

На правах рукописи



Иванова Ольга Ярославовна

**УЧАСТИЕ КАНОНИЧЕСКОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ WNT В РЕГУЛЯЦИИ
ПЛАСТИЧНОСТИ ГИППОКАМПА**

Специальность 03.03.01 – «Физиология»

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в лаборатории нейрофизиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
зав. лабораторией нейрофизиологии обучения

Маркевич Владимир Александрович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
в.н.с. ФГБНУ НЦН

Солнцева Елена Ивановна

доктор биологических наук,
зав. лабораторией системной организации нейронов ИТЭБ РАН

Кичигина Валентина Федоровна

Ведущая организация: кафедра ВНД биологического факультета МГУ им. Ломоносова.

Защита состоится **24 мая 2017** года в **14.00 часов** на заседании диссертационного совета Д 002.044.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бултерова 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Автореферат разослан марта 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, д.б.н. Иерусалимский В.Н.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Сигнальный путь Wnt (СП Wnt) – один из активно изучаемых внутриклеточных сигнальных каскадов. Он является активным участником разнообразных биологических процессов как в период созревания, так и у взрослых особей (Nusslein-Volhard, Wieschaus 1980; McMahon, Moon, 1989; Chen et al., 2006; Jessberger et al., 2009; Vargas et al., 2014). Нарушения в работе каскада Wnt связывают с неврологическими (аутизм, шизофрения, биполярное расстройство) и нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона и болезнь Паркинсона) (Anderton, 2000; Boonen et al., 2009; Clevers and Nusse, 2012; Blalock et al., 2004; Hooper et al., 2008; Vogt et al., 2011; De Ferrari and Moon, 2006). В настоящее время у позвоночных описаны 19 генов семейства Wnt. Экспрессия генов семейства Wnt отмечается на разных стадиях развития в различных отделах ЦНС, в том числе в обонятельной луковице, гиппокампе, неокортексе и таламусе (Gavin et al., 1990, Shimogori et al., 2004; Wayman et al., 2006; Cerpa et al., 2008; Davis et al., 2008).

Согласно современным представлениям, СП Wnt контролирует клеточную дифференцировку, миграцию нейронов, а также играет важную роль в модуляции работы зрелых синапсов (Маркевич и др., 2012). Показано, что канонический каскад Wnt регулирует нейрогенез в зубчатой фасции гиппокампа – процесс, отражающий структурную пластичность гиппокампа (Lie et al., 2005; Jessberger et al., 2009).

Общепринятой моделью для изучения процессов пластичности является долговременная посттетаническая потенция (ДП), которая представляет собой долговременное изменение эффективности синаптических связей (Bliss, Lomo, 1973). Исследования *in vitro* продемонстрировали влияние фармакологических ингибиторов и активаторов сигнального пути Wnt на долговременную потенцию в срезах гиппокампа (Chen et al. 2006; Cerpa et al, 2011; Vargas et al, 2014; Vargas, 2015). Однако феномен ДП *in vitro* не в полной мере отражает роль СП Wnt в регуляции синаптической пластичности. На уровне целого мозга исследовалось лишь участие каскада Wnt в процессах обучения и формирования памяти: было показано, что он влияет на распознавание объектов и пространственную память (Maguschak, Ressler, 2008; Jessberger et al., 2009; Fortress et al., 2013). Очевидно, что остается недостаточно изученным вопрос о регуляции синаптической пластичности *in vivo* путем подавления и усиления сигнального пути Wnt.

Для исследований на основе более сложной, но более реалистичной модели синаптической пластичности - ДП *in vivo* - требуется обеспечение хронических изменений в СП Wnt с минимальным оперативным вмешательством. В данной работе применен метод локального хронического изменения экспрессии генов Wnt в зрелом мозге – инъекции суспензий лентивирусных конструкций непосредственно в изучаемую структуру. Для изучения положительной модуляции канонического СП Wnt был выбран лиганд каскада Wnt3, который был ранее использован для изучения участия СП Wnt как в регуляции ДП *in vitro* (Chen et al., 2006), так и в нейрогенезе в зубчатой фасции гиппокампа (Lie et al., 2005). Для отрицательной модуляции применяли доминантно-негативную мутацию гена Wnt1, также ранее уже применявшуюся для изучения нейрогенеза в зубчатой фасции гиппокампа с помощью лентивирусной трансдукции (Lie

et al., 2005; Jessberger et al., 2009). Аномальный белок Wnt1 занимает рецепторы и корецепторы СП Wnt, не позволяя нормальным лигандам канонического пути, в том числе Wnt3 (Lie et al., 2005), активировать каскад. В данной работе впервые метод лентивирусной трансдукции применяется для изучения регуляции ДП *in vivo* лигандами и компонентами СП Wnt.

Присутствие компонентов канонического СП Wnt в разных областях мозга, а также его активное участие в нейрогенезе, обработке сенсорных сигналов и когнитивных функциях указывает на его фундаментальное значение в работе нервной системы. Каскад Wnt играет важную роль в реализации синаптической пластичности, однако изучение механизмов его действия все еще остается актуальной научной проблемой.

Цель работы и основные задачи исследования.

Основной целью работы было исследовать роль сигнального пути Wnt в регуляции синаптической пластичности гиппокампа.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Обеспечить хроническое подавление и усиление сигнального каскада Wnt локально в области CA1 гиппокампа крыс методом лентивирусной трансдукции.
2. Исследовать влияние модуляции канонического каскада Wnt на долговременную потенциацию *in vivo*.
3. Выявить механизмы, лежащие в основе эффектов воздействия сигнального пути Wnt на синаптическую пластичность, с помощью оценки изменений коэффициента парной фасилитации и экспрессии ключевых компонентов каскада, а также белка постсинаптической плотности.

Научная новизна

Впервые продемонстрировано *in vivo* влияние хронического подавления и усиления канонического сигнального пути Wnt на синаптическую пластичность. Подтверждена гипотеза об ухудшении условий для возникновения и поддержания долговременной потенциации при подавлении каскада и их улучшении при его усилении. Показано, что наблюдаемое подавление долговременной потенциации сопровождается нарушением пресинаптических функций, в то время как усилению сигнального пути Wnt сопутствуют постсинаптические перестройки. Детально исследовано влияние лентивирусной трансдукции на экспрессию ключевых компонентов каскада.

Теоретическая ценность и практическая значимость.

Нарушения в работе каскада Wnt связывают как с неправильным эмбриональным развитием, так и с неврологическими и нейродегенеративными патологиями, в основе которых лежат изменения в пластичности синаптических связей. В последние десятилетия все больше данных свидетельствуют о том, что СП Wnt является важным участником процессов синаптической пластичности. Полученные результаты позволяют оценить его роль в их реализации и предположить возможные механизмы их регуляции. Более того, сигнальный путь Wnt и его компоненты являются перспективной мишенью для разработки методов лечения различных неврологических и нейродегенеративных патологий, а использованный в данной работе метод лентивирусной трансдукции может

быть в дальнейшем применен в клинической практике для коррекции нарушений путем локального хронического изменения экспрессии белков каскада непосредственно в целевой структуре ЦНС.

Положения, выносимые на защиту:

1. Хроническое подавление канонического сигнального пути Wnt приводит к угнетению синаптической пластичности, выраженному в нарушении индукции и поддержания ранней фазы долговременной потенциации *in vivo*
2. Хроническая оверэкспрессия лиганда канонического каскада Wnt3 обеспечивает усиление пластичности синаптических связей, выраженное в облегчении индукции долговременной потенциации *in vivo*
3. Регуляция синаптической пластичности сигнальным каскадом Wnt реализуется преимущественно через пресинаптические механизмы, а оверэкспрессия белка Wnt3 приводит к постсинаптическим перестройкам

Апробация работы

Основные результаты работы были доложены на международных конференциях: двух региональных Европейских форумах по нейронаукам (Прага, 2013; Фессалоники, 2015), 9-м Европейском форуме по нейронаукам (Милан, 2014); на школах-конференциях молодых ученых ИВНД и НФ РАН (Москва, 2012, 2013) и апробированы на межлабораторной конференции ИВНД и НФ РАН (Москва, 2015).

Структура диссертации

Диссертационная работа представлена на 100 страницах машинописного текста и состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы (172 источника). Материал проиллюстрирован 22 рисунками.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Схема эксперимента

Исследование влияния СП Wnt на синаптическую пластичность было проведено на половозрелых самцах крыс линии Вистар весом 250-350 г. Общее число использованных в эксперименте животных составило 180 особей. Животные были разделены на четыре группы. Первая группа получала инъекцию лентивирусной конструкции, экспрессирующей доминантно-негативный Wnt1 (LV-dnWnt1) – белок Wnt1, не способный связываться с рецептором Fzd и, следовательно, запускать каскад Wnt; вторая группа получала инъекцию лентивирусной конструкции, оверэкспрессирующей Wnt3 (LV-Wnt3). Контрольные группы получали эквивалентные объемы пустой лентивирусной конструкции, экспрессирующей только GFP (LV-GFP), либо физиологического раствора для исключения влияния собственно лентивируса (Saline). Все лентивирусные конструкции были разработаны и изготовлены Сергеем Владимировичем Саложиным и лабораторией молекулярной нейробиологии ИВНД и НФ РАН (Саложин, Большаков, 2008; Тухбатова и др., 2011). Инъекции лентивирусных суспензий либо физраствора крысам осуществляли после наркотизации хлоралгидратом (0.4 г/кг, в/б). Суспензию в объеме 2 мкл вводили унилатерально в область CA1 правого гиппокампа крысы по

координатам: -2.5 а/р, -1.6 м/л, 3.3 d/v от брегмы – со скоростью 0.2 мкл/мин. Крысам давали 14 дней для восстановления после операции.

