мышам опытной группы стереотаксически вводили в гиппокамп pAAV-Syn-Cdnf-EGFP (экспрессирующую *Cdnf*), в гиппокамп мышей контрольной группы вводили pAAV-Syn-EGFP (экспрессирующую только *EGFP*). Через 4 недели мышам изолировали в индивидуальные клетки и затем проводили поведенческие тесты

Аденоассоциированные вирусы. Упаковку AAV-Syn-Cdnf-EGFP и AAV-Syn-EGFP в капсулы AAV проводили путём котрансфекции с плазмидами AAV-DJ и pHelper («Cell Biolabs Inc.», США) в НЕК-клетки. Количество полученных вирусных частиц определяли методом количественной ПЦР (кПЦР).

Стереотаксическое введение в гиппокамп. Перед проведением процедуры животных наркотизировали смесью 2,2,2-трибромэтанола и 2-метил-2-бутанола; после разрезания кожи на череп помещали в стереотаксическую установку («TSE Systems», Германия). Далее череп билатерально просверливали, согласно координатам AP: -2,0 мм; ML: 1,5 мм; DV: 2,0 мм (<http://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/?ml=1.5&ap=-2&dv=2>). Вирусные частицы (1 мкл), разведённые в 1× PBS до концентрации 10^9 вирусных частиц в мкл, медленно вводили микрошприцем в гиппокамп со скоростью 0,1 мкл/мин в течение 10 мин. После инъекции иглу остав-

ляли в месте инъекции ещё на 2 мин, чтобы минимизировать утечку вирусной суспензии при извлечении иглы. До начала эксперимента 6 животным линии ASC была сделана пробная стереотаксическая инъекция AAV-EGFP в гиппокамп, чтобы с помощью дальнейшего морфологического контроля убедиться в правильности выбранных координат.

Экстракция образцов мозга. Мыши были декапитированы через 24 ч после тестирования поведения. Мозг был извлечён в тот же день (12:00–14:00) на лёд, образцы целого гиппокампа были выделены в соответствии с онлайн-атласом мышиного мозга (https://scalablebrainatlas.incf.org/mouse/ABA_v3), заморожены в жидком азоте и хранились при температуре -80°C до процедур выделения РНК или вестерн-блот-анализа. Для анализа экспрессии генов интереса использовались образцы мозга животных второго этапа, прошедших поведенческое тестирование. Так как инъекции

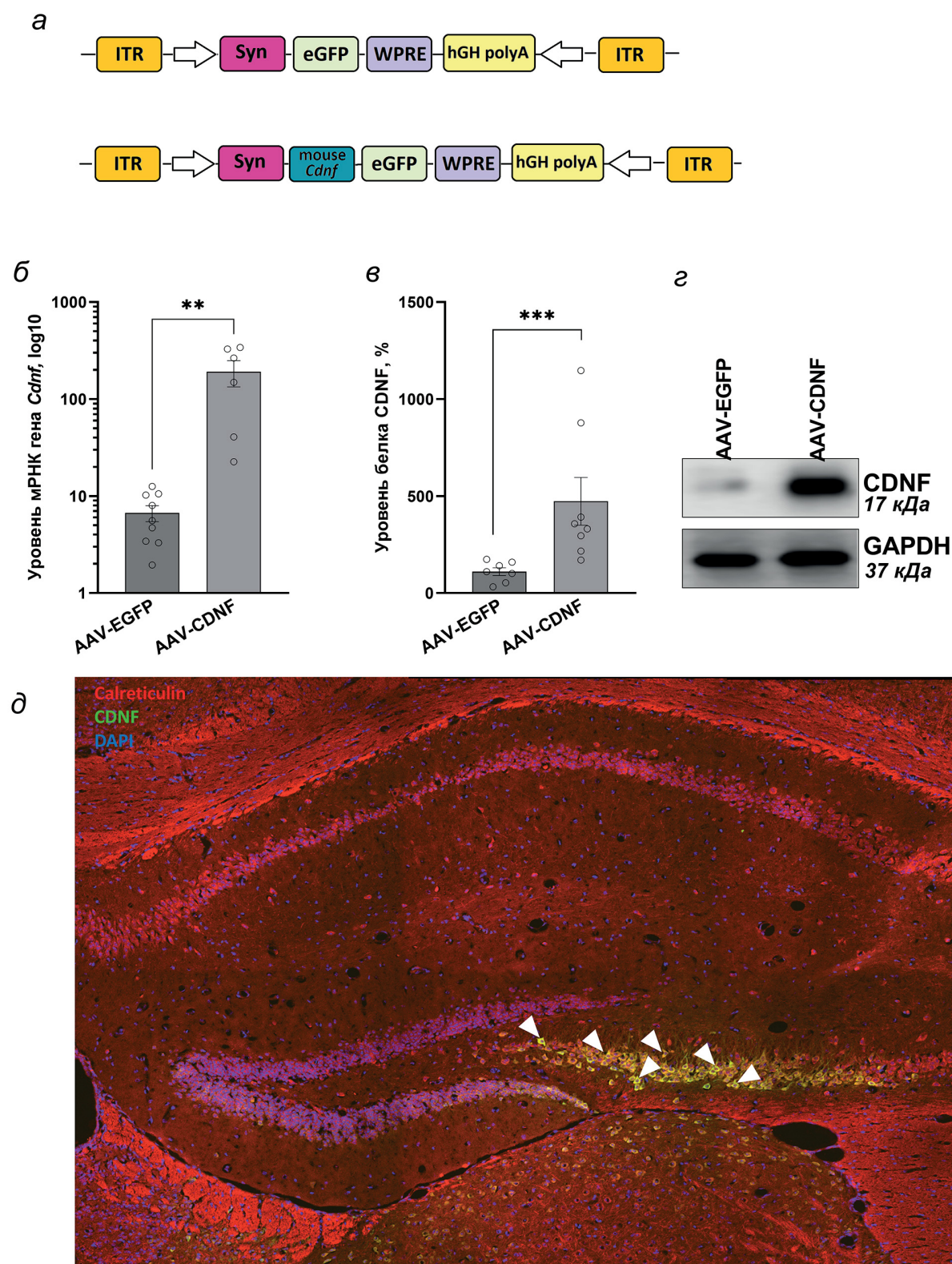


Рис. 2. Сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе мышей ASC. **a** – Карты плазмид pAAV-Syn-EGFP и pAAV-Syn-Cdnf-EGFP. **б** – Уровень мРНК гена *Cdnf*. **в** – Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала для белка CDNF, и результат иммуноблота на мембране (**г**). Число копий кДНК гена отнесено на 100 копий кДНК *rPol2*. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ – по сравнению с контролем. **д** – Совместная локализация кальретикулина и трансдуцированного CDNF в CA3-области и зубчатой извилине гиппокампа (масштабная линейка – 100 мкм). Срезы гиппокампа подвергали иммуногистохимическому окрашиванию для обнаружения CDNF (зелёный) и кальретикулина (красный) с последующей конфокальной микроскопией. Ядра показаны синим цветом. Колокализация показана жёлтым цветом, наиболее репрезентативные клетки отмечены стрелками

вирусного вектора осуществлялись билатерально, определение уровней мРНК и белка проводили по отдельности, используя левую или правую половины гиппокампа. Образцы гиппокампа животных первого и третьего этапов эксперимента использовали только для определения уровня мРНК с целью подтверждения сверхэкспрессии CDNF.

Суммарную РНК выделяли с помощью ExtractRNA («Евроген», Россия), обрабатывали ДНКазой без РНКазной активности (RNase free DNase, 1000 о.е./мл; «Promega», США) в соответствии с протоколами производителей. Концентрацию РНК оценивали с помощью спектрофотометра Eppendorf Nanodrop 2000C («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). РНК разводили водой до концентрации 0,125 мкг/мкл и хранили при -80°C .

Реакция обратной транскрипции. Полученную общую РНК в количестве 1 мг смешивали с рандомными гексануклеотидными праймерами (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2,25 мкмольями стерильного KCl. На амплификаторе («БИС», Россия) производили денатурацию при 94°C в течение 5 мин и отжиг — при 41°C в течение 15 мин, после чего на льду непосредственно добавляли по 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу M-MLV (200 ед.), а также Tris-HCl (pH 8,3; 0,225 мкмоль), смесь dNTP (0,015 мкмоль каждого), DTT (0,225 мкмоль) и MnCl_2 (0,03 мкмоль). Полученную смесь инкубировали при 41°C в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при температуре -20°C .

Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 System («Roche», Швейцария). кДНК (1 мкл) смешивали с 19 мкл смеси Master mix («Синтол», Россия), приготовленной согласно инструкции производителя. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл. 1), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании «БИОССЕТ» (Новосибирск). Серия разведений геномной ДНК с концентрацией 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл была амплифицирована одновременно в отдельных пробирках и была использована как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Для контроля специфичности амплификации использовался анализ кривой плавления для каждого прогона каждой пары праймеров. Калибровочная кривая была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 («Roche Applied Science»).

Экспрессию генов представляли как отношение количества копий кДНК анализируемого гена к 100 копиям гена *rPol2*, выполняющего функцию внутреннего стандарта [34–36]. Для сплайсированной (*sXbp*) и несплайсированной (*uXbp*) форм *Xbp* расчёт производился по методу $\Delta\Delta\text{Ct}$ с помощью программного обеспечения амплификатора.

Вестерн-блот-анализ. Для определения уровня общего белка образцы ткани гомогенизировали («Kimble Chase», США) в 300 мкл лизирующего буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl (pH 8,4), 300 мМ NaCl, 4 мМ EDTA, 0,2% (w/v) Triton X-100; 1 мМ NaVO_4 , 2 мМ PMSF, 1 мМ смеси ингибиторов протеаз (химостатин, лейпептин, антипаин, пепстатин; «Sigma-Aldrich») и ингибиторы фосфатаз (PhosSTOP; «Roche») из расчёта одна таблетка на 10 мл буфера. Гомогенат инкубировали на льду 60 мин и центрифугировали (12 000 g, 15 мин). Супернатант белка переносили в чистые пробирки и хранили при температуре -80°C . Количество общего белка было измерено по методу BCA с использованием коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific Inc.»). Пробы разводились до концентрации 1500 мкг/мл с помощью 2-кратного буфера Лэммли (2,5 мл буфера Лэммли получали смешиванием 147 мкл 1 М Tris-HCl (pH 6,8), 470 мкл 10%-ного SDS, 235 мкл глицерола, 117 мкл 5%-ного β -меркаптоэтанола и 1,5 мл воды) и хранились при температуре -20°C . Проводили термическую обработку проб для денатурации белка (5 мин, 95°C). Экстракты белка (15 мкг на дорожку) разделяли с помощью 10%-ного разделяющего SDS-PAGE. Для электрофореза использовалась камера Hoefer SE 600 («Hoefer Inc.», США) и источник питания EPS 301 («Amersham Pharmacia Biotech», Великобритания). Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) с помощью системы для полусухого электроблоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System («Bio-Rad») в течение 2 ч при силе тока 0,9 А. В качестве маркера использовалась смесь Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards («Bio-Rad»).

Для иммунодетекции белка мембрану блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком, разведённом в буфере TBS-T (Tris Bufferdd Saline, «Bio-Rad Laboratories Inc.», США) с добавлением 0,05% (v/v) Tween 20, в течение часа при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи (табл. 2).

