

*На правах рукописи*

**Баль Наталья Вячеславовна**

**РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ И  
ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ В НЕЙРОНАХ**

Специальность 03.03.01 – «Физиология»

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Москва 2017**

Работа выполнена в лаборатории клеточной нейробиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор,  
чл.-корр. РАН

**Балабан Павел Милославович**

**Официальные оппоненты:**

кандидат биологических наук  
с.н.с. лаб. биохимии процессов онтогенеза  
ФГБУН ИБР им. Н.К. Кольцова РАН

**Люпина Юлия Вячеславовна**

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

**Кичигина Валентина Федоровна**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

Защита состоится 24 мая 2017 года в 15.30 часов на заседании  
Диссертационного совета Д 002.044.01 при Институте Высшей Нервной  
Деятельности и Нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул.  
Бутлерова 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Высшей  
Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН.

Автореферат разослан \_\_\_\_ 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, \_\_\_\_\_



д.б.н. Иерусалимский В.Н.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Исследование обучения и памяти на разных уровнях организации, несмотря на длительную историю, остается одним из центральных разделов как нейробиологии, так и фундаментальной науки вообще. Бурное развитие молекулярно-биологических и генетических методов, конфокальной и мультифотонной микроскопии привело к лавинообразному накоплению новых данных, которые постепенно встраиваются в существующую картину знаний о мозге.

Несмотря на значительные успехи в исследовании механизмов обучения и памяти, по-прежнему остаются загадки, которые еще ждут своего понимания. Одной из таких головоломок является маленькая газообразная молекула – оксид азота, которая синтезируется в нашем организме, в том числе в мозге, и выполняет множество функций (Calabrese и др., 2009). Существуют экспериментальные свидетельства об участии оксида азота в консолидации, реконсолидации памяти, в процессах обучения.

Хотя в настоящее время существует множество данных о сигнальных мишенях оксида азота, полной ясности по-прежнему нет. Основной проблемой является то, что в разных экспериментах при исследовании сходных процессов (например, обучение, долговременная потенция) часто наблюдаются противоречивые результаты при блокаде синтеза оксида азота, и эти данные в совокупности сложно интерпретировать.

Множество исследований показывает, что оксид азота участвует в регуляции синтеза белка во время обучения (Lu, Kandel, Hawkins, 1999; Ota и др., 2008; Overeem и др., 2010). В нашей лаборатории ранее получены данные о том, что блокада синтеза оксида азота предотвращает нарушение памяти, вызванное ингибированием синтеза белка во время напоминания (Korshunova TA, Valaban PM, 2014; Балабан, Рощин, Коршунова, 2011). Если бы в данном случае оксид азота участвовал в активации синтеза белка, то эффект был бы однонаправленным с блокатором синтеза белка. Но в данных экспериментах оксид азота и синтез белка действовали, судя по всему, противоположным образом. Такие результаты навели на мысль, что оксид азота участвует также в процессе, который выполняет противоположную синтезу белка функцию.

В работе группы Э. Кэндела и др. на аплизии показано, что ингибирование деградации белков в протеасомах предотвращает амнестический эффект ингибитора синтеза белка после напоминания (Lee и др., 2012). То есть ингибирование деградации белков оказало тот же эффект, что и блокада синтеза оксида азота. Это сходство показалось очень интригующим и требующим исследования, так как, возможно, между синтезом оксида азота и

деградацией белков в протеасомах существует взаимосвязь. Если оксид азота действительно участвует в регуляции как синтеза, так и деградации белков, то может быть более ясной картина имеющихся экспериментальных противоречий.

Исследование взаимосвязи между оксидом азота и распадом белков в протеасомах важно также для более глубокого понимания патологических процессов в мозге, так как и оксид азота, и распад белков в протеасомах вовлечены в развитие таких заболеваний, как инсульт (Terpolilli, Moskowitz, Plesnila, 2012; Wojcik, Napoli Di, 2004), болезнь Альцгеймера (Guix и др., 2005; Yi и др., 2009), болезнь Паркинсона (Бунеева, Медведев, 2006).

### **Цель работы и основные задачи исследования**

Основной целью настоящей работы было исследование роли оксида азота в синаптической пластичности и распаде белков в нейронах.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать взаимосвязь между синтезом оксида азота и убиквитин-зависимой деградацией белков в нейронах с помощью генетически-кодированного флуоресцентного сенсора Ub<sup>G76V</sup>-GFP.

2. Исследовать влияние ингибитора синтеза оксида азота L-NAME на долговременную потенциацию в срезах гиппокампа крыс и его совместного действия с блокатором синтеза белка анизомицином.

3. Исследовать действие блокады синтеза оксида азота и синтеза белка на реконсолидацию памяти у крыс в модели условно-рефлекторного замирания.