Электрофизиологическое исследование на наркотизированных животных *in vivo*

Для нейрофизиологического исследования влияния лентивирусных конструкций на долговременную потенциацию (ДП) *in vivo* животных наркотизировали уретаном (1.75 г/кг, в/б) и стереотаксически унилатерально вживляли биполярные электроды по следующим координатам: коллатерали Шаффера -3.0 а/р, -3.0 м/л, 3.0-3.4 d/v от брегмы (стимуляция); поле СА1 гиппокампа -2.7 а/р, -1.5 м/л, 2.2-2.8 d/v от брегмы (регистрация, Paxinos, Watson, 2005). Эффективность синаптической передачи оценивали, регистрируя фокальные возбуждающие постсинаптические потенциалы (фВПСП) в поле СА1 при парной стимуляции прямоугольными импульсами с межстимульным интервалом 30 мс. Интенсивность стимула подбирали так, чтобы амплитуда фВПСП достигала 40-50% от максимальной. После стабилизации ответов в течение 60 минут проводили запись фоновой активности. Для индукции долговременной потенциации использовали высокочастотную тетанизацию. После тетанизации запись вели еще 180 минут.

Для каждого животного среднее значение амплитуды либо угла наклона фВПСП до тетанизации принимали за 100% и далее значения фВПСП после тетанизации считали относительно него. Все данные представлены в виде среднее значение \pm SEM (стандартная ошибка среднего). Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft, USA). Для оценки достоверности изменений использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с повторными измерениями - метод с одним межгрупповым (введение вируса) и одним внутригрупповым (повторные изменения в ходе тестирования) факторами. Для внутригруппового сравнения использовали апостериорный метод наименьших значимых различий Фишера (Fisher's LSD *post hoc* test). Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Изменения амплитуды фВПСП во время долговременной потенциации на 20-й, 60-й и 180-й минутах анализировали с помощью t-критерия Стьюдента.

Изменения коэффициента парной фасилитации (ПФ) на протяжении всего периода регистрации также оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями, сопровождающегося апостериорным методом наименьших значимых различий Фишера. Значимость изменений усредненного по времени исходного коэффициента ПФ (до тетанизации) определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для оценки зависимости между усредненной амплитудой ДП в первые 40 минут после тетанизации от исходного коэффициента ПФ вычисляли уравнения соответствующих линий регрессии и анализировали коэффициенты корреляции Пирсона.

Биохимический анализ изменений СП Wnt в гиппокампе

Через 14 дней после инъекции у животных, наркотизированных уретаном (1.75 г/кг, в/б), изымали дорсальную часть правого гиппокампа. Образцы гиппокампов гомогенизировали и получали цитоплазматическую и ядерную фракции. Белки массой от 25 до 130 кДа разделяли с помощью электрофореза и переносили на PVDF мембрану. Для оценки количества белков СП Wnt с помощью вестерн блоттинга использовали следующие первичные антитела: анти-Wnt1, анти-Wnt3, анти-GSK-3 β , анти-фосфо-GSK-

3 β (Ser 9), анти- β -катенин, анти-циклин D1, анти-c-Мус, анти-PSD-95. Для нормировки все блоты стриппировали и окрашивали повторно антителами мыши против α -тубулина. Результаты вестерн блоттинга анализировали с помощью программы NIH ImageJ и представляли в виде средних значений иммунореактивности, нормированных на α -Тубулин, в процентах от среднего значения иммунореактивности в группе LV-GFP. Уровни белков β -катенина, фосфо- β -катенина (Ser45), GSK-3 β и фосфо- GSK-3 β (Ser9) в ядерной фракции измеряли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Результаты ИФА представлены в виде средних значений оптической плотности при 450 нм, нормированных на миллиграмм белка, в процентах от среднего значения в группе LV-GFP. Киназную активность GSK-3 β определяли в иммунопреципитатах, полученных из гомогенатов гиппокампа и представляли в процентах от среднего значения в группе LV-GFP. Достоверность эффектов в биохимических тестах оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Оценка распространения лентивирусных конструкций в гиппокампе.

Для проверки распространения лентивирусных конструкций в гиппокампе проводили морфологический контроль: через 14 дней после инъекции вирусов животное, анестезированное уретаном (1.75 г/кг, в/б), подвергали транскардиальной перфузии, после чего мозг извлекали и помещали 4% раствор параформальдегида на 2 дня. Через 2 дня из полученного мозга изготавливали фронтальные срезы толщиной 50 мкм и проводили иммуногистохимический анализ. Размер области заражения и точность ее локализации в гиппокампе оценивали визуально по свечению зеленого флуоресцентного белка (GFP).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Распространение лентивирусной конструкции в гиппокампе и эффективность заражения.

В данной работе для исследования роли СП Wnt в регуляции синаптической пластичности были использованы 3 лентивирусных конструкции: LV-dnWnt1 для подавления каскада (loss-of-function study), LV-Wnt3 – для его усиления (gain-of-function study), LV-GFP – контрольная, не несущая гена интереса (Ivanova et al., 2016). Каждый из лентивирусных векторов содержал кассету IRES-GFP, обеспечивающую экспрессию GFP в клетках, зараженных любой из использованных в данной работе лентивирусных суспензий. По результатам иммунохимического окрашивания антителами к GFP области CA1 гиппокампа через 14 дней после инъекции суспензии лентивирусной конструкции объем заражения составлял около 1.5 мм³.

Конструкция LV-dnWnt1 содержит доминантно-негативную мутацию гена, кодирующего белок Wnt1, и нарушает функции СП Wnt за счет связывания аномального белка с рецепторами и корецепторами нормального Wnt1, не влияя на уровень экспрессии нормального белка (García-Castro et al., 2002; Hoopler, 1996). Полученные в данной работе результаты вестерн блоттинга подтвердили, что инъекция суспензии LV-dnWnt1 в область CA1 гиппокампа не меняет уровень экспрессии Wnt1 (рис.1А). В то же время, как и ожидалось, инъекция суспензии LV-Wnt3 вызывала значительное повышение уровня экспрессии белка Wnt3 (рис.1Б).

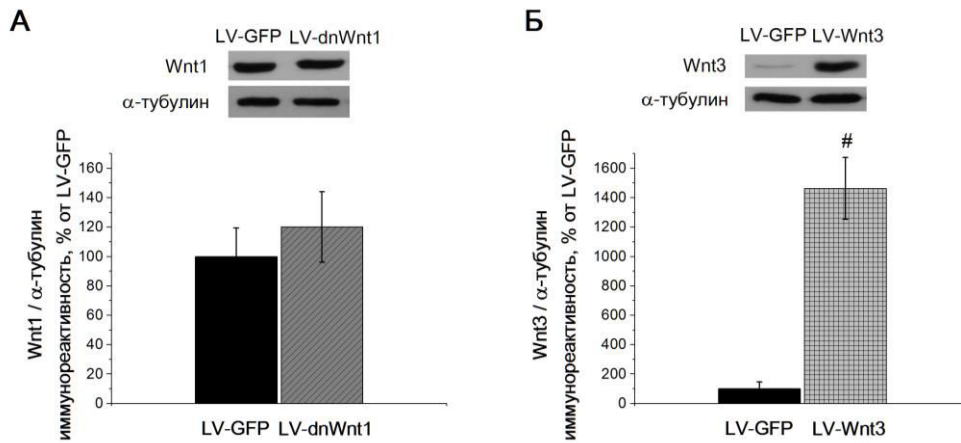


Рисунок 1. Уровни экспрессии белков *Wnt1* (А) и *Wnt3* (Б) через 14 дней после инъекции суспензий *LV-dnWnt1* (А, $n=13$) и *LV-Wnt3* (Б, $n=8$) соответственно; статистически значимые отличия при $p<0.01$ отмечены #.

Влияние хронического подавления и усиления СП Wnt на синаптическую пластичность.

Для изучения возможности регуляции синаптической пластичности в гиппокампе на модели ДП *in vivo* с помощью лентивирусной модуляции СП Wnt был проведен анализ динамики изменения амплитуд фВПСП до и после высокочастотной стимуляции (тетанизации) через 14 дней после лентивирусной трансдукции. Для исключения возможного влияния лентивирусной конструкции на ДП *in vivo* были протестированы две контрольные группы животных. *LV-GFP* и *Saline*. Статистический анализ не выявил достоверных различий между контрольными группами на протяжении всей записи (180 мин), что позволяет предположить отсутствие значимого влияния лентивирусной трансдукции на ДП *in vivo* и в рамках данной модели сравнивать экспериментальные группы только с одной из контрольных – группой *LV-GFP*.

В первой серии экспериментов исследовали роль СП Wnt в индукции и поддержании ДП *in vivo* с помощью конструкции *LV-dnWnt1*, подавляющей его работу. *LV-dnWnt1* вызывала достоверное снижение амплитуды ДП по сравнению с *LV-GFP* на протяжении всего времени записи (180 мин). Наиболее выраженные статистические отличия были выявлены с 10-й по 130-ю минуты регистрации после тетанизации (рис.2А). Усредненные амплитуды ДП в 20-ю и 60-ю минуты записи после тетанизации в группе *LV-dnWnt1* были значительно снижены относительно таковых в группе *LV-GFP*. Однако к 180-й минуте различия потеряли статистическую значимость (рис.2Б), что говорит о возможности восстановления амплитуды ДП до прежнего уровня в дальнейшем.