После первичных антител мембрану отмывали 5 раз по 5 мин буфером TBS-T и инку-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Температура отжига, °C	Длина ПЦР продукта, п.н.
<i>Htr1a</i>	F: CTGTGACCTGTTTATCGCCCTG R: GTAGTCTATAGGGTCGGTGATTGC	62	109
<i>Htr2a</i>	F: AGAAGCCACCTTGTGTGTGA R: TTGCTCATTGCTGATGGACT	61	169
<i>Htr2b</i>	F: AGAAAAGGTGGCAATGCTGG R: TTAGAAATGGTTTGGGCTGATCT	59	120
<i>Htr7</i>	F: GGCTACACGATCTACTCCACCG R: CGCACACTCTTCCACCTCCTTC	65	198
<i>Akt-1</i>	F: TGCCAGCTGATGAAGACAGA R: CCATTCTTCCCGCTCCTCAG	60	120
<i>Arc</i>	F: ATCTGTTGACCGAAGTGTCCAAG R: GAAGACCTCCCTCCACACGT	64	218
<i>Atf6</i>	F: CTCAAACCAATGCCAGTGTCC R: ATGCTGATAATCGACTGCTGC	59	94
<i>Avpr1a</i>	F: GACATCACCTACCGCTTCCG R: CCAAGAGGCGGCGATCAT	60	192
<i>Bax</i>	F: CATCTTTGTGGCTGGAGTCCTC R: AAGTGGACCTGAGGTTTATTGGC	64	216
<i>Bcl-xl</i>	F: TGGATCTCTACGGGAACAATGC R: GTGGCTGAAGAGAGATTGTGG	64	197
<i>Bdnf</i>	F: TAGCAAAAAGAGAATTGGCTG R: TTTCAGGTCATGGATATGTCC	59	255
<i>Cdnf</i>	F: CGGTGGACCTGTGGAAGATG R: ACATATTTGGGGGCCAGCTC	60	130
<i>c-Fos</i>	F: AAAGAGAAGGAAAACTGGAG R: CGGAAACAAGAAGTCATCAA	58	264
<i>Creb</i>	F: GCTGGCTAACAATGGTACGGAT R: TGGTTGCTGGGCACTAGAAT	64	140
<i>Drd1</i>	F: GGAAACCCTGTCGAATGCTCTC R: CAGCCAAACCACAAATACATCG	64	195
<i>Drd2</i>	F: TCCGCCACTTCTTGACATACATTG R: CCCATCCACAGCCTCCTCTAAG	64	132
<i>Gria1</i>	F: CAATGAAGCCATACGGACATCG R: GGATTGCATGGACTTGGGGA	60	121
<i>Gria2</i>	F: GTGTTTGTGAGGACTACGGC R: TTCATGGTGTGCGAAGGCT	60	125
<i>Grik1</i>	F: GACTCGCTGGAACACCCTT R: TCTTCGTACACCACCGTCAC	60	141
<i>Grik2</i>	F: AGGAGACAGTCTGTGCTTGTC R: CCACCAATCTGCGTGAGGT	60	137
<i>Grin1</i>	F: TTTTCTCCTGCTCCTTCGCC R: TGTCGCTTATTGGCCTGGTT	60	124
<i>Grin2a</i>	F: TGAACCGCACTGACCCTAAG R: CACAGCCTCTTGGTCCGTAT	60	107

Таблица 1 (продолжение)

Ген	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Температура отжига, °C	Длина ПЦР продукта, п.н.
<i>Grin2b</i>	F: CTATCACCATCACCACCGGC R: TCATCATGGCCACTGTAGCG	60	210
<i>Grm1</i>	F: CGCACACTCGGACAAAATCT R: AGTGAGAACTCTCCACGAC	59	177
<i>Grm2</i>	F: GGAACAACAGCAGGAACCCT R: CACGGCATTGACCACAAACAT	60	146
<i>Grm3</i>	F: AGCAAGGCTACGCAACATCT R: CACCCAGGTGAAGGAAGCAT	60	196
<i>Grm4</i>	F: GAGCGGAAGAAGACGGTGAA R: TGACAATGGGTATGGGCTGG	60	157
<i>Grm5</i>	F: CCCACACTCTTGCCCAACAT R: ACAGCGTACCAAGCCTTCTT	60	141
<i>Grp78</i>	F: CGCTCTACCATGAAGCCTGT R: AGCCTCATCGGGGTTTATGC	60	174
<i>Ire1a</i>	F: TCTGGGGATGTCCTGTGGAT R: CTTGGCCTCTGTCTCCTTGG	60	195
<i>Kalrn</i>	F: CATGGTGTCTGTGGAGGGC R: CCGCACTGTTGAAGAACTCC	60	137
<i>Mapk3</i>	F: TGCCCTCGAAAACCAAGGTG R: CGAAGGTGAATGGCTCCTCG	61	195
<i>Nfya1</i>	F: CGTCTGTCTGCTCTCTCTCGAC R: CTCGCCTCGGTACTTCTCTCTC	62	152
<i>Perk</i>	F: ACAACAGTGAAGTCAAGCGGAC R: GCAGCCAGAGTCTCAAACA	60	194
<i>Pik3r1</i>	F: TCCGAAAGACTCTAGCCTTGG R: CATGCTGCTTGATGGTGTGG	60	132
<i>Plcg1</i>	F: TTCTACTCCAAGAAGTCGCAGC R: GACCCCTCGATTTTGTCCGC	61	104
<i>rPol2</i>	F: GTTGTCGGGCAGCAGAATGTAG R: TCAATGAGACCTTCTCGTCCTCC	61	188
<i>sXbp1</i> (кДНК)	F: GCTGAGTCCGCAGCAGGT R: CAGGGTCCAACCTGTCCAGAAT	60	130
<i>Syp</i>	F: GTTGGTGACTACTCCTCCTCG R: GCCCTTTGTGTTCTCTCGGTA	60	127
<i>uXbp1</i>	F: CAGACTACGTGCACCTCTGC R: CAGGGTCCAACCTGTCCAGAAT	60	139

бирова́ли со вторичными поликлональными антителами (табл. 2), конъюгированными с пероксидазой хрена, при комнатной температуре в течение часа. Затем мембрану снова отмывали 5 раз по 5 мин буфером TBS-T.

Связанные антитела визуализировались с помощью Clarity Western ECL («Bio-Rad»), в

соответствии с инструкцией производителя, и сканера C-Digit Blot Scanner («Li-Cor», США). Для каждой мембраны проводилось измерение конститутивного белка GAPDH в качестве внутреннего стандарта для дальнейшей нормировки. Экспрессия белка выражалась в относительных единицах. Плотность бендов

Таблица 2. Характеристики используемых в работе антител

Белок	Первичные антитела		Вторичные антитела: разведение, шифр производителя
	Разведение	Шифр производителя	
CDNF	1 : 500	Pag458Mu01 («CloudClone», США)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 («Invitrogen», США)
CREB	1 : 1000	Ab 3138 («Abcam», Великобритания)	
pCREB	1 : 1000	Ab 32096 («Abcam»)	
MAPK	1 : 1000	Ab 17942 («Abcam»)	
p-MAPK	1 : 1000	9101 («Cell Signaling Technology», США)	
cFos	1 : 500	Sc-52 («Santa Cruz», США)	Против кролика 1 : 8000 G-21234 («Invitrogen»)
p-cFos	1 : 1000	D82c12 («Cell Signaling Technology»)	
GAPDH	1 : 10000	Ab 8245 («Abcam»)	Против мыши 1 : 30 000 ab6728 («Abcam»)

определялась с помощью денситометрии для количественной оценки содержания белка при помощи программы Image Studio Lite 5.2.

Иммунофлуоресцентный анализ. Спустя 4 недели после инъекции животных транскардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) и 4%-ным раствором параформальдегида. Мозг извлекали и постфиксировали 4%-ным параформальдегидом на 6 ч, затем погружали в 30%-ный раствор сахарозы в PBS на 2 дня. Последовательные срезы толщиной 8 мкм делали в криостате («Thermo Scientific», США). Пермеабиллизацию проводили погружением в 0,3%-ный раствор Triton X-100 (T8787, «Sigma-Aldrich») на 30 мин. Неспецифическое связывание блокировали 5%-ной нормальной ослиной сывороткой («Sigma-Aldrich») и 0,1%-ным Triton X-100 в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубацию с антителами anti-Calreticulin [FMC 75] (1 : 1000, ab22683, «Abcam») и anti-CDNF (1 : 1000; «Icosagen AS», Эстония), разведённым в PBS, проводили в течение ночи при 4 °C. После промывания в PBS наносили вторичные антитела с флуоресцентными метками на 1 ч при комнатной температуре (1 : 400, #711-545-152 Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG и 1 : 200 #A-21203 Donkey anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594). Ядра клеток окрашивали раствором бис-бензида (краситель Hoechst 33258 (5 мкг/мл в PBS); «Sigma-Aldrich»). Срезы помещали в монтирующую среду (Fluoromount G; «Associates Biotechnology Southern», США) с последующим микроскопическим анализом с использованием конфокального микроскопа Olympus IX83P2ZF («Olympus Corp.», Япония).

Поведенческие тесты. Тесты в условиях домашней клетки. В течение 96 ч с помощью установки PhenoMaster («TSE Systems») автоматически регистрировались такие физиологические показатели, как: пройденный путь (м), потребление пищи (г) и воды (мл), время и число эпизодов сна (мин). Неподвижность животного оценивалась периодами по 10 с, и программа считала животное спящим, если фиксировала 4 периода неподвижности подряд (равнозначно одному эпизоду сна). Таким образом, программное обеспечение установки PhenoMaster определяло состояние сна как неподвижность в течение 40 с и более.

В течение 3 дней у животных исследовали когнитивные способности с помощью теста «оперантная стенка». Начало теста всегда совпадало с началом периода активного бодрствования животных, сигналом служил свет лампочки, встроенной в модуль. Модуль был запрограммирован таким образом, что на первый день животное получало простейшую задачу — получить вознаграждение в виде сладкой гранулы, совершая тычок носом в отверстие, помеченное горячей лампочкой. На второй день задача усложнялась — теперь, чтобы получить вознаграждение, необходимо было выполнить тычки носом в 2 помеченных светом отверстия. На третий день задача отличалась от предыдущего, однако отверстия уже не были помечены светом — животное должно было само вспомнить необходимую последовательность действий.

Продолжительность тестирования каждый день составляла не более 120 мин. Окончание теста наступало, когда животное получало все гранулы (всего 10 штук), либо автоматически,

по истечении указанного интервала. Запись параметров начиналась после первого тычка в отверстие.

Для нижеописанных тестов для снятия групповых эффектов за 2 дня до экспериментов животных рассаживали в индивидуальные клетки.

Тест «открытое поле» (*open field*). Установка для этого теста представляет собой арену с диаметром 40 см и высотой стенок 25 см. Полупрозрачный пол освещался снизу двумя галогеновыми лампами мощностью 12 Вт, расположенными на 40 см ниже. Испытуемое животное помещали около стенки арены и тестировали в течение 5 мин. С помощью оригинального программного обеспечения «EthoStudio» проводилась автоматическая регистрация общей длины пройденного пути, площади покрытия арены и времени, проведённого в центре арены (диаметр 20 см) [37]. Число вертикальных стоек и эпизоды умывания подсчитывались вручную.

Тест «подвешивание за хвост» (*tail suspension test*). Установка представляет собой горизонтальную штангу, расположенную на высоте 30 см, на которой с помощью липкой ленты животные фиксируются за хвост. В этом положении животные не могут сбежать или же ухватиться за ближайшие поверхности. Чтобы предотвратить карабкание животных по хвосту, на него надевается пластиковый гладкий цилиндр. При подвешивании мыши за хвост регистрировалось время неподвижности и число эпизодов неподвижности. Подвижность в этом тесте определялась как любые произвольные движения животных: попытки дотянуться до стенок установки и перекладины, сильная тряска или движения конечностей, похожие на бег; маятникообразные раскачивания, возникающие в связи с предыдущими движениями, подвижностью не считались. Продолжительность тестирования составляла 6 мин, производилась видеорегистрация теста.

Приподнятый крестообразный лабиринт (*elevated plus maze*) — это пересекающиеся под прямым углом рукава, два из которых открыты и два закрыты. Длина рукавов составляла 30 см, ширина — 6 см, расстояние над уровнем пола — 60 см. Закрытые рукава имели стенки из непрозрачного пластика высотой 20 см (безопасные рукава). Животное помещали на место пересечения четырёх рукавов лабиринта, лицом по направлению к открытому рукаву. В последующие 5 мин с использованием оригинального программного обеспечения «EthoStudio» фиксировались следующие показатели: время пребывания в открытых и

закрытых рукавах, а также исследованная площадь рукавов. Число выглядываний из закрытого рукава и свешивания с края арены подсчитывались вручную.

Тест принудительного плавания (*forced swim test*). Мышь помещали в прозрачный стеклянный цилиндр диаметром 15 и высотой 25 см, наполненный водой ($t = 25^{\circ}\text{C}$). После 2-минутного периода адаптации, в течение 4 мин автоматически регистрировалась подвижность, а также вручную регистрировалась неподвижность животного с помощью оригинального программного обеспечения «EthoStudio». Для расчёта уровня подвижности программа измеряла скорость изменения силуэта животного, которая определялась как количество пикселей, связанных с животным, изменённых между двумя соседними кадрами [38, 39].

Водный лабиринт Морриса (*Morris water maze*). Установка для теста представляла собой круглый бассейн диаметром 110 см со стенками высотой 30 см. Бассейн заполняли водой (температура — 25°C , высота столба воды — ~ 15 см) и добавляли сухое молоко для непрозрачности. В программе «EthoStudio» установка делилась на 4 сектора. Стеклоплатформа диаметром 6 см помещалась в геометрический центр нижнего правого сектора так, что она оказывалась на 0,5 см ниже уровня воды, становясь невидимой для животных. На ближайшую к платформе стену бассейна клеили чёрный прямоугольник размером 6×12 см, который служил визуальным ориентиром. Животное автоматически трассировалось при помощи веб-камеры, и его поведение анализировалось в программе «EthoStudio».

Обучение животных проводилось в течение 4 дней, по 3 тестирования каждый раз. При обучении животное помещали в центр одного из секторов, кроме целевого, и в течение 60 с оно искало платформу. Вне зависимости от того, была найдена платформа или нет, в конце каждого тестирования мышь помещали на платформу и удерживали (если требовалось) там в течение 15 с. Параметры, которые измерялись в течение тестирования: латентное время нахождения платформы (с), пройденный путь (см) и суммарное расстояние до платформы (см), которое вычислялось как сумма расстояний от мыши до платформы в каждый момент времени. Считалось среднее по трём тестированиям.

На пятый день проводили контрольное тестирование для проверки качества формирования пространственной памяти у животных. Для этого платформу убирали, животное помещали в центр бассейна и фиксировали

его перемещение в течение 60 с. Оценивали время нахождения в целевом секторе (%), потом считали среднее по трём тестированиям. Статистически значимое превышение времени нахождения в целевом секторе над случайным (25%) свидетельствовало о том, что мышь помнит расположение платформы.

Статистический анализ. Все полученные результаты проверялись на соответствие нормальному распределению по критерию Колмогорова–Смирнова и Диагностини–Пирсона. Экстремальные значения исключались с помощью критерия Диксона. Динамические результаты поведенческого тестирования в домашней клетке (потребление воды, пищи, пройденный путь), а также такие показатели, как латентное время нахождения платформы, расстояние до платформы и пройденный путь в водном тесте Морриса, обрабатывались дисперсионным анализом (ANOVA) для повторных измерений. Также проводилось апостериорное сравнение по Фишеру. Остальные результаты поведенческих тестов, а также все результаты молекулярных методик обрабатывались с помощью *t*-критерия Стьюдента или *U*-критерия Манна–Уитни. Все значения представлены как $m \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сверхэкспрессия CDNF. Интрагиппокампальная инъекция AAV-CDNF вызвала повышение уровня мРНК *Cdnf* более чем в 10 раз ($t = 2,752$; $p = 0,0015$; рис. 2, б). Вестерн-блот-анализ также показал, что уровень белка CDNF в гиппокампе экспериментальных животных значительно вырос ($U = 1$; $p = 0,0006$; рис. 2, в и г). Таким образом, была достигнута сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе экспериментальных животных, что также было подтверждено данными флуоресцентной микроскопии (рис. 2, д). По результатам иммуногистохимического анализа с кальретикулином, проведённому на срезах гиппокампа, было обнаружено, что экспрессируемый CDNF преимущественно локализуется в ЭПР (рис. 2, д).

Эффекты сверхэкспрессии CDNF на поведение в условиях домашней клетки. Сверхэкспрессия CDNF не повлияла на общую физическую активность животных, которая оценивалась по изменению пройденной дистанции ($F_{(1,17)} = 1,81$; $p > 0,05$). В то же время здесь отмечается эффект дня тестирования ($F_{(3,51)} = 22,58$; $p < 0,001$), то есть к четвёртому дню животные проходили меньшее расстояние вне зависимости от группы (рис. 3, а). Общий прой-

денный путь у групп AAV-EGFP и AAV-CDNF ($t = 0,9$; $p > 0,05$) не отличался (рис. 3, б).

Динамика потребления пищи достоверно различалась у разных групп животных ($F_{(1,19)} = 6,18$; $p < 0,05$; рис. 3, в). Апостериорное сравнение выявило достоверную разницу между животными из групп AAV-EGFP и AAV-CDNF на четвёртый день ($p < 0,01$). Эффект дня достоверно отмечается у всех групп ($F_{(3,57)} = 39,53$; $p < 0,001$). Однако взаимодействия факторов сверхэкспрессия $\times$ день тестирования не выявлено ($F_{(3,57)} = 1,4$; $p > 0,05$). Общее потребление пищи оказалось достоверно ниже у животных со сверхэкспрессией CDNF ($t = 2,079$; $p = 0,05$; рис. 3, г).

Сверхэкспрессия CDNF не повлияла ни на динамику потребления воды ($F_{(1,18)} = 0,003$; $p > 0,05$; рис. 3, д), ни на общее количество потреблённой воды ($t = 1,59$; $p > 0,05$; рис. 3, е). Для обеих групп отмечается эффект дня тестирования ($F_{(3,54)} = 4,33$; $p < 0,001$). При апостериорном сравнении установлено, что основной вклад в «эффект дня» осуществляет разница, возникающая к четвёртому дню в группе AAV-EGFP ($p < 0,01$). Взаимодействия факторов не выявлено ($F_{(3,54)} = 0,3$; $p > 0,05$).

Сверхэкспрессия CDNF не оказала влияния на цикл сон/бодрствование. Анализ динамики длительности эпизодов сна и их количества не выявил отличий между исследуемыми группами животных ($F_{(1,20)} = 0,01$; $p > 0,05$ и $F_{(1,20)} = 3,46$; $p > 0,05$ соответственно). Однако как длительность эпизодов сна, так и количество эпизодов достоверно отличаются в зависимости от времени суток ($F_{(89,18)} = 18,74$; $p < 0,001$ и $F_{(89,18)} = 13,82$; $p < 0,001$ соответственно; рис. 4). При этом животные всех групп проявляют меньшую активность в светлое время, что было подтверждено при анализе средней продолжительности эпизодов сна и их количества в зависимости от фазы суток ($F_{(1,4)} = 97,25$; $p < 0,001$ и $F_{(1,4)} = 198,1$; $p < 0,001$ соответственно; рис. 4). Эффект сверхэкспрессии отмечался для количества эпизодов сна ($F_{(1,4)} = 4,32$; $p < 0,05$), но не их средней продолжительности ($F_{(1,4)} = 0,02$; $p > 0,05$) при оценке с учётом фазы суток. Разница объясняется большим количеством эпизодов в группе AAV-CDNF в светлое время суток, выявленным при апостериорном тестировании ($p < 0,05$). Взаимодействия факторов сверхэкспрессия $\times$ фаза суток не выявлено для обоих параметров ($F_{(1,4)} = 0,006$; $p > 0,05$ и $F_{(1,4)} = 1,54$; $p > 0,05$ соответственно).

Сверхэкспрессия CDNF не повлияла на тревожность, депрессивно-подобное и исследовательское поведение. Сверхэкспрессия CDNF