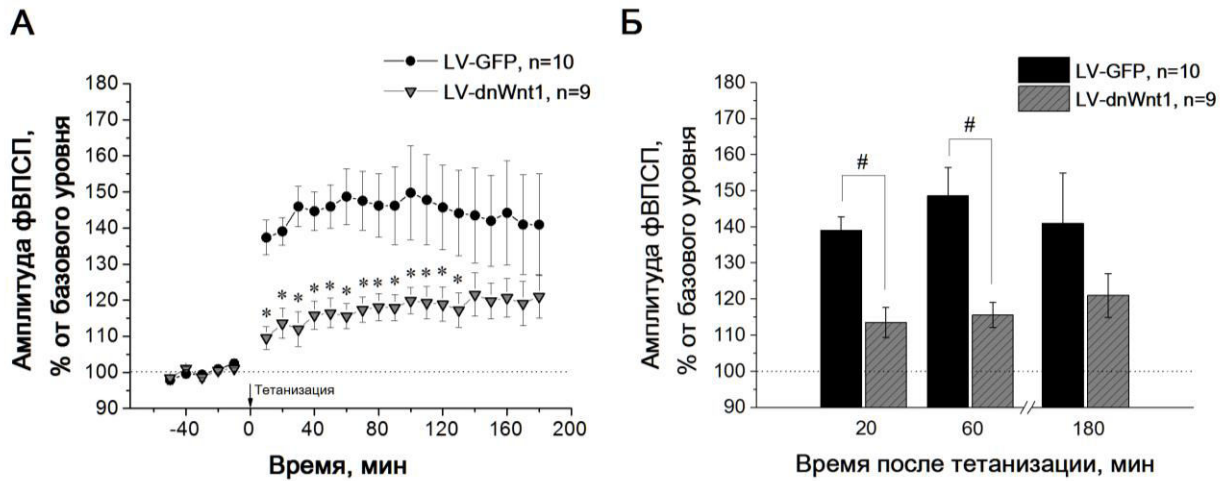


Рисунок 2. Долговременная потенция *in vivo* в условиях хронического подавления СП *Wnt*. **А.** Динамика изменения амплитуд фВПСП в течение 60 минут до и 180 минут после высокочастотной тетанизации. **Б.** ДП *in vivo* через 20, 60 и 180 минут после тетанизации. Достоверные отличия значений в группе *LV-dnWnt1* от значений в группе *LV-GFP* при $p < 0.05$ отмечены *, при $p < 0.01$ - #.

Вторая серия экспериментов была посвящена исследованию влияния оверэкспрессии белка *Wnt3* - на индукцию и поддержание ДП. Локальное хроническое увеличение экспрессии *Wnt3* в гиппокампе было достигнуто с помощью инъекции суспензии конструкции *LV-Wnt3*. *LV-dnWnt3* вызывала кратковременное (80 минут) увеличение амплитуды ДП по сравнению с *LV-GFP*. При этом наиболее значимые изменения были выявлены лишь в первые 50 минут после тетанизации (рис. 3А). Усредненная амплитуда ДП была достоверно повышена в группе *LV-Wnt3* относительно группы *LV-GFP* в 20-ю минуту записи после тетанизации, в то время как в 60-ю и 180-ю минуты значимых различий между группами уже не наблюдалось (рис. 3Б)

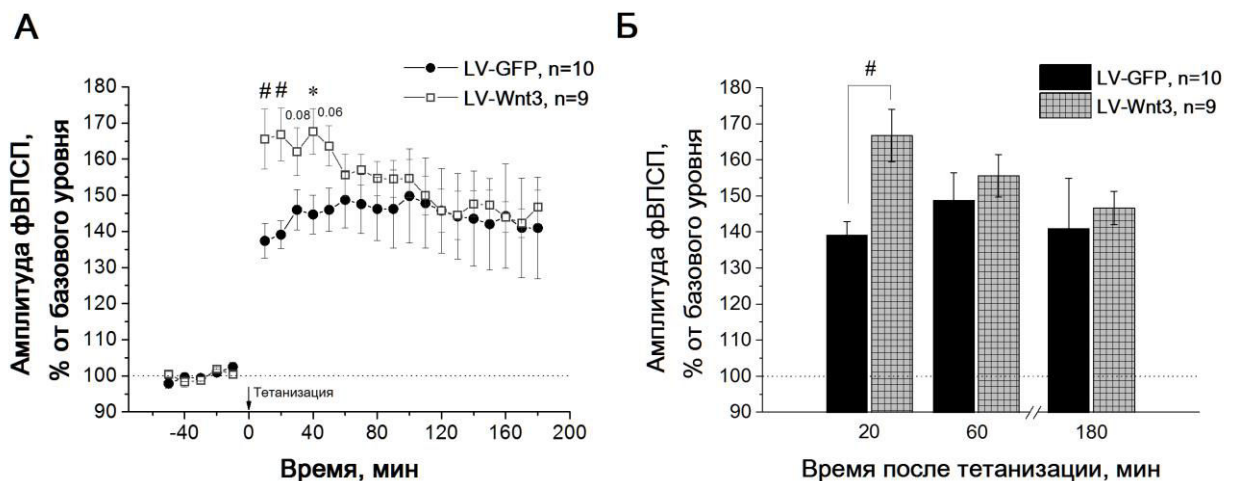


Рисунок 3. Долговременная потенция *in vivo* на фоне хронической оверэкспрессии *Wnt3*. **А.** Динамика изменения амплитуд фВПСП в течение 60 минут до и 180 минут после высокочастотной тетанизации. **Б.** ДП *in vivo* через 20, 60 и 180 минут после тетанизации. Достоверные отличия значений в группе *LV-Wnt3* от значений в группе *LV-GFP* при $p < 0.05$ отмечены *, при $p < 0.01$ - #.

Пресинаптические изменения в результате хронического подавления и усиления СП Wnt.

Для оценки вклада пресинаптического аппарата в реализацию наблюдаемых изменений в синаптической пластичности анализировали парную фасилитацию (ПФ) в поле CA1 гиппокампа при парной стимуляции. Дисперсионный анализ не выявил достоверных различий между значениями в контрольных группах: в группе LV-GFP и в группе Saline ни после тетанизации, ни до неё. Значение коэффициента ПФ после тетанизации не отличалось от значений в группе LV-GFP и в экспериментальных группах LV-dnWnt1 и LV-Wnt3. В то же время значения коэффициента ПФ до тетанизации (исходный коэффициент ПФ) в группе LV-dnWnt1 были значительно ниже таковых в группе LV-GFP. В группе LV-Wnt3 дисперсионный анализ не выявил достоверных отличий от контрольной группы (рис. 4А). Усреднённый по времени коэффициент ПФ до тетанизации в группе LV-dnWnt1 был также значительно ниже такового в группе LV-GFP. Значение этого параметра в группе LV-Wnt3 достоверно не отличалось от контроля (рис. 4Б).

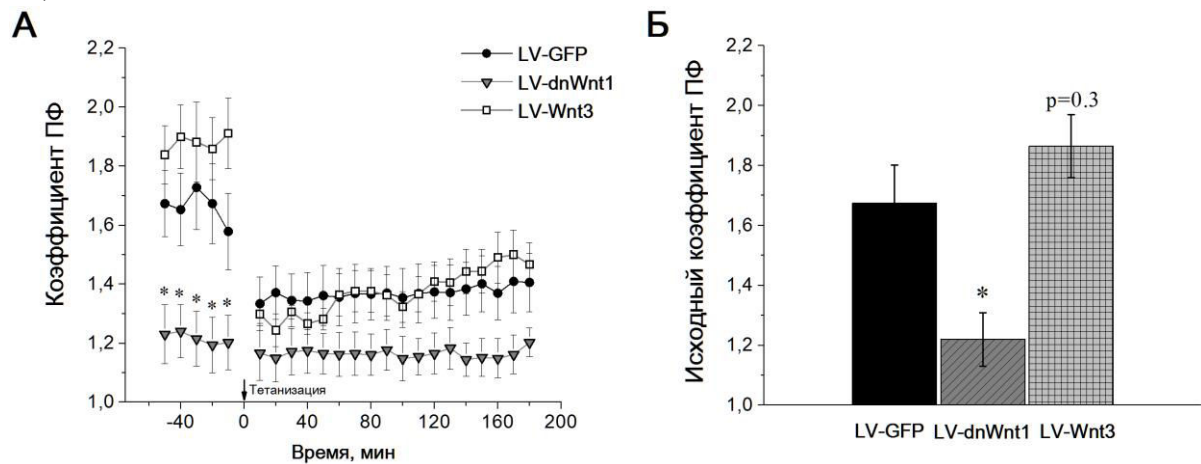


Рисунок 4. А. Динамика изменения коэффициента ПФ в течение 60 минут до и 180 минут после высокочастотной тетанизации. Б. Исходный коэффициент ПФ (до тетанизации). Достоверные отличия значений в группах LV-dnWnt1 ($n=9$) и LV-Wnt3 ($n=9$) от значений в группе LV-GFP ($n=10$) при $p<0.05$ отмечены *.

Наблюдаемые изменения ДП *in vivo* преимущественно относились к ее ранней фазе (около 1 ч), поэтому для определения пресинаптического вклада в реализацию механизмов полученных эффектов также оценивали зависимость ДП в первые 40 минут после тетанизации от исходного коэффициента фасилитации. В группе LV-GFP была обнаружена слабая корреляция (рис. 5Б). В группе LV-Wnt3 корреляция была сильнее (рис. 5Г). В группе LV-dnWnt1 корреляции не было выявлено (рис. 5В). Интересно, что в группе Saline корреляция между ДП в первые 40 минут после тетанизации и исходным коэффициентом ПФ оказалось сильнее, чем даже в группе LV-Wnt3 (рис. 5А).