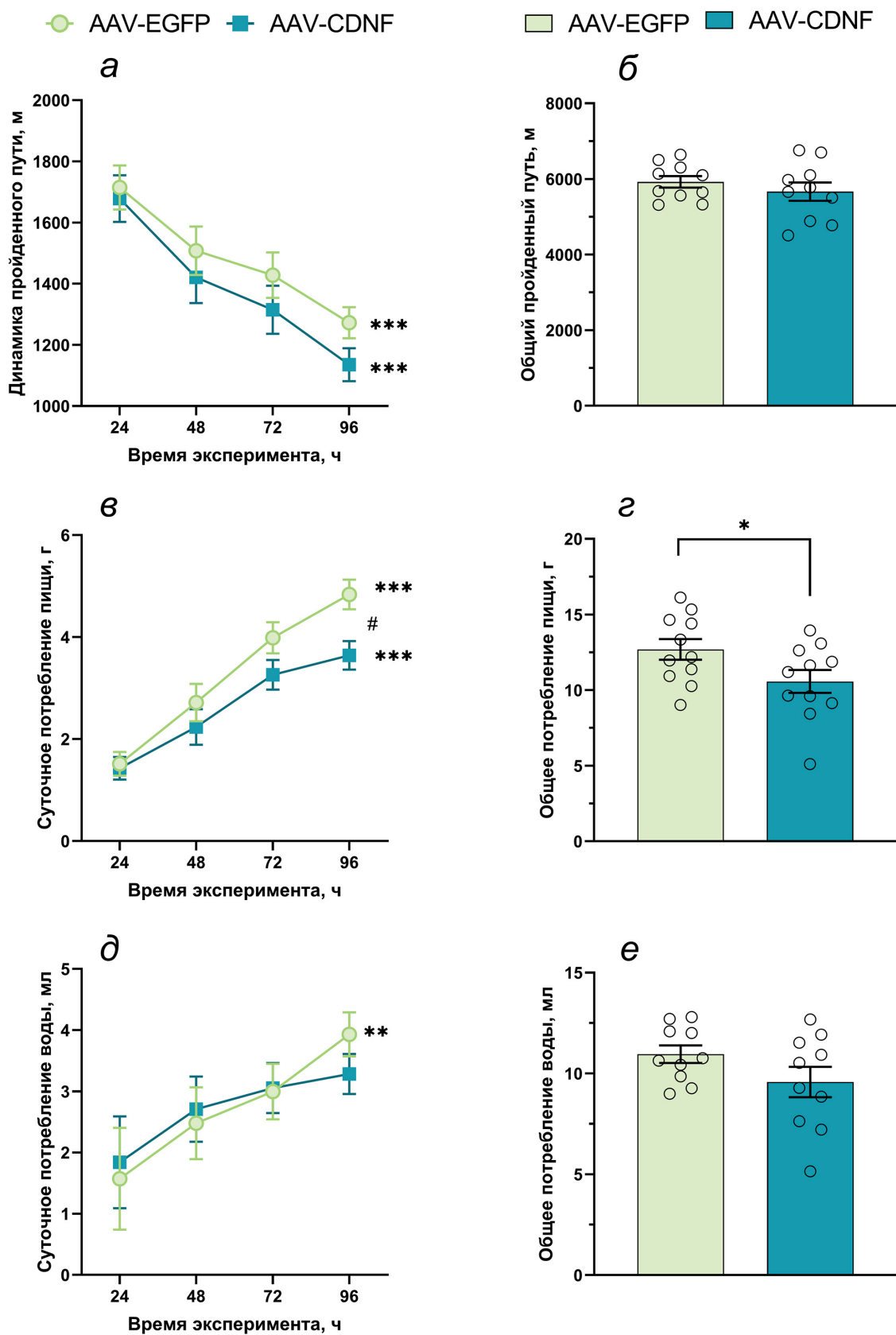


Рис. 3. Поведение животных со сверхэкспрессией CDNF и животных контрольной группы в домашней клетке: *а* – динамика пройденного пути; *б* – общий пройденный путь; *в* – динамика суточного потребления пищи; *г* – общее потребление пищи; *д* – динамика суточного потребления воды; *е* – общее потребление воды. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p = 0,05$ – для обеих групп по сравнению с первым днём; # $p < 0,01$ – для группы AAV-CDNF по сравнению с AAV-EGFP

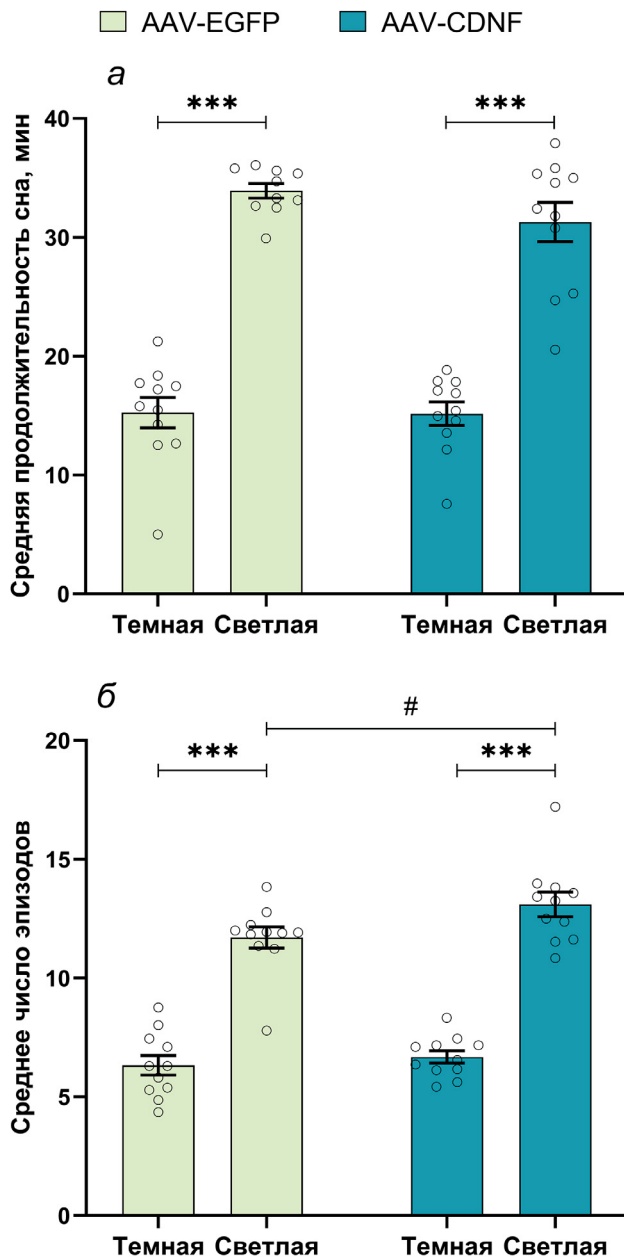


Рис. 4. Средняя продолжительность (а) и среднее количество (б) эпизодов сна животных со сверхэкспрессией CDNF и животных контрольной группы в зависимости от фазы суток. *** $p < 0,001$ – по сравнению с тёмной фазой; # $p < 0,05$ – для группы AAV-CDNF по сравнению с AAV-EGFP

не повлияла на исследовательское и тревожно-подобное поведение ни в тесте «открытое поле», ни в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». По результатам тестов «подвешивание за хвост» и «принудительное плавание» также не было обнаружено эффектов CDNF на депрессивно-подобное поведение (табл. 3).

Эффекты сверхэкспрессии CDNF на обучение. Тестирование в водном лабиринте Мор-

риса показало, что животные экспериментальной группы обучались быстрее. Анализ повторных измерений ANOVA для динамики обучения мышей выявил эффект сверхэкспрессии на латентное время нахождения платформы ($F_{(1,15)} = 4,45$; $p = 0,05$; рис. 5, а) и на суммарное расстояние до платформы в каждый момент времени ($F_{(1,15)} = 6,23$; $p < 0,05$; рис. 5, б). Влияние дня тестирования также отмечалось в обоих случаях ($F_{(3,45)} = 7,14$; $p < 0,001$ и $F_{(3,45)} = 6,92$; $p < 0,001$ соответственно). В свою очередь, на пройденный путь влияла только принадлежность животных к той или иной группе ($F_{(1,15)} = 8,45$; $p = 0,0109$), а эффекта дня не наблюдалось ($F_{(3,45)} = 2,57$; $p > 0,05$; рис. 5, в). Апостериорное сравнение показало, что животные из группы AAV-CDNF уже на второй день тестирования достоверно уменьшали расстояние до платформы по сравнению с первым днём тестирования ($p < 0,05$), в то время как для контрольной группы достоверное отличие появляется только к последнему дню тестирования ($p < 0,05$; рис. 5, б). Также апостериорное сравнение показало уменьшение общего пройденного пути по сравнению с первым днём тестирования только для группы AAV-CDNF ($p < 0,05$), также на второй день выявляется разница по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$; рис. 5, в).

День контрольного теста (без платформы) показал, что животные всех групп провели больше времени в целевой четверти (где ранее располагалась платформа). Этот показатель статистически выше в сравнении с 25%-ной вероятностью случайного нахождения в целевом секторе, что означает устойчивое формирование пространственной памяти у всех экспериментальных животных (рис. 5, г).

Также в условиях домашней клетки был проведён тест «оперантная стенка». Сверхэкспрессия CDNF не повлияла на такие показатели, как количество тычков носом, количество съеденных гранул и общее время тычков носом (табл. 3).

Таким образом, нами впервые показано, что сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе улучшает пространственное обучение у мышей с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению. Вместе с тем CDNF не оказал влияния на ассоциативное обучение, что может указывать на различную роль CDNF в механизмах, контролирующих пространственное и ассоциативное обучение.

Влияние сверхэкспрессии CDNF на экспрессию генов нейропластичности. Учитывая выявленные изменения в поведении мышей,

Таблица 3. Результаты поведенческих тестов

Параметр	M ± SEM		p-значение
	AAV-EGFP	AAV-CDNF	
Тест «оперантная стенка»			
Количество тычков носом	94,40 ± 15,47	54,64 ± 15,63	0,08
Количество съеденных гранул	6,00 ± 1,24	4,10 ± 1,12	0,32
Общее время тычков носом (с)	62,46 ± 16,35	41,32 ± 11,86	0,44
Тест «открытое поле»			
Время, проведенное в центре арены (%)	3,74 ± 1,33	4,49 ± 1,60	0,72
Исследованная площадь арены (%)	66,26 ± 4,28	64,32 ± 6,56	0,80
Пройденный путь (м)	14,27 ± 0,24	14,32 ± 0,57	0,93
Количество вертикальных стоек	2,67 ± 0,82	4,00 ± 1,33	0,39
Количество умываний	0,50 ± 0,19	0,75 ± 0,16	0,61
Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»			
Время, проведенное в открытых рукавах (%)	4,05 ± 0,98	4,35 ± 0,66	0,89
Время, проведенное в закрытых рукавах (%)	87,88 ± 2,62	88,44 ± 1,02	0,86
Исследованная площадь открытых рукавов (%)	17,56 ± 2,78	23,96 ± 1,32	0,07
Исследованная площадь закрытых рукавов (%)	87,55 ± 0,88	87,67 ± 0,68	0,91
Число свешиваний с края установки	4,44 ± 1,12	3,88 ± 0,55	0,67
Число выглядываний из закрытых рукавов	11,44 ± 1,82	15,43 ± 0,90	0,09
Тест «подвешивание за хвост»			
Время неподвижности (с)	79,29 ± 8,34	66,29 ± 3,85	0,19
Количество эпизодов неподвижности	13,44 ± 0,80	14,5 ± 0,70	0,34
Тест «принудительное плавание»			
Мобильность (степень изменения силуэта животного), %	11,26 ± 0,50	11,1 ± 0,44	0,83

мы оценили уровень экспрессии ключевых генов, связанных с процессами обучения и памяти. Результаты обобщены в табл. 4. Среди исследованных генов достоверное отличие в экспрессии было выявлено только для *Htr2a* ($t = 2,210$; $p = 0,04$), кодирующего серотониновый 5-HT_{2A}-рецептор.

Известно, что CDNF может выступать в роли регулятора UPR [15], а UPR, в свою очередь, может влиять на когнитивные функции в моделях нейродегенеративных заболеваний, не только модулируя ответ на стресс ЭПР, но

и воздействуя на синаптическую пластичность [40]. Принимая во внимание вышеописанные данные и локализацию CDNF в ЭПР, мы решили сфокусироваться на экспрессии генов UPR (рис. 6).

Было обнаружено увеличение экспрессии сплайсированной формы *Xbp* (*sXbp*) (рис. 6, *д*; $t = 2,624$; $p = 0,017$), а также *Ire1α* (рис. 6, *е*) на уровне тенденции ($p = 0,0616$). При этом отношение сплайсированной формы *Xbp* (*sXbp*) к несплайсированной (*uXbp*) отличается достоверно ($t = 2,604$; $p = 0,018$; рис. 6, *ж*).

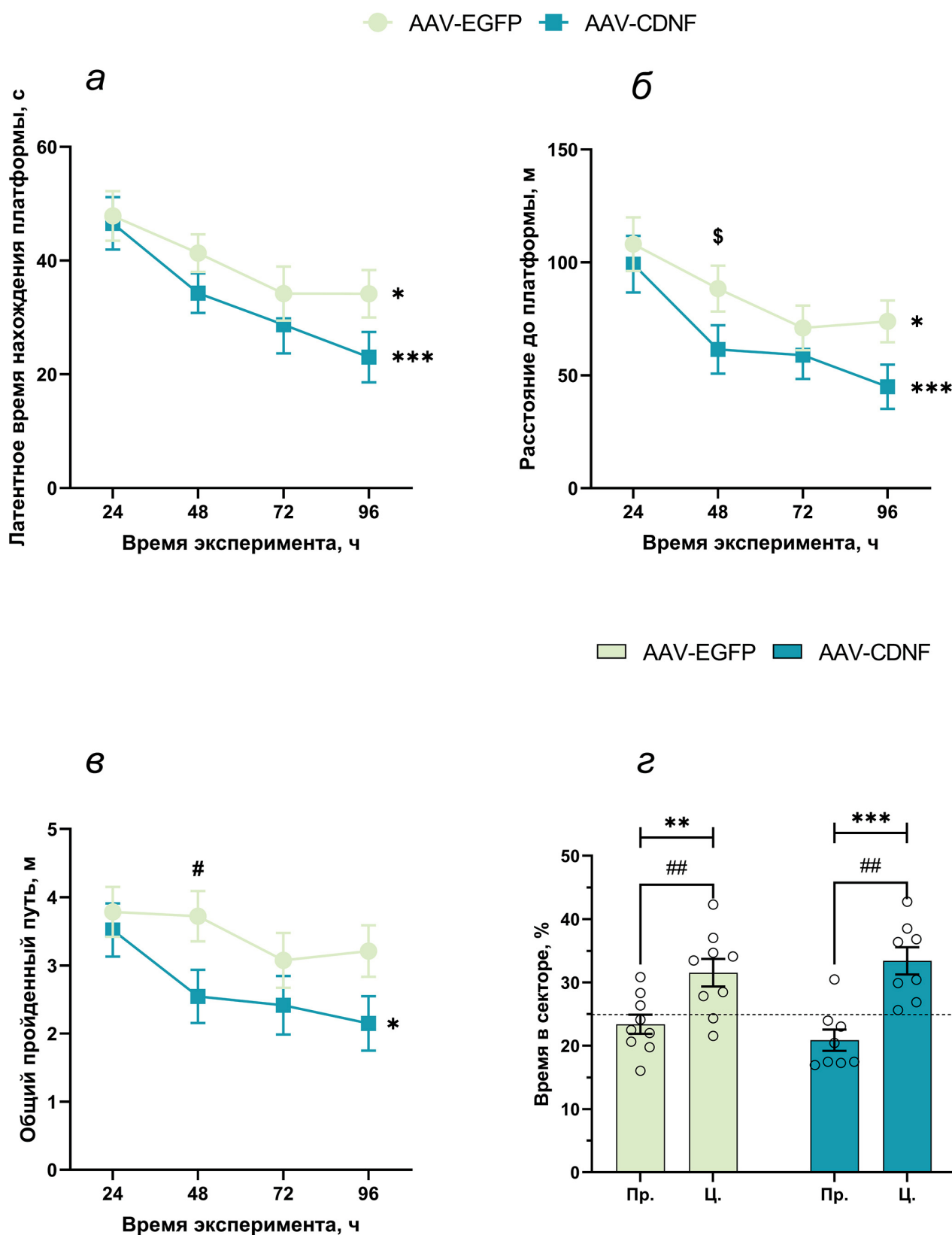


Рис. 5. Латентное время нахождения платформы (а), расстояние до платформы (б) и общий пройденный путь (в) в тесте «водный лабиринт Морриса» для животных со сверхэкспрессией CDNF и животных контрольной группы. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ — по сравнению с первым днём тестирования; \$ $p < 0,05$ — для группы AAV-CDNF по сравнению с первым днём тестирования; # $p < 0,05$ — по сравнению с контрольной группой. г — Контрольное тестирование для проверки качества формирования пространственной памяти. Время (%), проведённое в целевом секторе (Ц.): ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ — по сравнению с противоположным сектором (Пр.); ## $p < 0,01$ — по сравнению с 25%-ной вероятностью случайного нахождения в целевом секторе (обозначено пунктирной линией)

Таблица 4. Профиль экспрессии генов в гиппокампе для животных со сверхэкспрессией CDNF (AAV-CDNF) и животных контрольной группы (AAV-EGFP)

Ген	m ± SEM		p-значение	Характеристика гена
	AAV-EGFP	AAV-CDNF		
<i>Htr1a</i>	119,372 ± 14,9095	136,9180 ± 16,0019	0,4329	1A-подтип серотониновых рецепторов
<i>Htr2a</i>	31,5110 ± 1,3773	37,6930 ± 2,4348	0,0403	2A-подтип серотониновых рецепторов
<i>Htr2b</i>	11,2980 ± 1,2811	15,5690 ± 2,8993	0,1903	2B-подтип серотониновых рецепторов
<i>Htr7</i>	12,6867 ± 0,4399	13,2297 ± 1,0833	0,6479	7-подтип серотониновых рецепторов
<i>Akt-1</i>	493,3750 ± 89,2579	425,3310 ± 42,6366	0,5003	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase — ключевой фермент PI3/Akt-сигнального пути
<i>Arc</i>	33,0988 ± 6,7011	57,1540 ± 13,3297	0,1554	activity regulated cytoskeleton associated protein — ген раннего ответа, один из главных регуляторов синаптической пластичности
<i>Avpr1a</i>	0,0118 ± 0,0003	0,0137 ± 0,0027	0,4698	1A-рецептор аргинин-вазопрессина
<i>Bax</i>	10,0878 ± 1,6144	8,9317 ± 1,4453	0,8639	BCL2 Associated X — активатор апоптоза
<i>Bcl-xl</i>	31,3613 ± 3,2143	30,0603 ± 3,0493	0,7962	Bcl-2-Like Protein 1 — ингибитор апоптоза
<i>Bdnf</i>	92,5860 ± 7,4267	85,8040 ± 7,2094	0,5206	нейротрофический фактор мозга
<i>c-Fos</i>	14,1278 ± 2,1041	12,4967 ± 1,8462	0,5958	ген раннего ответа
<i>Creb</i>	32,3000 ± 4,7879	33,3883 ± 2,8045	0,8665	cAMP response element binding protein — транскрипционный фактор
<i>Drd1</i>	2,6805 ± 0,2429	3,4728 ± 0,5516	0,2799	D1-дофаминовый рецептор
<i>Drd2</i>	1,5910 ± 0,2287	2,5990 ± 0,6282	0,2556	D2-дофаминовый рецептор
<i>Gria1</i>	1110,5000 ± 91,0357	1056,7080 ± 116,4134	0,7201	глутаматный ионотропный AMPA1-рецептор (α1-субъединица)
<i>Gria2</i>	1056,9540 ± 144,9108	1077,4820 ± 110,9364	0,5787	глутаматный ионотропный AMPA2-рецептор (α2-субъединица)
<i>Grik1</i>	21,0377 ± 1,1859	19,7733 ± 1,7413	0,3527	глутаматный ионотропный каинатный рецептор (1-субъединица)
<i>Grik2</i>	112,1920 ± 12,8476	110,4676 ± 8,9398	0,6305	глутаматный ионотропный каинатный рецептор (β2-субъединица)
<i>Grin1</i>	773,9467 ± 40,1829	766,6870 ± 75,0227	0,9330	глутаматный ионотропный NMDA1-рецептор (α1-субъединица)
<i>Grin2a</i>	501,7465 ± 63,7042	469,2562 ± 37,8923	0,6664	глутаматный ионотропный NMDA2A-рецептор (ε1-субъединица)
<i>Grin2b</i>	327,4900 ± 22,9015	320,2550 ± 18,8293	0,8100	глутаматный ионотропный NMDA2B-рецептор (ε2-субъединица)
<i>Grm1</i>	96,7208 ± 5,0159	109,4579 ± 11,9102	0,3374	глутаматный метаботропный рецептор 1
<i>Grm2</i>	80,5865 ± 5,6277	79,4585 ± 5,9721	0,8922	глутаматный метаботропный рецептор 2

Таблица 4 (продолжение)

Ген	m ± SEM		p-значение	Характеристика гена
	AAV-EGFP	AAV-CDNF		
<i>Grm3</i>	120,8930 ± 5,9356	132,7440 ± 11,1860	0,5288	глутаматный метаботропный рецептор 3
<i>Grm4</i>	0,7130 ± 0,1083	1,0190 ± 0,2466	0,3930	глутаматный метаботропный рецептор 4
<i>Grm5</i>	218,2150 ± 13,8453	227,5493 ± 18,4510	0,6905	глутаматный метаботропный рецептор 5
<i>Kalrn</i>	194,6956 ± 5,8838	201,5212 ± 10,6467	0,5816	калирин – киназа-активатор Rho-ГТФаз
<i>Mapk3</i>	1,0560 ± 0,0948	0,9830 ± 0,1292	0,3427	митоген-активируемая протеинкиназа 3
<i>Nfxb</i>	9,2062 ± 1,013	9,5600 ± 0,8037	0,7958	транскрипционный фактор
<i>Pik3r1</i>	53,4200 ± 3,2130	52,0680 ± 4,4137	0,8072	регуляторная субъединица 1 фосфатидилинозитол-3-киназы
<i>Plcg1</i>	67,5700 ± 7,3740	69,980 ± 15,0900	0,5288	фосфолипаза С гамма 1
<i>rPol2</i>	5,4170 ± 0,9583	3,6736 ± 0,7517	0,1647	РНК-полимераза II субъединица А
<i>Syp</i>	20,1800 ± 2,3135	23,8340 ± 2,4439	0,2919	синаптофизин