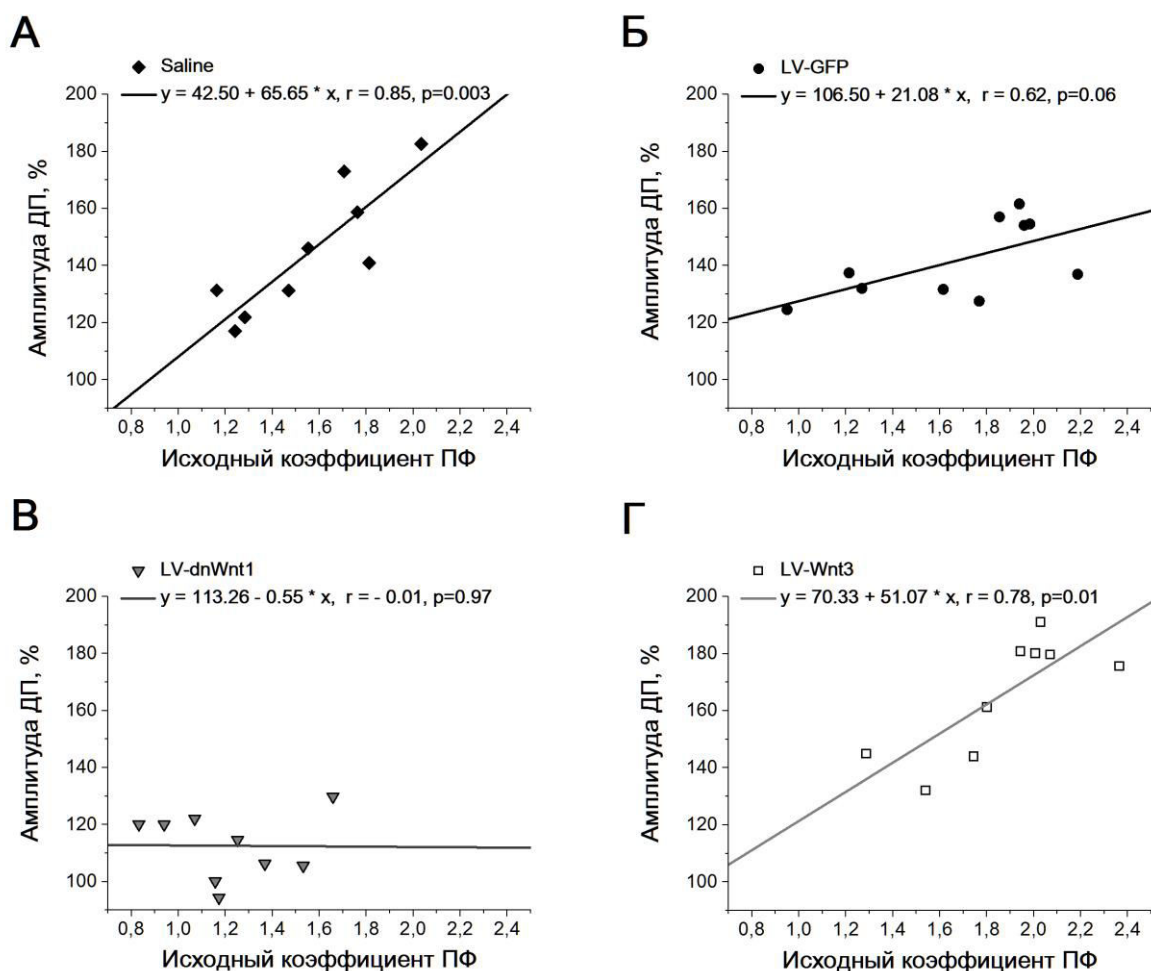


Рисунок 5. Зависимость усредненной амплитуды фВПСП в первые 40 минут после тетанизации от исходного коэффициента ПФ в группах Saline (А, n=9), LV-GFP (Б, n=10), LV-dnWnt1 (В, n=9) и LV-Wnt3 (Г, n=9). Для каждой группы на рисунке представлены уравнения линии регрессии, коэффициенты корреляции (r) и значимость корреляции (p).

Постсинаптические изменения в результате хронического подавления и усиления СП Wnt.

В качестве показателя постсинаптических изменений оценивали экспрессию белка постсинаптической плотности PSD-95. В группе LV-dnWnt1 уровень PSD-95 не отличался от контрольной группы (рис. 6А), однако в группе LV-Wnt3 он был значительно повышен (рис. 6Б).

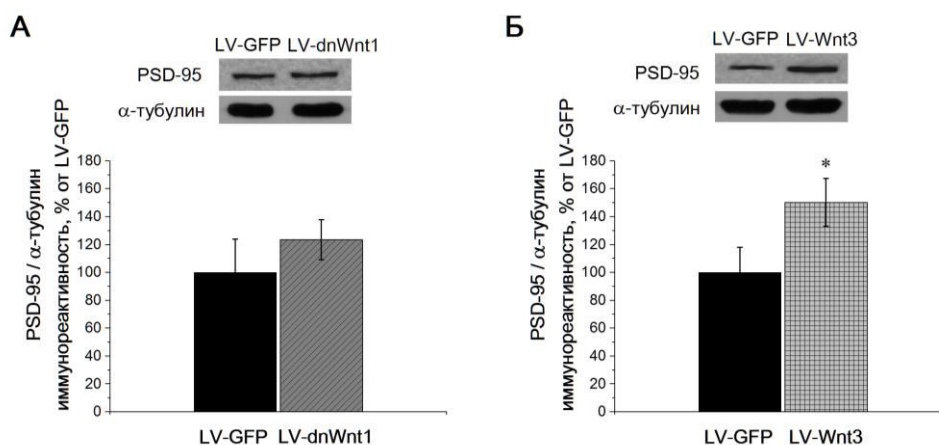


Рисунок 6. Уровень экспрессии белка постсинаптической плотности (PSD-95) через 14 дней после инъекции суспензий LV-dnWnt1 (А, $n=9$) и LV-Wnt3 (Б, $n=9$). Здесь и далее статистически значимые отличия при $p<0.05$ отмечены *.

Изменение экспрессии белков СП Wnt в гомогенатах гиппокампа через 14 дней после лентивирусной трансдукции.

В целях детального изучения механизмов, лежащих в основе регуляции ДП *in vivo* посредством локального подавления и усиления СП Wnt, в цитозольной фракции гомогенатов гиппокампа были определены уровни экспрессии белков каскада: Wnt1, Wnt3, β -катенина, циклина D1, с-Мус, GSK-3 β . В ядерной фракции были измерены уровни экспрессии β -катенина, GSK-3 β .

Биохимический анализ гомогенатов гиппокампа в контрольных группах LV-GFP и Saline проводили параллельно с экспериментальными (LV-dnWnt1 или LV-Wnt3). Эксперименты с LV-dnWnt1 и LV-Wnt3 методом вестерн блоттинга были разделены во времени, поэтому для оценки влияния собственно лентивирусной конструкции сравнивали пары контрольных групп в обеих сериях. В случае ИФА измеряли параллельно все 4 группы. Достоверное отличие между контрольными группами наблюдалось только в случае β -катенина в ядерной фракции, что дает основания предположить отсутствие значимого влияния лентивирусной трансдукции на экспрессию остальных белков в обеих фракциях и при оценке их экспрессии сравнивать экспериментальные группы только с одной из контрольных – группой LV-GFP.

Оценку биохимических изменений в гиппокампе через 14 дней после лентивирусной трансдукции справедливо начать с центрального белка канонического каскада Wnt β -катенина. В группе LV-dnWnt1 уровень экспрессии β -катенина был значительно снижен относительно контрольной группы (рис. 7А), а в группе LV-Wnt3 – достоверно повышен (рис. 7Б).

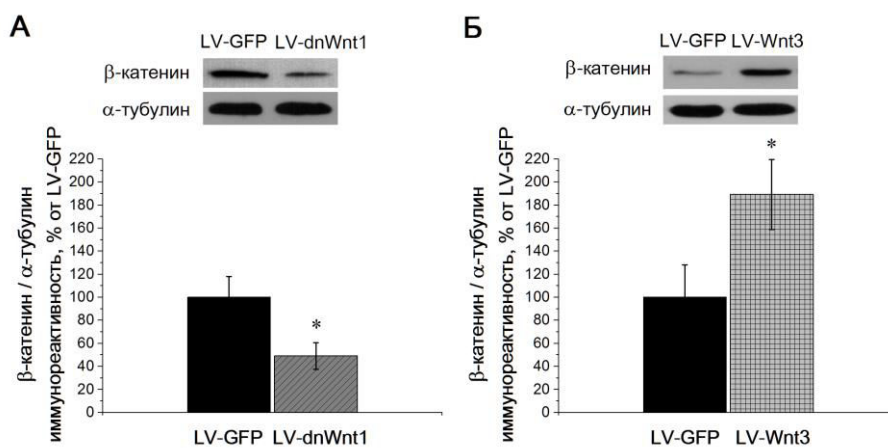


Рисунок 7. Уровень экспрессии β -катенина через 14 дней после инъекции суспензий LV-dnWnt1 (А, $n=9/группу$) и LV-Wnt3 (Б, $n=10/группу$).