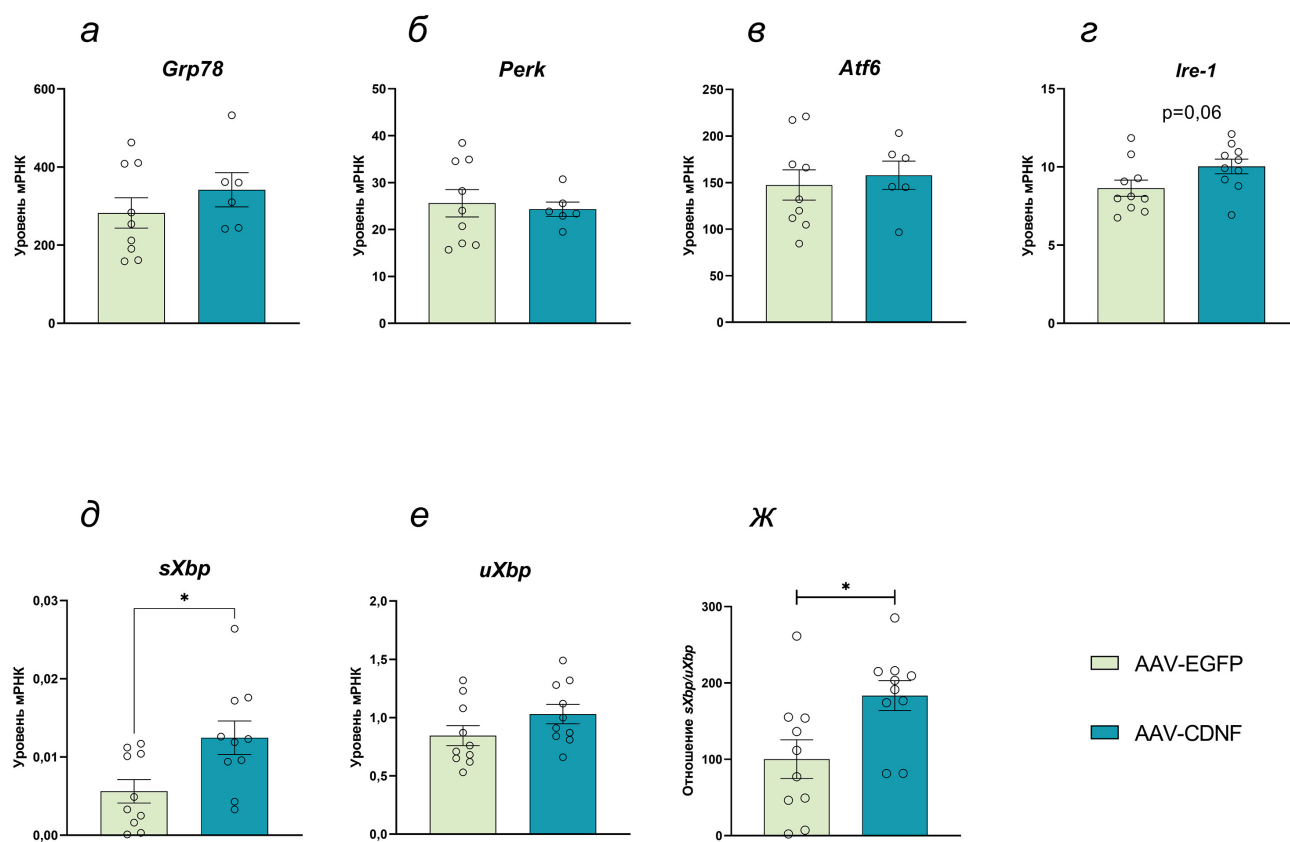


Рис. 6. Уровень экспрессии генов UPR: *Grp78* (а), *Perk* (б), *Atf6* (в), *Ire1a* (г), *sXbp* (д), *uXbp* (е) и соотношение *sXbp/uXbp* (ж). Уровень мРНК (а–г) представлен как число копий гена, отнесённое на 100 копий *rPol2*. Для панелей (д) и (е) экспрессия представлена как отношение уровней экспрессии *sXbp* и *uXbp* к уровню экспрессии *rPol2*. * $p < 0,05$ – для CDNF относительно группы AAV-EGFP

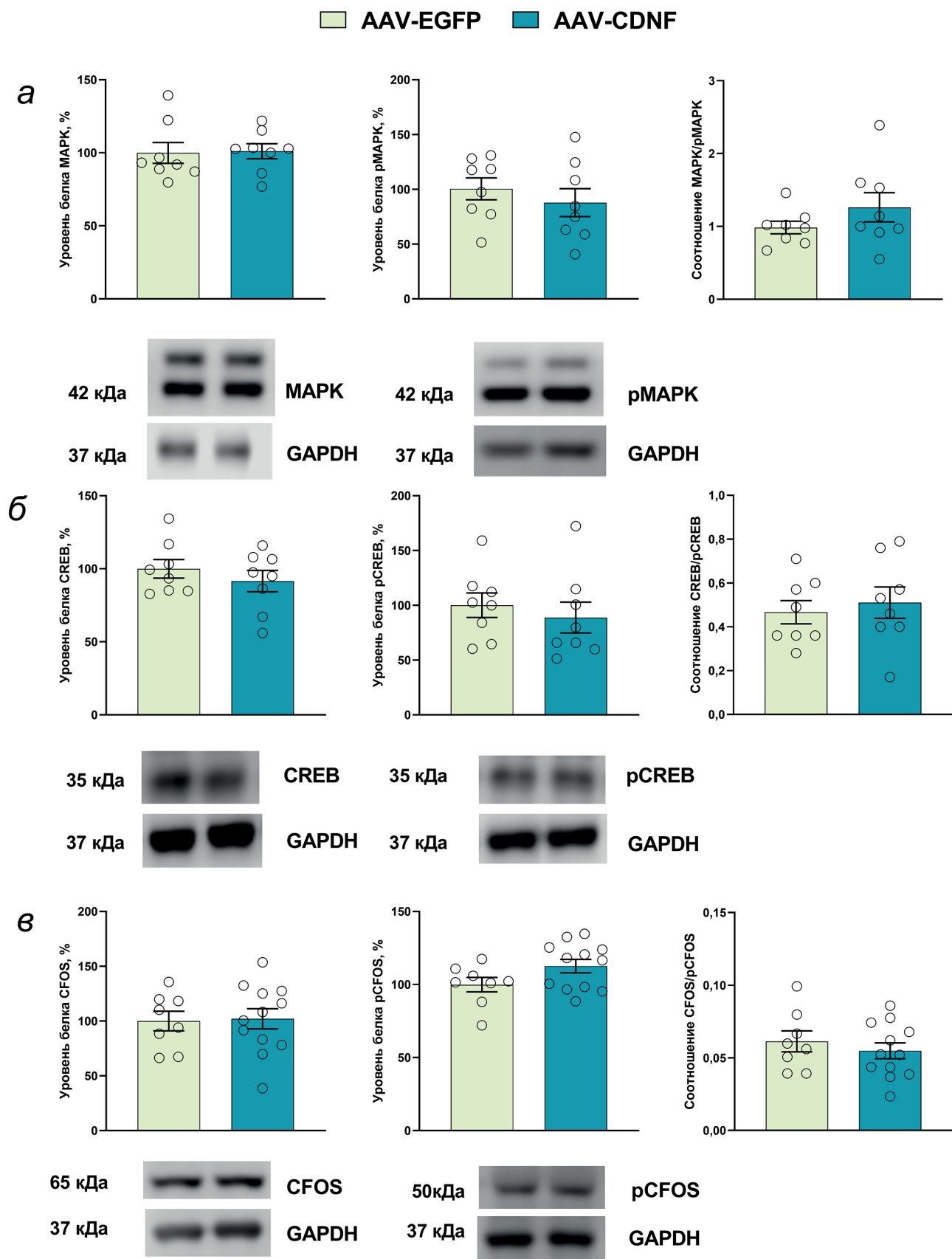


Рис. 7. Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала для белка, его фосфорилированной формы и их соотношение, а также результаты иммуноблота на мембранах для MAPK/pMAPK (а), CREB/pCREB (б) и CFOS/pCFOS (в). Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH

Ввиду того, что активность каскадов зачастую изменяется не на уровне экспрессии, а на уровне посттрансляционных модификаций, в первую очередь фосфорилирования, было решено оценить не только количество белка, но и отношение между обычной и фосфорилированной формой белков раннего ответа CREB и CFOS, а также MAP-киназы. Однако сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе не повлияла на уровень вышеперечисленных белков, фосфорилированных форм этих белков или их соотношение (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате данной работы было обнаружено, что сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе не влияет на двигательную активность, потребление воды, а также исследовательское и тревожно-подобное поведение. Ранее было показано, что как трансгенные мыши APP/PS1 (являются моделью болезни Альцгеймера), так и мыши дикого типа совершали больше подходов как к новым, так и к старым объектам в тесте «новый объект» после микроинъекции CDNF, то есть проявляли большую исследовательскую активность [14]. Стоит отметить, что тест «новый объект» лучше подходит для описания неophobia, а в более специфичном тесте на спонтанное исследовательское поведение обнаруженная разница не подтвердилась. Поэтому авторы приходят к выводу, что ни микроинъекция белка, ни эндогенный CDNF не вызывает побочных эффектов в виде усиления тревожности, гипо- или гиперактивности, и наши данные согласуются с этим выводом [14].

Ранее было установлено, что как фармакологическое (мусцимол) [41], так и оптогенетическое [42] ингибирование глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа нарушает консолидацию памяти о недавнем приёме пищи, сокращает время до наступления следующего приёма пищи и увеличивает его объём. Также установлено, что вентральный гиппокамп участвует в восприятии таких важных нейроэндокринных регуляторов, как лептин, грелин и глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1). Обнаруженное нами снижение потребления пищи под действием сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе подтверждает участие CDNF в регуляции пищевого поведения, однако механизм данного эффекта ещё предстоит установить.

Повышение экспрессии CDNF в гиппокампе не оказало существенного влияния на

депрессивно-подобное поведение мышей, оценённое в тестах «принудительное плавание» и «подвешивание за хвост». На этой же линии мышей в том же тесте ранее был продемонстрирован антидепрессантный эффект центрального введения рекомбинантного белка BDNF [26], однако глиальный нейротрофический фактор GDNF при центральном введении не оказал влияния на неподвижность в тесте «подвешивание за хвост» [30]. В то же время и BDNF, и GDNF оказывали значительный антидепрессантный эффект в тесте «принудительное плавание». Вероятно, CDNF не влияет на депрессивно-подобное поведение «депрессивных» мышей ASC, что отличает его от классических нейротрофических факторов BDNF и GDNF. Однако следует принимать во внимание, что в упомянутых работах мы вводили белок BDNF или GDNF системно, в желудочек мозга, тогда как в настоящем исследовании увеличение количества CDNF осуществлялось локально, только в гиппокампе.

Ранее было показано нарушение угасания памяти страха у мышей линии ASC, и было предположено, что данное нарушение может играть важную роль в формировании депрессивно-подобного фенотипа этих животных [43]. Также была показана устойчивость мышей этой линии к амнестической стимуляции [44]. Сверхэкспрессия CDNF в нейронах гиппокампа мышей ASC улучшила пространственное обучение животных. Можно предположить, что данное улучшение связано с повышенной устойчивостью памяти у мышей данной линии. Однако в работе Kemppainen et al. [14] было продемонстрировано, что индукция сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе улучшала пространственную память как у мышей линии APP/PS1, так и у мышей дикого типа. Здесь стоит отметить два момента. Во-первых, в указанном исследовании в AAV был встроен ген *CDNF* человека, а во-вторых, транскрипция осуществлялась под контролем промотора цитомегаловируса (CMV), что не позволяло достичь специфической экспрессии в нейронах. Если первое обстоятельство вряд ли играет большую роль в силу высокой консервативности CDNF среди млекопитающих, второе существенно осложняет картину. В созданной нами плазмиде экспрессия гена *Cdnf* контролируется синапсиновым промотором (Syn), обеспечивающим избирательную экспрессию целевого гена в нервных клетках. Таким образом, мы впервые показали, что именно сверхэкспрессия нейронального CDNF улучшает пространственное обучение животных. Поскольку изменилась

динамика обучения, мы можем предполагать эффект на кратковременную память, не обнаруженный в исследовании Kemppainen et al. [14]. Более того, эффект сверхэкспрессии CDNF в нейронах, вероятно, зависит от генотипа. Это поднимает важный вопрос о том, изменена ли функция CDNF при тех или иных нейропатологиях. Пока что исследование данной проблемы находится в зачаточном состоянии. Имеется лишь несколько работ, в которых попытались оценить связь полиморфизмов в гене *CDNF* с развитием БП, шизофренией или кокаиновой зависимостью [45–47].