При активации канонического каскада Wnt β -катенин может перемещаться в ядро и, связываясь с транскрипционными факторами TCF/LEF, регулировать транскрипцию циклина D1 и с-Мус (He et al. 1998; Shtutman et al. 1999). Логично предположить, что уменьшение и увеличение уровня экспрессии β -катенина может сопровождаться снижением и повышением соответственно уровней экспрессии циклина D1 и с-Мус. Тем не менее, уровень циклина D1 не был изменен в группе LV-dnWnt1 относительно контрольной (рис. 8А), хотя в группе LV-Wnt3 был достоверно повышен (рис. 8Б). При этом на уровень экспрессии с-Мус не повлияла ни конструкция LV-dnWnt1, ни конструкция LV-Wnt3.

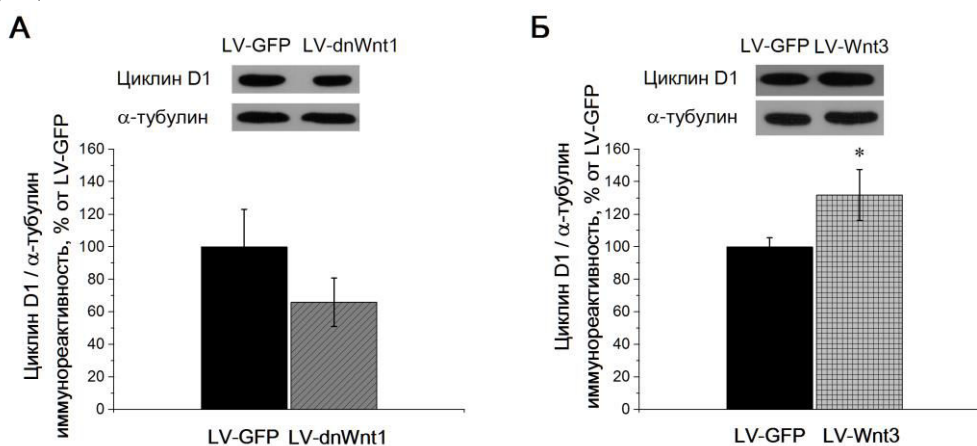


Рисунок 8. Уровни экспрессии Циклина D1 через 14 дней после инъекций суспензий LV-dnWnt1 (А, $n=12/группу$) и LV-Wnt3 (Б, $n=14/группу$).

Особое внимание было уделено изучению изменений уровня экспрессии и активности GSK-3 β , так как ее вовлеченность в процессы синаптической пластичности широко освещена в литературе последних лет (Zhu et al. 2007; Hooper et al. 2007; Chew et al. 2015). Уровень экспрессии GSK-3 β не отличался от контроля ни в группе LV-dnWnt1, ни в группе LV-Wnt3. Однако, вопреки ожиданиям, уровень фосфорилированной по 9 серину формы GSK-3 β (фосфо-GSK-3 β) был значительно снижен как в группе LV-dnWnt1 (рис. 9А), так и в группе LV-Wnt3 (рис. 9Б).

Фосфорилирование GSK-3 β по 9 серину снижает доступность активного центра киназы (Jore et al. 2007), поэтому уменьшение уровня фосфо-GSK-3 β свидетельствует об

увеличении ее активности. Для проверки этого предположения в группах LV-dnWnt1, LV-Wnt3 и LV-GFP была измерена киназная активность GSK-3 β . В группе LV-dnWnt1 не было выявлено достоверных изменений. В то же время в группе LV-Wnt3 активность GSK-3 β была увеличена значительно (рис. 9B).

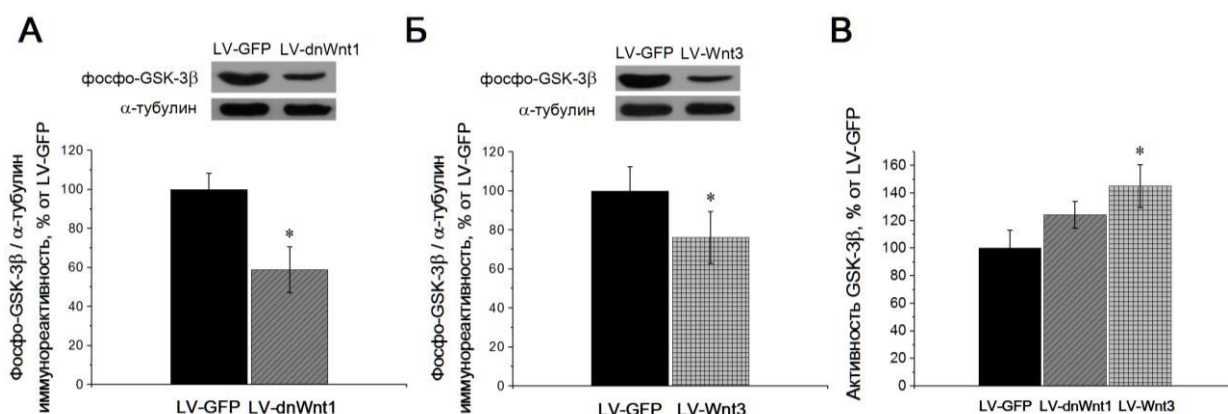


Рисунок 9. А, Б. Уровни экспрессии GSK-3 β , фосфорилированной по 9 серину, через 14 дней после инъекций суспензий LV-dnWnt1 (А, n=9) и LV-Wnt3 (Б, n=14). **В.** Киназная активность GSK-3 β (n=6).

Поскольку белки GSK-3 β и β -катенин обладают разными функциями в ядре клетки и в цитозоле (Everly et al., 2004; Wisniewska et al., 2010), уровни их экспрессии были измерены и в ядерной фракции гомогенатов гиппокампа. Как было отмечено выше, в ядерной фракции уровень экспрессии β -катенина в группе Saline значительно отличался от такового в группе LV-GFP, поэтому при обработке результатов экспериментальные группы сравнивали с обеими контрольными. Однако ни в группе LV-dnWnt1, ни в группе LV-Wnt3 не было выявлено достоверных изменений этого показателя ни от значений в группе LV-GFP, ни от значений в группе Saline (рис. 10А). Также в ядерной фракции был измерен уровень β -катенина, фосфорилированного по серину 45 (фосфо- β -катенина). Уровень фосфо- β -катенина в ядерной фракции в группе LV-dnWnt1 был достоверно снижен относительно значений в группе, получавшей инъекции LV-GFP. В группе LV-Wnt3 статистически значимых отличий от контроля обнаружено не было (рис. 10Б).

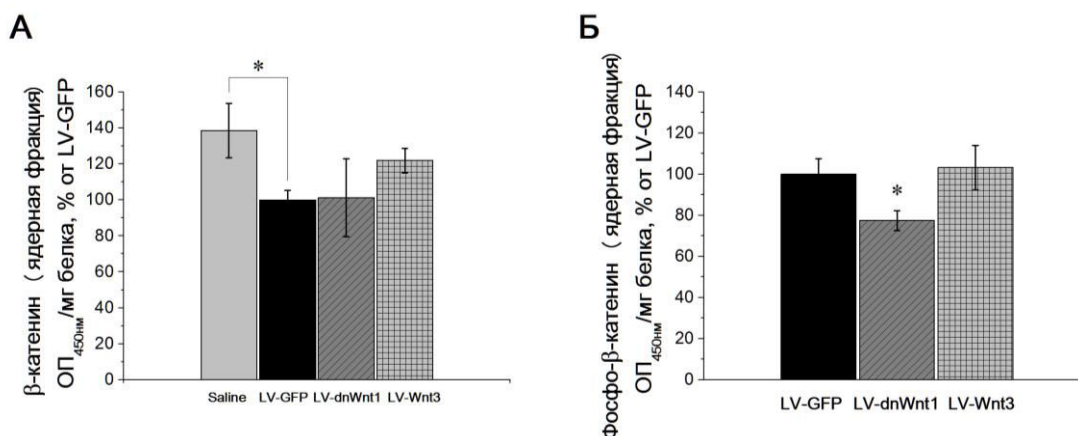


Рисунок 10. Уровни экспрессии β -катенина (А) и его фосфорилированной по 45 серину формы (Б) в ядерной фракции гомогената гиппокампа через 14 дней после инъекций суспензий LV-dnWnt1 (А, n=5; Б, n=7), LV-Wnt3 (А, n=5; Б, n=9), LV-GFP (А, n=5; Б, n=10) и физиологического раствора (Saline, n=5). Статистически значимые отличия от значений в группе LV-GFP при $p < 0.05$ отмечены *.

Уровень экспрессии GSK-3 β в ядерной фракции, как и в цитозоле, не был достоверно изменен относительно группы LV-GFP ни в группе LV-dnWnt1, ни в группе LV-Wnt3 (рис. 11А). Уровень фосфо-GSK-3 β в ядерной фракции в группе LV-dnWnt1 также не отличался от контроля, хотя в группе LV-Wnt3 уровень фосфо-GSK-3 β в ядерной фракции, как и в цитозоле, был значительно снижен относительно группы LV-GFP (рис. 11Б).

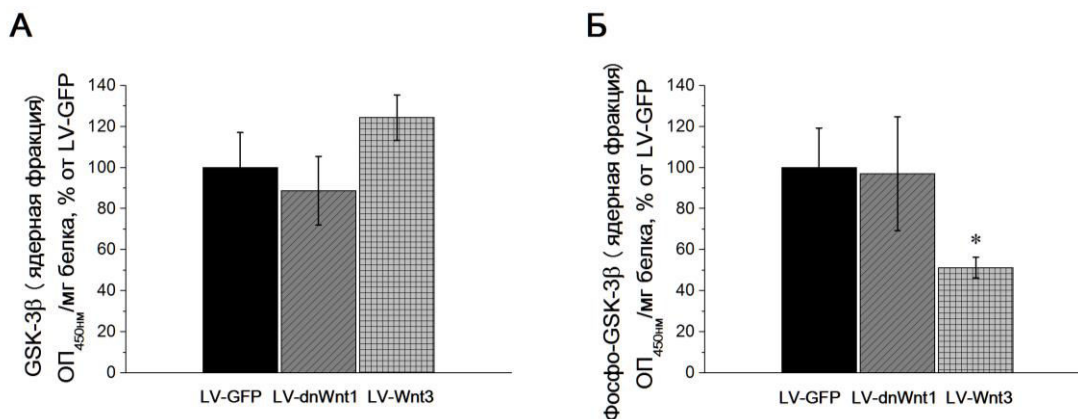


Рисунок 11. Уровни экспрессии GSK-3 β (А) и ее фосфорилированной по 9 серину формы (Б) в ядерной фракции гомогената гиппокампа через 14 дней после инъекций суспензий LV-dnWnt1 (А, n=8; Б, n=7), LV-Wnt3 (А, n=9; Б, n=10) и LV-GFP (А, n=6; Б, n=8). Статистически значимые отличия от значений в группе LV-GFP при $p < 0.05$ отмечены *.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С 1973 года долговременная потенция (ДП) является одной из наиболее используемых моделей для изучения механизмов регуляции синаптической пластичности (Брагин и Виноградова 1973; Bliss & Lomo 1973; Bliss and Collingridge 1993). В настоящее время различают 3 фазы ДП: кратковременная потенция, продолжающаяся 30-45 минут сразу после тетанизации; ранняя ДП, начинающаяся через 30 минут или раньше и продолжающаяся 2-3 часа; поздняя ДП, длящаяся в течение многих часов (Bliss and Collingridge 1993, Sweatt 1999). На каждой стадии действуют различные молекулярные механизмы, включающие в себя взаимодействие множества сигнальных каскадов. Данное исследование посвящено участию сигнального пути Wnt в регуляции синаптической пластичности.

Недавние исследования продемонстрировали *in vitro* нарушение ДП в срезах гиппокампа при фармакологическом ингибировании СП Wnt (Chen et al. 2006; Vargas et al. 2014; Vargas et al. 2015), в то время, как при его активации у контрольных мышей ДП увеличивалась, а в амилоидной модели болезни Альцгеймера ДП восстанавливалась до нормального уровня (Vargas et al. 2014; Vargas et al. 2015). В этих и других исследованиях влияния подавления и усиления СП Wnt на ДП в срезах гиппокампа использовали фармакологические ингибиторы и активаторы (Chen et al. 2006; Cerpa et al, 2011; Vargas et al, 2014; Vargas et al., 2015). Целью данного исследования было изучить возможность регуляции ДП *in vivo* посредством хронического лентивирусного подавления и усиления СП Wnt. Как и ожидалось, генетическое подавление СП Wnt в области CA1 гиппокампа обеспечивало устойчивое подавление ДП *in vivo* на протяжении 2 часов. Через 3 часа после тетанизации амплитуда ДП не восстановилась до уровня контроля, но ее отличия от

него стали незначительными. Таким образом, можно заключить, что лентивирусное подавление СП Wnt нарушает индукцию и экспрессию ранней фазы ДП *in vivo* с возможностью ее восстановления, в то время, как применение *in vitro* ингибитора СП Wnt (Wnt scavenger) и антител к Wnt3 влияет и на поддержание ДП (Chen et al. 2006; Sweatt 1999).

Экспрессия ДП в ранней фазе зависит как от пре-, так и от постсинаптических механизмов (Voronin 1993b; Bliss and Collingridge 1993; Schulz et al. 1994; Sweatt 1999; Силькис 2000). В данном исследовании в качестве показателя эффективности работы пресинаптического аппарата анализировали парную фасилитацию (ПФ) – увеличение второго «тестирующего» постсинаптического ответа после первого «обуславливающего» при парной стимуляции (Kleschevnikov et al. 1997). В нормальных условиях экспрессия ДП в первые 60 минут после тетанизации коррелирует со значениями исходного коэффициента ПФ (до тетанизации, Schulz et al. 1994; Kleschevnikov et al. 1997). Эта зависимость закономерна, так как пресинаптические перестройки связывают с изменением количества зон выброса медиатора либо вероятности выброса в каждой активной зоне (Voronin 1993b), что чрезвычайно важно для возникновения и поддержания ранней фазы ДП (Kleschevnikov et al. 1997). Явное отсутствие такой корреляции, а также значительное снижение исходного коэффициента ПФ в группе LV-dnWnt1 относительно контроля свидетельствует о нарушении работы пресинаптического аппарата, которое могло быть вызвано хроническим подавлением СП Wnt. Несмотря на то, что феномен парной фасилитации не может полностью прояснить этот вопрос, результаты хорошо согласуются с литературными данными об участии белков Wnt в пресинаптических процессах (Farias et al. 2007; Cerpa et al. 2007; Varela-Nallar et al. 2009; Ahmad-Annuar et al. 2006).

Для анализа возможных постсинаптических изменений в области CA1 гиппокампа через 14 дней после лентивирусной трансдукции оценивали уровень экспрессии белка постсинаптической плотности (PSD-95). PSD-95 является строительным белком, поддерживающим встраивание глутаматных рецепторов в мембрану (Sheng 2001). Ранее было показано, что ингибитор СП Wnt Dkk-1 вызывает снижение уровня PSD-95 в гиппокампе (Fortress et al. 2013), однако проведенный в данной работе биохимический анализ не выявил достоверных изменений в уровне PSD-95 при лентивирусном подавлении СП Wnt. Полученный результат не позволяет полностью исключить участие постсинаптических механизмов в эффектах действия LV-dnWnt1, но подтверждает гипотезу о том, что в наблюдаемом нарушении ДП *in vivo* ключевую роль играют пресинаптические процессы.

Хроническая оверэкспрессия Wnt3 повлекла за собой кратковременное увеличение амплитуды ДП *in vivo*, сопровождающееся повышением уровня экспрессии PSD-95. В то же время недавние исследования продемонстрировали, что хроническая активация СП Wnt действием WASP-1 (Wnt-activating small molecule), так же, как и кратковременное воздействие Wnt3 либо LiCl, увеличивает индукцию и поддержание ДП *in vitro*, не меняя уровень PSD-95 (Chen et al. 2006; Vargas et al. 2014). Для того, чтобы согласовать эти факты, следует отметить, что достоверные изменения ДП *in vivo* при лентивирусном усилении СП Wnt были выявлены лишь в течение первых 40 минут после тетанизации в отличие от длительных изменений ДП *in vitro* при фармакологической активации. Таким образом, хроническая оверэкспрессия Wnt3 влияла только на фазу кратковременной

потенциации, зависящей преимущественно от количества рецепторов NMDA и AMPA на постсинаптической мембране (Bliss and Collingridge 1993). Ранее в срезах гиппокампа было показано, что PSD-95, управляя встраиванием AMPA-рецепторов, может искусственно симулировать ДП, предотвращая индукцию нормальной ДП (Stein et al. 2003; Ehrlich et al. 2004). И хотя PSD-95 не является необходимым для индукции и экспрессии ДП, его нокдаун ослабляет образование новых молчащих синапсов, содержащих только NMDA-рецепторы (Ehrlich et al. 2007). Вполне возможно, что увеличение уровня экспрессии PSD-95 за счет встраивания новых AMPA-рецепторов может уменьшать количество молчащих синапсов, облегчая тем самым индукцию ДП *in vivo*, однако это предположение требует дополнительного подтверждения.

Сильная корреляция между экспрессией ранней ДП *in vivo* и исходным коэффициентом ПФ косвенно свидетельствует об улучшении пресинаптических функций (Schulz et al. 1994; Kleschevnikov et al. 1997). Тем не менее, отсутствие значимого увеличения исходного коэффициента ПФ относительно контроля подтверждает предположение о преимущественно постсинаптическом механизме наблюдаемого усиления ДП. Кроме того, в группе, получавшей инъекции физиологического раствора, корреляция между экспрессией ранней фазы ДП *in vivo* и исходным коэффициентом ПФ была даже сильнее, чем в группе, получавшей инъекции LV-Wnt3. Этот факт следует отметить как возможный побочный эффект действия лентивирусной конструкции *per se*, однако, к сожалению, в рамках данной выборки невозможно точно вычислить достоверность отличий друг от друга корреляций в группах Saline, LV-GFP и LV-Wnt3 и оценить нежелательные последствия действия лентивирусов.

Наблюдаемые пре- и постсинаптические изменения могут быть следствием повышения и понижения уровня β -катенина в цитозоле на фоне действия лентивирусных конструкций. Ранее было показано, что в пресинапсе β -катенин контролирует размеры и местоположение скопления везикул, в то время, как в постсинапсе он регулирует форму и размеры дендритных шипиков (Maguschak and Ressler 2011). Также β -катенин может служить связующим звеном во взаимодействии кадгеринов с актиновым цитоскелетом, тем самым регулируя работу кадгерин – содержащих адгезивных комплексов для формирования синапсов, поддержания синаптической структуры и ее трансформаций (Goda 2002; Togashi et al. 2002; Chen et al. 2006; Кудряшова 2009).