На данном этапе мы не можем проследить всю последовательность молекулярных событий, ведущих к поведенческим изменениям, однако нам удалось выявить несколько потенциальных «ключевых игроков». Одним из них, безусловно, является транскрипционный фактор *Xbp1* (X-box binding protein-1). Наличие связи экспрессии *Cdnf* и *Xbp1*, а также увеличение образования его сплайсированной формы уже были показаны ранее на клеточной культуре в контексте изучения UPR [48]. Известно, что активная форма белка XBP1 образуется только со сплайсированного транскрипта при участии IRE1. С помощью иммуногистохимического анализа мы подтвердили, что CDNF локализуется в ЭПР, откуда прямо или опосредованно может влиять на экспрессию *Irela*. Действительно, нами была замечена сильная тенденция к увеличению экспрессии *Irela* в опытной группе. Можно предположить, что *in vivo* существуют механизмы, вовлечённые в клеточный ответ на стресс ЭПР, однако при отсутствии стресса эти же механизмы, вероятно, выполняют другие функции. В пользу этой гипотезы выступает и тот факт, что у нокаутных по *Cdnf* животных не наблюдалось изменений в базальной экспрессии генов UPR [12]. Влияние экспрессии *Xbp1* на формирование пространственной памяти и гиппокамп-зависимое обучение было показано в исследовании Martinez et al. [49]. Было установлено, что животным с кондиционным нокаутом по *Xbp1* (*XBP1^{Nes-/-}*) требовалось больше попыток, чтобы выполнить задание в тесте гибкости памяти, а также они показывали меньший процент замираний в тесте контекстуального условно-рефлекторного пассивного избегания. Животные со сверхэкспрессией XBP1, напротив, демонстрировали улучшение во всех вышеперечисленных тестах. Основным эффектором изменений был назначен BDNF, так как имеются данные, подтверждающие его роль мастера-регулятора. Однако в нашем исследовании изменений на уровне экспрес-

сии *Bdnf* не отмечалось. Другой механизм, объясняющий изменение когнитивных функций, предполагает в качестве ключевого посредника благоприятных эффектов sXBP1 — калирин (Kal7) [50]. В нашем эксперименте подтверждений активации данного пути также не было найдено. Не исключено и существование альтернативных каскадов, вовлекающих, например, KIF17.

Несмотря на выраженный эффект сверхэкспрессии CDNF на обучение в водном лабиринте Морриса, её влияния на ассоциативное обучение обнаружено не было, что может указывать на различную роль CDNF в механизмах, контролирующих пространственное и ассоциативное обучение.

Нами установлено достоверное увеличение экспрессии 2A-подтипа серотониновых рецепторов (5-HT_{2A}) в группе со сверхэкспрессией CDNF. Представляется маловероятным, что данное обстоятельство могло привести к столь существенному изменению динамики обучения животных в водном лабиринте Морриса. Действительно, существует целый ряд исследований на различных модельных объектах, указывающий на взаимосвязь 5-HT_{2A}-рецепторов и процессов памяти [51], однако их результаты достаточно противоречивы. В целом, существующие данные показывают, что активация 5-HT_{2A}-рецепторов при системной инъекции или при местной микроинфузии, по-видимому, усиливают у мышей две формы памяти, зависящей от гиппокампа: память объекта и условно-рефлекторную память страха. При этом в отношении заданий, связанных с пространственным обучением, результат, скорее, обратный. Так, при подкожной инъекции псилоцина, который является агонистом 5-HT_{2A}-рецепторов, у крыс нарушалось пространственное обучение в карусельном тесте и память о нахождении платформы в водном лабиринте Морриса, но не было эффекта на консолидацию памяти [52].

Ранее высказывалось мнение, что основным свойством CDNF, которое отличает его от классических НТФ, является то, что его влияние на неповреждённые нейроны слабое или даже отсутствует [1, 53]. Однако накапливаются данные, свидетельствующие, что CDNF может не только способствовать выживанию специфической популяции нейронов в условиях угрозы, но также запускает некоторые молекулярные каскады в неповреждённом мозге, осуществляет тонкую регуляцию нормального поведения, а также вовлечён в механизмы формирования различных типов патологического поведения. В ходе нашей работы

было обнаружено, что нейрональный CDNF участвует в механизмах формирования пространственной памяти у мышей линии ASC с генетически-детерминированным депрессивно-подобным поведением. Было показано, что избыточно экспрессирующийся в гиппокампе CDNF локализуется в ЭПР и приводит к активации Ire1 α /Xbp1-пути, традиционно ассоциируемого со стрессом ЭПР. Таким образом, несмотря на то что CDNF активирует уникальные молекулярные каскады, что отличает его от классических нейротрофических факторов, он тем не менее обладает существенным нейротрофным потенциалом, реализуемым на уровне поведенческой пластичности.

Вклад авторов. Я.П. Каминская — проведение экспериментов, анализ результатов, написание текста; Т.В. Ильчибаева — создание вирусных конструкторов, визуализация; Н.В. Хоцкин — проведение экспериментов; А.С. Цыбко — концепция, проведение экспериментов, редактирование текста статьи; В.С. Науменко — редактирование текста статьи, общее руководство проектом.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00011). Содержание животных было поддержано бюджетным проектом № FWNR-2022-0023.

Благодарности. Исследование было осуществлено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), поддержанного Министерством науки и высшего образования России (уникальный идентификационный номер проекта: RFMEFI62119X0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все экспериментальные процедуры были проведены в соответствии с международными правилами обращения с животными (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the Eighth Edition, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council © 2020 National Academy of Sciences (USA)) и одобрены этическим комитетом ИЦиГ СО РАН (заключение № 34 от 15 июня 2016 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindholm, P., Voutilainen, M. H., Laurén, J., Peränen, J., Leppänen, V.-M., Andressoo, J.-O., Lindahl, M., Janhunen, S., Kalkkinen, N., Timmusk, T., Tuominen, R. K., and Saarma, M. (2007) Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons *in vivo*, *Nature*, **448**, 73-77, doi: 10.1038/nature05957.
2. Parkash, V., Lindholm, P., Peränen, J., Kalkkinen, N., Oksanen, E., Saarma, M., Leppänen, V.-M., and Goldman, A. (2009) The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDNF explains why they are bifunctional, *Protein Eng. Des. Sel.*, **22**, 233-241, doi: 10.1093/protein/gzn080.
3. Voutilainen, M. H., Bäck, S., Peränen, J., Lindholm, P., Raasmaja, A., Männistö, P. T., Saarma, M., and Tuominen, R. K. (2011) Chronic infusion of CDNF Prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease, *Exp. Neurol.*, **228**, 99-108, doi: 10.1016/j.expneurol.2010.12.013.
4. Lindholm, D., Wootz, H., and Korhonen, L. (2006) ER stress and neurodegenerative diseases, *Cell Death Differ.*, **13**, 385-392, doi: 10.1038/sj.cdd.4401778.
5. Garea-Rodríguez, E., Eesmaa, A., Lindholm, P., Schlumbohm, C., König, J., Meller, B., Kriegstein, K., Helms, G., Saarma, M., and Fuchs, E. (2016) Comparative analysis of the effects of neurotrophic factors CDNF and GDNF in a nonhuman primate model of Parkinson's disease, *PLoS One*, **11**, e0149776, doi: 10.1371/journal.pone.0149776.
6. Raykhel, I., Alanen, H., Salo, K., Jurvansuu, J., Van, D. N., Latva-Ranta, M., and Ruddock, L. (2007) A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors, *J. Cell Biol.*, **179**, 1193-1204, doi: 10.1083/jcb.200705180.
7. Lindholm, P., and Saarma, M. (2010) Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors, *Dev. Neurobiol.*, **70**, 360-371, doi: 10.1002/dneu.20760.
8. Apostolou, A., Shen, Y., Liang, Y., Luo, J., and Fang, S. (2008) Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death, *Exp. Cell Res.*, **314**, 2454-2467, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.05.001.
9. Bruhn, H. (2005) A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins, *Biochem. J.*, **389**, 249-257, doi: 10.1042/BJ20050051.
10. Mätlik, K., Yu, L., Eesmaa, A., Hellman, M., Lindholm, P., Peränen, J., Galli, E., Anttila, J., Saarma, M., Permi, P., Airavaara, M., and Arumäe, U. (2015) Role of two sequence motifs of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in its survival-promoting activity, *Cell Death Dis.*, **6**, e2032, doi: 10.1038/cddis.2015.371.
11. Božok, V., Yu, L., Palgi, J., and Arumäe, U. (2018) Antioxidative CXXC peptide motif from mesencephalic

- astrocyte-derived neurotrophic factor antagonizes programmed cell death, *Front. Cell Dev. Biol.*, **6**, 106, doi: 10.3389/fcell.2018.00106.
12. Lindahl, M., Chalazonitis, A., Palm, E., Pakarinen, E., Danilova, T., Phamb, T. D., Setlikb, W., Rao, M., Vöikar, V., Huotari, J., Kopra, J., Andressooa, J.-O., Piepponend, P. T., Airavaaraa, M., Panhelainen, A., Gershon, M. D., and Saarma, M. (2020) Cerebral dopamine neurotrophic factor-deficiency leads to degeneration of enteric neurons and altered brain dopamine neuronal function in mice, *Neurobiol. Dis.*, **134**, 104696, doi: 10.1016/j.nbd.2019.104696.
 13. Chen, Y.-C. C., Baronio, D., Semenova, S., Abdurakhmanova, S., and Panula, P. (2020) Cerebral dopamine neurotrophic factor regulates multiple neuronal subtypes and behavior, *J. Neurosci.*, **40**, 6146-6164, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2636-19.2020.
 14. Kempainen, S., Lindholm, P., Galli, E., Lahtinen, H.-M. M., Koivisto, H., Hämäläinen, E., Saarmab, M., and Tanila, H. (2015) Cerebral dopamine neurotrophic factor improves long-term memory in APP/PS1 transgenic mice modeling Alzheimer's disease as well as in wild-type mice, *Behav. Brain Res.*, **291**, 1-11, doi: 10.1016/j.bbr.2015.05.002.
 15. Voutilainen, M. H., De Lorenzo, F., Stepanova, P., Bäck, S., Yu, L.-Y., Lindholm, P., Pörsti, E., Saarma, M., Männistö, P. T., and Tuominen, R. K. (2017) Evidence for an additive neurorestorative effect of simultaneously administered CDNF and GDNF in hemiparkinsonian rats: implications for different mechanism of action, *eNeuro*, **4**, ENEURO.0117-16.2017, doi: 10.1523/ENEURO.0117-16.2017.
 16. Kesner, R. P. (2018) An analysis of dentate gyrus function (an update), *Behav. Brain Res.*, **354**, 84-91, doi: 10.1016/J.BBR.2017.07.033.
 17. Papp, G., Witter, M. P., and Treves, A. (2007) The CA3 network as a memory store for spatial representations, *Learn. Mem.*, **14**, 732-744, doi: 10.1101/LM.687407.
 18. Fredes, F., and Shigemoto, R. (2021) The role of hippocampal mossy cells in novelty detection, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **183**, 107486, doi: 10.1016/J.NLM.2021.107486.
 19. Sun, D., Mei, L., and Xiong, W. C. (2023) Dorsal dentate gyrus, a key regulator for mood and psychiatric disorders, *Biol. Psychiatry*, **93**, 1071-1080, doi: 10.1016/J.BIOPSYCH.2023.01.005.
 20. Kondaurova, E. M., Bazovkina, D. V., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2006) Selective Breeding for catalepsy changes the distribution of microsatellite D13Mit76 alleles linked to the 5-HT1A serotonin receptor gene in mice, *Genes, Brain Behav.*, **5**, 596-601, doi: 10.1111/j.1601-183X.2006.00212.x.
 21. Kulikov, A. V., Bazovkina, D. V., Kondaurova, E. M., and Popova, N. K. (2008) Genetic structure of hereditary catalepsy in mice, *Genes Brain Behav.*, **7**, 506-512, doi: 10.1111/j.1601-183X.2008.00387.x.
 22. Kulikov, A. V., Kozlachkova, E. Y., Maslova, G. B., and Popova, N. K. (1993) Inheritance of predisposition to catalepsy in mice, *Behav. Genet.*, **23**, 379-384, doi: 10.1007/BF01067439.
 23. Tikhonova, M. A., Lebedeva, V. V., Kulikov, A. V., Bazovkina, D. V., and Popova, N. K. (2006) Effect of imipramine on the behavior and cerebral 5-HT1A serotonin receptors in mice genetically predisposed to catalepsy, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **141**, 48-50, doi: 10.1007/s10517-006-0090-7.
 24. Tikhonova, M. A., Alperina, E. L., Tolstikova, T. G., Bazovkina, D. V., Di, V. Y., Idova, G. V., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2010) Effects of chronic fluoxetine treatment on catalepsy and the immune response in mice with a genetic predisposition to freezing reactions: the roles of types 1A and 2A serotonin receptors and the Tph2 and SERT genes, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **40**, 521-527, doi: 10.1007/s11055-010-9291-7.
 25. Базовкина Д. В., Куликов А. В., Кондаурова Е. М., Попова Н. К. (2005) Селекция на предрасположенность к каталепсии усиливает депрессивно-подобные характеристики поведения у мышей, *Генетика*, **41**, 1222-1228.
 26. Naumenko, V. S., Kondaurova, E. M., Bazovkina, D. V., Tsybko, A. S., Tikhonova, M. A., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2012) Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains, *Neuroscience*, **214**, 59-67, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.031.
 27. Björkholm, C., and Monteggia, L. M. (2016) BDNF – a key transducer of antidepressant effects, *Neuropharmacology*, **102**, 72-79, doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.034.
 28. Caviedes, A., Lafourcade, C., Soto, C., and Wyneken, U. (2017) BDNF/NF-KB signaling in the neurobiology of depression, *Curr. Pharm. Des.*, **23**, 3154-3163, doi: 10.2174/138161282366617011141915.
 29. Mondal, A. C., and Fatima, M. (2019) Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression: role of antidepressants treatment, *Int. J. Neurosci.*, **129**, 283-296, doi: 10.1080/00207454.2018.1527328.
 30. Naumenko, V. S., Bazovkina, D. V., Semenova, A. A., Tsybko, A. S., Il'chibaeva, T. V., Kondaurova, E. M., and Popova, N. K. (2013) Effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in mouse strains genetically predisposed to behavioral disorders, *J. Neurosci. Res.*, **91**, 1628-1638, doi: 10.1002/jnr.23286.
 31. Chen, S.-H., Haam, J., Walker, M., Scappini, E., Naughton, J., and Martin, N. P. (2019) Recombinant viral vectors as neuroscience tools, *Curr. Protoc. Neurosci.*, **87**, e67, doi: 10.1002/cpns.67.
 32. Kondaurova, E. M., Plyusnina, A. V., Ilchibaeva, T. V., Eremin, D. V., Rodnyy, A. Y., Grygoreva, Y. D.,

- and Naumenko, V. S. (2021) Effects of a Cc2d1a/Freud-1 knockdown in the hippocampus on behavior, the serotonin system, and BDNF, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13319, doi: 10.3390/ijms222413319.
33. Kondaurova, E. M., Belokopytova, I. I., Kulikova, E. A., Khotskin, N. V., Ilchibaeva, T. V., Tsybko, A. S., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2023) On the role of serotonin 5-HT(1A) receptor in autistic-like behavior: cross talk of 5-HT and BDNF systems, *Behav. Brain Res.*, **438**, 114168, doi: 10.1016/j.bbr.2022.114168.
 34. 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.
 35. Naumenko, V. S., and Kulikov, A. V. (2006) Quantitative assay of 5-HT1A receptor gene expression in the brain, *Mol. Biol.*, **40**, 30-36, doi: 10.1134/S0026893306010067/METRICS.
 36. 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.
 37. 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.
 38. Khotskin, N. V., Plyusnina, A. V., Kulikova, E. A., Bazhenova, E. Y., Fursenko, D. V., Sorokin, I. E., Kolotygin, I., Mormedec, P., Tereninac, E. E., Sheveleva, O. B., and Kulikov, A. V. (2019) On association of the lethal yellow (AY) 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.
 39. Kulikov, A. V., Morozova, M. V., Kulikov, V. A., Kirichuk, V. S., and Popova, N. K. (2010) Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test, *J. Neurosci. Methods*, **191**, 26-31, doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.06.002.
 40. Hetz, C., and Saxena, S. (2017) ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration, *Nat. Rev. Neurol.*, **13**, 477-491, doi: 10.1038/nrneurol.2017.99.
 41. Henderson, Y. O., Smith, G. P., and Parent, M. B. (2013) Hippocampal neurons inhibit meal onset, *Hippocampus*, **23**, 100-107, doi: 10.1002/hipo.22062.
 42. Hannapel, R., Ramesh, J., Ross, A., Lalumiere, R. T., Roseberry, A. G., and Parent, M. B. (2019) Postmeal optogenetic inhibition of dorsal or ventral hippocampal pyramidal neurons increases future intake, *eNeuro*, **6**, 457-475, doi: 10.1523/ENEURO.0457-18.2018.
 43. Dubrovina, N. I., Zinov'ev, D. R., Zinov'eva, D. V., and Kulikov, A. V. (2009) Learning and extinction of a passive avoidance response in mice with high levels of predisposition to catalepsy, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **39**, 475-480, doi: 10.1007/s11055-009-9152-4.
 44. Sinovyev, D. R., Dubrovina, N. I., and Kulikov, A. V. (2009) Development of amnesia in different mouse strains, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **147**, 557-559, doi: 10.1007/S10517-009-0583-2.
 45. Lohoff, F. W., Bloch, P. J., Ferraro, T. N., Berrettini, W. H., Pettinati, H. M., Dackis, C. A., O'Brien, C. P., Kampman, K. M., and Oslin, D. W. (2009) Association analysis between polymorphisms in the conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) gene and cocaine dependence, *Neurosci. Lett.*, **453**, 199-203, doi: 10.1016/j.neulet.2009.02.026.
 46. Choi, J. M., Hong, J. H., Chae, M. J., Hung, N. P., Kang, H. S., Ma, H.-I., and Kim, Y. J. (2011) Analysis of mutations and the association between polymorphisms in the cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) gene and Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.*, **493**, 97-101, doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.013.
 47. Yang, Y., Yu, H., Li, W., Liu, B., Zhang, H., Ding, S., Lu, Y., Jiang, T., and Lv, L. (2018) Association between cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) 2 polymorphisms and schizophrenia susceptibility and symptoms in the han chinese population, *Behav. Brain Funct.*, **14**, 1, doi: 10.1186/s12993-017-0133-4.
 48. Arancibia, D., Zamorano, P., and Andrés, M. E. (2018) CDNF Induces the adaptive unfolded protein response and attenuates endoplasmic reticulum stress-induced cell death, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1865**, 1579-1589, doi: 10.1016/j.bbamer.2018.08.012.
 49. Martínez, G., Vidal, R. L., Mardones, P., Serrano, F. G., Ardiles, A. O., Wirth, C., Valdés, P., Thielen, P., Schneider, B. L., Kerr, B., Valdés, J. L., Palacios, A. G., Inestrosa, N. C., Glimcher, L. H., and Hetz, C. (2016) Regulation of memory formation by the transcription factor XBP1, *Cell Rep.*, **14**, 1382-1394, doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.028.
 50. Cissé, M., Duplan, E., Lorivel, T., Dunys, J., Bauer, C., Meckler, X., Gerakis, Y., Lauritzen, I., and Checler, F. (2017) The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the kalirin-7 pathway in Alzheimer model, *Mol. Psychiatry*, **22**, 1562-1575, doi: 10.1038/mp.2016.152.
 51. Zhang, G., and Stackman, R. W. (2015) The role of serotonin 5-HT2A receptors in memory and cognition, *Front. Pharmacol.*, **6**, 225, doi: 10.3389/fphar.2015.00225.
 52. Rambousek, L., Palenicek, T., Vales, K., and Stuchlik, A. (2014) The effect of psilocin on memory acquisition, retrieval, and consolidation in the rat, *Front. Behav. Neurosci.*, **8**, 1-7, 180, doi: 10.3389/fnbeh.2014.00180.
 53. Lindholm, P., and Saarma, M. (2022) Cerebral dopamine neurotrophic factor protects and repairs dopamine neurons by novel mechanism, *Mol. Psychiatry*, **27**, 1310-1321, doi: 10.1038/s41380-021-01394-6.

THE EFFECT OF HIPPOCAMPAL OVEREXPRESSION OF DOPAMINE NEUROTROPHIC FACTOR (CDNF) ON THE BEHAVIOR OF MICE WITH GENETIC PREDISPOSITION TO DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR

Y. P. Kaminskaya, T. V. Ilchibaeva, N. V. Khotskin, V. S. Naumenko, and A. S. Tsybko*

Federal research center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: antoncybko@mail.ru

Cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) is the promising tool for treatment of Parkinson's disease. However, its role in the regulation of non-motor behavior, including various psychopathologies, remains unclear. In this regard, the aim of present work was to study the effect of CDNF overexpression in the hippocampus on the behavior of ASC mice (Antidepressant Sensitive Cataleptics) with a genetic predisposition to depression-like behavior. CDNF overexpression in mouse hippocampal neurons was induced using an adeno-associated viral vector. Four weeks after stereotaxic injection of the AAV-CDNF construct into the dorsal hippocampus, home cage behavior, exploratory, anxiety and depressive-like behaviors, as well as spatial and associative learning were assessed. We found significant improvements in the dynamics of spatial learning in the Morris water maze in CDNF-overexpressing animals. At the same time, no effect of CDNF was found on other studied behaviors. The behavior of the experimental animals in the home cage conditions did not differ from that in the control group, except for a decrease in the total amount of food eaten and a slight increase in the number of sleep episodes in the light phase of the day. In the present study we also attempted to determine the molecular basis for the above mentioned changes by genes expression assessment. We did not find significant changes in the mRNA level of key kinases, genes involved in neuroplasticity and neuronal survival as well as genes encoding receptors for the main neurotransmitter systems. However, animals overexpressing CDNF show increased level of spliced Xbp indicating activation of the Ire1 α /Xbp1 pathway traditionally associated with ER stress. Immunohistochemical analysis showed that CDNF was co-localized with the ER marker calreticulin. Thus, the effects of endogenous CDNF on behavior that we have found may be mediated by a specific molecular cascade, which emphasizes its difference from classical neurotrophic factors.

Keywords: neurotrophic factors, cerebral dopamine neurotrophic factor CDNF, depressive-like behavior, learning, ER stress, unfolded protein response UPR