В отсутствие лигандов Wnt активен комплекс деградации β -катенина, при этом сначала киназа 1α , а затем киназа гликоген синтазы -3β (GSK- 3β) фосфорилируют β -катенин, тем самым помечая его для убиквитинирования и протеасомной деградации (Aberle et al. 1997; MacDonald et al. 2009; Clevers and Nusse 2012; Oliva et al. 2013). К сожалению, измерить уровень фосфорилированного β -катенина в цитозоле – показатель степени деградации белка – не удалось. Вероятно, фосфорилирование β -катенина слишком быстро сменяется его убиквитинированием и протеасомной деградацией, что делает невозможным связывание с использованными антителами (Sadot et al., 2002). Однако неожиданно было выявлено значительное снижение уровня фосфо- β -катенина (β -катенина, фосфорилированного по серину 45, сайту фосфорилирования СК- 1α) в ядерной фракции, что свидетельствует в пользу гипотезы об отличии функций фосфорилирования β -катенина по 45 серину в ядре от таковых в цитозоле (Maher et al., 2010). Эффектов воздействия конструкции LV-Wnt3 на фосфорилированный β -катенин в ядерной фракции обнаружено не было.

Интересно, что уровень общего β -катенина в ядерной фракции достоверно различался в двух контрольных группах. Этот факт также, как и в случае корреляции между экспрессией ранней фазы ДП *in vivo* и исходным коэффициентом ПФ (раздел 4.2), можно выделить, как побочный эффект действия лентивирусной конструкции *per se*. Однако в обеих экспериментальных группах не было выявлено достоверных отличий уровня общего β -катенина в ядерной фракции ни от одной из контрольных, поэтому в рамках данного исследования дальнейшее обсуждение этого вопроса не имеет смысла. Корреляция между экспрессией ранней фазы ДП *in vivo* и исходным коэффициентом ПФ и уровень общего β -катенина в ядерной фракции – это все параметры, в которых были обнаружены значимые различия между контрольными группами. По остальным изучаемым параметрам побочных эффектов действия лентивирусной конструкции *per se* выявлено не было.

Следует рассмотреть и другую гипотезу о механизмах влияния СП Wnt на синаптическую пластичность, касающуюся активации целевых белков каскада (Chen et al. 2006). В каноническом СП Wnt лиганды Wnt связываются с корецепторами Fz и LRP 5/6, что приводит к прерыванию работы комплекса деградации β -катенина. Стабилизированный β -катенин далее перемещается в ядро для регуляции экспрессии целевых генов каскада, в число которых входят Циклин D1 и c-Myc (Logan and Nusse 2004; Toledo et al. 2008; Hodar et al. 2010; Stamos and Weis 2013). Эти белки являются важными регуляторами плюрипотентности, метаболизма и клеточного цикла клеток предшественников (Amendola et al. 2009; Wey et al. 2010). Ранее применение ингибитора СП Wnt Dkk-1 в гиппокампе снижало уровень Циклина D1 через 4 часа после введения, а уровень c-Myc – уже через 5 минут (Fortress et al. 2013), однако лентивирусное подавление СП Wnt не повлияло ни на уровень Циклина D1, ни на уровень c-Myc. Кроме того, литературные данные свидетельствуют о повышении уровня экспрессии c-Myc (Vargas et al. 2014) и нескольких других целевых белков каскада (Chen et al. 2006) при фармакологической активации СП Wnt, в то время, как лентивирусная оверэкспрессия Wnt3 не повлияла на уровень c-Myc, но вызвала значительное увеличение уровня Циклина D1. Вероятно, изменения СП Wnt/ β -катенина, произведенные LV-dnWnt1, не затрагивают Wnt-зависимую транскрипцию генов. Тогда нарушения ДП *in vivo* на фоне действия LV-dnWnt1 связаны не с изменением транскрипции целевых генов СП Wnt, а с увеличением либо уменьшением активности одного из непосредственных участников каскада. В случае LV-Wnt3 повышение уровня Циклина D1 также может быть следствием иных механизмов, которые будут обсуждаться ниже.

Как было указано выше, лентивирусная трансдукция приводила к изменениям ДП *in vivo* преимущественно в ранней фазе, которая, как известно, сопровождается активацией множества протеинкиназ, таких как CaMKII, PKC, PKA, MAPK (Bliss and Collingridge 1993, Sweatt 1999). Некоторые из них (PKC, PKA and MAPK) могут фосфорилировать GSK-3 β , одну из ключевых частей комплекса деградации β -катенина, регулируя ее активность (Chen et al. 2000; Inestrosa et al. 2002 Peineau et al. 2008). Литературные данные указывают на неоднозначность роли GSK-3 β в синаптической пластичности. С одной стороны, ее активация или оверэкспрессия приводили к нарушениям индукции и поддержания ДП и дефициту пространственной памяти (Zhu et al. 2007; Hernandez et al. 2002; Hooper et al. 2007) а фармакологическое подавление ингибирующего фосфорилирования GSK-3 β с помощью TCS-183 блокировало ДП в срезах гиппокампа

(Vargas et al. 2014). С другой стороны, лентивирусное подавление GSK-3 β в зубчатой извилине гиппокампа вызывало дефицит контекстной памяти страха, хотя и увеличивало ДП (Chew et al. 2015). Также известно, что использование ингибитора GSK-3 β лития, помимо положительного эффекта на синаптическую пластичность, повышает риск развития деменций (Dunn et al., 2005) и приводит к когнитивным нарушениям (Weingartner et al., 1985; Stip et al., 2000; Wingo et al., 2009).

Результаты, полученные в данном исследовании, подчеркивают неоднозначность функций GSK-3 β : уровень экспрессии ее фосфорилированной по ингибирующему сайту серину 9 формы (фосфо-GSK-3 β) был снижен под действием обеих лентивирусных конструкций, а активность увеличена при хронической оверэкспрессии Wnt3. На первый взгляд может показаться, что результаты противоречат данным предыдущих исследований, использовавших фармакологический ингибитор Dkk-1 и активатор WASP-1: Dkk-1 снижал уровень фосфо-GSK-3 β через 5 минут после введения, но увеличивал через 4 часа; применение WASP-1 также повышало уровень фосфо-GSK-3 β (Fortress et al. 2013; Vargas et al. 2014). В случае Dkk-1 несоответствие объясняется кратковременностью его действия: через 4 часа после введения имеют место восстановительные пост-эффекты, а не непосредственное влияние ингибирования. Так, хроническое лентивирусное подавление СП Wnt следует рассматривать как непрерывную последовательность кратковременных пятиминутных периодов ингибиторного действия. Противоречие между эффектами хронического введения WASP-1 и лентивирусной оверэкспрессии Wnt3 относится скорее к методическому несоответствию: Vargas и коллеги измеряли уровень фосфо-GSK-3 β после поведенческих тестов, которые сами по себе вызывают увеличение уровня фосфо-GSK-3 β (Fortress et al. 2013; Vargas et al. 2014).

Рассматривая гипотезу об изменении активности GSK-3 β как о механизме регуляции ДП *in vivo* с помощью СП Wnt, логично предположить, что однонаправленные изменения уровня фосфо-GSK-3 β на фоне применения лентивирусных конструкций противоположного действия могут быть следствием нарушения хрупкого баланса между регулирующими активностью GSK-3 β протенкиназами. В рамках этой гипотезы ухудшение либо улучшение условий для возникновения и поддержания ДП зависит не от направления изменения активности GSK-3 β , а от субстрата, который она фосфорилирует. GSK-3 β может фосфорилировать ряд субстратов, многие из которых вовлечены в синаптическую пластичность (Sutherland et al., 2011). При этом некоторые из них влияют на нее положительно: индуцируемый при гипоксии фактор 1 α (HIF 1 α), ассоциированный с микротрубочками белок 2с (MAP2C), транскрипционный фактор p53 (Corcoran et al., 2013; Han et al., 2014; Pustylnyak et al., 2015), а другие – отрицательно: киназа фокальных контактов (FAK), глюкокортикоидный рецептор (GR), транскрипционный фактор c-Jun, ассоциированный с микротрубочками белок 1b (MAP1B), протеинфосфатаза 1, тау (Yang et al., 2003; Zervas et al., 2005; Genoux et al., 2011; Lee et al., 2011; Seo et al., 2012; Hu et al., 2015; Jing et al., 2015). Главным недостатком этой гипотезы является вопрос, как именно происходит выбор субстрата в случае подавления и усиления СП Wnt, и он, бесспорно, требует дальнейшего исследования.

GSK-3 β локализуется не только в цитозоле, но и в ядрах и митохондриях (Bijur et al. 2003). При этом функции GSK-3 β в ядрах отличаются от таковых в цитозоле. Недавно было показано, что GSK-3 β , входя в ядро, может образовывать комплекс с β -катенином, не фосфорилируя его, и таким образом подавлять β -катенин/TCF – зависимую

транскрипцию (Caspi et al. 2008). В данном исследовании лентивирусная трансдукция не повлияла на уровень общей GSK-3 β в ядерной фракции ни в случае подавления, ни в случае усиления СП Wnt. В то же время уровень фосфо- GSK-3 β в ядерной фракции был достоверно понижен на фоне оверэкспрессии Wnt3, что, как уже было упомянуто (раздел 3.5.4), свидетельствует о повышении активности киназы (Jope et al. 2007). Интересно, что в ядре активная GSK-3 β может фосфорилировать Циклин D1, способствуя его перераспределению из ядра в цитоплазму (Alt et al. 2000). Таким образом, наблюдаемое увеличение уровня Циклина D1 в цитозоле на фоне оверэкспрессии Wnt3 можно объяснить влиянием лентивирусной конструкции на уровень GSK-3 β в ядре, а не на регуляцию транскрипции целевых генов СП Wnt (раздел 4.4). В пользу этого предположения свидетельствует также факт отсутствия изменений обоих параметров одновременно на фоне подавления СП Wnt. Циклин D1 не является необходимым для индукции и поддержания ДП, хотя и может участвовать регуляции кратковременной пластичности (Li et al. 2007). Следовательно, повышение его уровня при оверэкспрессии Wnt3 не может быть решающим условием увеличения амплитуды ДП *in vivo*, однако может вносить свой вклад в облегчение ее индукции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые продемонстрировано, что лентивирусное подавление СП Wnt приводит к нарушению ДП *in vivo*, в то время как лентивирусная оверэкспрессия Wnt3 вызывает кратковременное увеличение амплитуды ДП *in vivo* через 14 дней после лентивирусной трансдукции (Ivanova et al., 2016). Оба эффекта затрагивают раннюю фазу ДП и практически не влияют на ее поддержание в отличие от эффектов фармакологического ингибирования и активации каскада Wnt (Chen et al. 2006; Vargas et al. 2014).

Показано, что подавление ДП *in vivo* сопровождается нарушением работы пресинаптического аппарата, а увеличению амплитуды ДП сопутствует повышение уровня экспрессии PSD-95. Эти факты дают основание предположить, что в основе действия лентивирусной конструкции, подавляющей СП Wnt, лежат пресинаптические механизмы, тогда как лентивирусная оверэкспрессия Wnt3 вызывает облегчение индукции ДП *in vivo* с помощью постсинаптических перестроек.

Эффекты лентивирусной трансдукции также касались изменения экспрессии компонентов СП Wnt в области CA1 гиппокампа, но практически не затрагивали экспрессию его целевых генов. Уровень β -катенина был понижен под действием лентивирусной конструкции, подавляющей СП Wnt, и повышен под действием лентивирусной конструкции, оверэкспрессирующей Wnt3. Уровень фосфо-GSK-3 β был понижен независимо от направления лентивирусной трансдукции, что указывает на неоднозначность функций GSK-3 β в реализации синаптической пластичности. Для наглядного обобщения приведенного выше обсуждения результатов на рис. 12 представлена предполагаемая схема механизмов влияния лентивирусных конструкций на ДП *in vivo*.

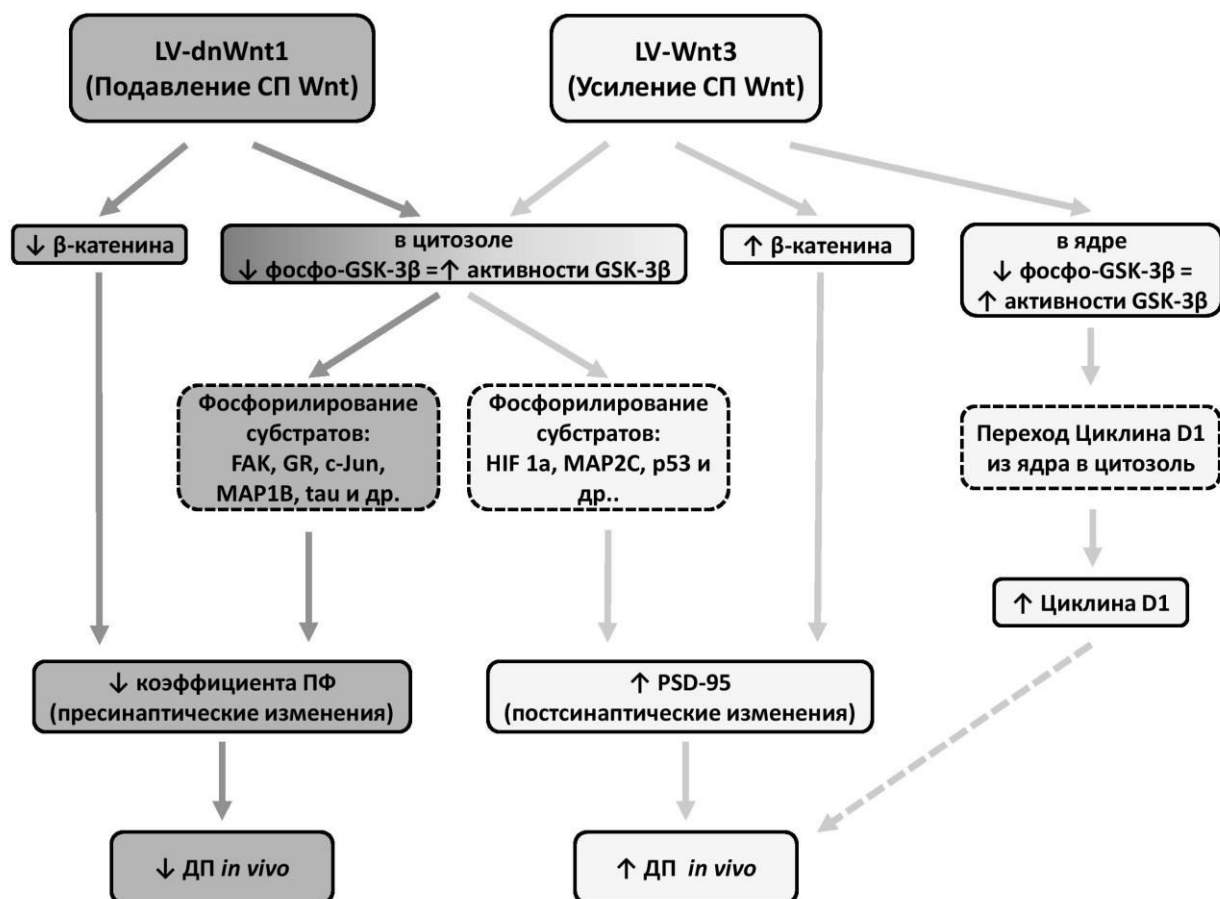


Рисунок 12. Предполагаемая схема механизмов влияния лентивирусных конструкций на ДП *in vivo*

Данное исследование позволило на новом уровне оценить роль и механизмы участия сигнального пути Wnt в регуляции синаптической пластичности на модели ДП *in vivo*. Исследование *in vivo* эффектов воздействия сигнального пути Wnt на синаптическую пластичность чрезвычайно важно и с точки зрения практического применения. Так как белки семейства Wnt и компоненты каскада являются предполагаемыми мишенями для лечения нейродегенеративных и неврологических заболеваний, то подход, позволяющий локально хронически изменить их экспрессию в заданной структуре ЦНС, представляет несомненный интерес для клинических исследований.

ВЫВОДЫ

1. С помощью метода лентивирусной трансдукции локально в области CA1 гиппокампа крыс достигнуто хроническое подавление канонического сигнального пути Wnt и хроническое усиление канонического сигнального пути Wnt, сопровождающееся значительной оверэкспрессией белка Wnt3.
2. Хроническое подавление канонического сигнального пути Wnt приводит к ослаблению долговременной потенциации *in vivo* в области CA1 гиппокампа при стимуляции коллатералей Шаффера, а его хроническое усиление - к облегчению ее индукции.

3. Угнетение синаптической пластичности, вызванное подавлением сигнального пути Wnt, сопровождается нарушением работы пресинаптического аппарата, в то время как оверэкспрессии Wnt3 приводит к постсинаптическим перестройкам.
4. Подавление канонического сигнального пути Wnt с помощью лентивирусной трансдукции снижает уровень экспрессии β -катенина в цитоплазме и фосфорилированного β -катенина в ядре, но не влияет на экспрессию целевых белков каскада.
5. Оверэкспрессия белка Wnt3, достигнутая с помощью лентивирусной трансдукции, приводит к повышению уровней экспрессии β -катенина и Циклина D1 в цитоплазме и фосфорилированной киназы гликоген синтазы 3 β в ядре.
6. Как усиление, так и подавление канонического сигнального пути Wnt снижают уровень киназы гликоген синтазы 3 β , фосфорилированной по 9 серину.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи

1. Гурская О. Я., Добрякова Ю. В., Маркевич В. А. Роль сигнального пути Wnt в регуляции работы мозга. Журнал высшей нервной деятельности. 2015, том 65, № 4, с. 387–399.
2. Ivanova O.Y., Dobryakova Y.V., Salozhin S.V., Aniol V.A., Onufriev M.V., Gulyaeva N.V., Markevich V.A. Lentiviral modulation of Wnt/ β -catenin signaling affects in vivo LTP. Cellular and molecular neurobiology. 2016. doi: 10.1007/s10571-016-0455-z

Тезисы докладов

1. Гурская О.Я., Добрякова Ю.В., Саложин С.В. Участие сигнального пути Wnt в пластичности гиппокампа. XVI научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Москва, Россия, 23-24 октября, 2012. Сборник тезисов, стр. 28.
2. Гурская О.Я., Добрякова Ю.В. Участие сигнального пути Wnt в пластичности гиппокампа. XVII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Москва, Россия, 21-23 октября, 2013. Сборник тезисов, стр. 13.
3. Gurskaya O., Dobryakova Y., Salozhin S., Markevich V. Wnt signaling involvement in synaptic plasticity of hippocampus. FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic, September 11-14, 2013. Abstract № PIII-B-012.
4. Gurskaya O.Y., Dobryakova Y.V., Onufriev M.V., Salozhin S.V., Gulyaeva N.V., Markevich V.A. Wnt signaling activation improves synaptic plasticity in hippocampus. FENS Featured Regional Meeting, Thessaloniki, Greece, October 7-10, 2015. Abstract №MO2.
5. Gurskaya O.Y., Dobryakova Y.V., Salozhin S.V., Gulyaeva N.V., Markevich V.A. Wnt signaling affects long-term potentiation in hippocampus. 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9, 2014. Abstract №FENS-0524.