### **Научная новизна**

В наших экспериментах впервые показано, что блокада NO-синтазы с помощью L-NAME (200мкМ) снижает скорость падения флуоресценции генетически-кодированного флуоресцентного сенсора Ub<sup>G76V</sup>-GFP в отростках нейронов, то есть ингибирует распад белков в протеасомах. Это, в свою очередь, также указывает на то, что оксид азота вовлечен в регуляцию убиквитин-зависимого распада белков в нейронах.

В настоящей работе впервые показано, что одновременная блокада NO-синтазы и синтеза белка не изменяет долговременную потенциацию в срезах гиппокампа, в то время как блокада только синтеза оксида азота нарушает позднюю фазу долговременной потенциации.

В экспериментах с реконсолидацией в модели условно-рефлекторного замирания на звук у крыс впервые обнаружено, что блокада NO-синтазы предотвращает амнестический эффект блокады синтеза белка с помощью циклогексимида. Сходный эффект ранее был показан только на беспозвоночных, в настоящей работе впервые продемонстрировано такое же действие оксида азота на млекопитающих.

## **Теоретическая ценность и практическая значимость.**

В настоящей работе получены новые данные о роли оксида азота в работе нервной системы. Полученные данные могут помочь объяснить некоторый разброс в полученных ранее данных о роли оксида азота в синаптической пластичности и памяти (Padamsey, Emptage, 2013), поскольку показывают, что оксид азота может участвовать не только в регуляции синтеза белка, но и регуляции деградации белков. То есть оксид азот может одновременно участвовать в разнонаправленных процессах, и разница в балансе между этими процессами может объяснять разброс в результатах экспериментов у разных авторов. Таким образом, данные, полученные в настоящей работе, вносят существенный вклад в теоретическое понимание участия оксида азота в физиологических процессах в нейронах.

В разделе «Обсуждение» настоящей работы приводится предполагаемая схема молекулярных процессов, происходящих во время реактивации памяти, с учетом новых экспериментальных данных об участии оксида азота в реконсолидации памяти, что может улучшить теоретическое понимание дестабилизации памяти при напоминании.

Практическая значимость данной работы связана с вовлеченностью оксида азота не только в физиологические процессы, но и с его участием в патологических механизмах (Guix и др., 2005; Terpolilli, Moskowitz, Plesnila, 2012). Нарушение работы NO-синтазы в мозге вовлечено в развитие таких состояний, как болезнь Альцгеймера, инсульт, болезнь Паркинсона и др. Однако неполное понимание молекулярных механизмов, в том числе с участием оксида азота, предотвращает создание эффективных лекарств против этих и других заболеваний. Полученные данные могут способствовать большему пониманию механизмов участия оксида азота в физиологических процессах в норме и при патологиях.

### **Положения, выносимые на защиту:**

- 1) Оксид азота является необходимым звеном регуляции убиквитин-зависимой деградации белков в нейронах, которая является необходимым звеном долговременной пластичности.
- 2) Оксид азота является агентом, запускающим процесс дестабилизации памяти во время напоминания у крыс.

### **Апробация работы**

Основные результаты работы были доложены на 9-м Форуме европейских обществ нейробиологии (Милан, 2014), Зимней конференции по нейробиологии (Зольден, Австрия, 2014), Конференциях молодых ученых ИВНД и НФ РАН (2013-2016гг.), международной конференции «Простые нервные системы» (Звенигород, 2016).

## **Личное участие автора**

Автором проводилось: культивирование нейронов гиппокампа и трансдукция вирусом, проведение экспериментов с культивируемыми нейронами, электрофорез и вестерн-блоттинг, иммуноцитохимическое окрашивание культуры нейронов, сбор мРНК для секвенирования, электрофизиологическая запись возбуждающих постсинаптических потенциалов в срезах гиппокампа, поведенческие эксперименты (в составе группы), статистический анализ экспериментов, подготовка публикаций по теме диссертации (в составе группы).

## **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 111 страницах, включает 2 таблицы и 15 рисунков. Работа состоит из введения, трех глав литературного обзора, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 205 источников, в том числе 11 отечественных и 194 зарубежных.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Эксперименты с культурой нейронов**

**Получение культуры.** Смешанная нейроглиальная культура получена из гиппокампа новорожденных крысят с помощью вырезания из мозга в холодном растворе ДМЕМ и последующего деления на клетки с помощью трипсина. Полученные клетки культивировались на стеклах в нейробазальной среде (Invitrogen) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

Вирус, содержащий под нейрональным CaMKII-промотором зеленый флуоресцентный белок, сшитый с убиквитином, получен С.В. Саложиним в лаборатории молекулярной нейробиологии ИВНД и НФ РАН. Плаزمид, содержащая Ub<sup>G76V</sup>-GFP, получена из Addgene (Nico Dantuma, Addgene plasmid # 11941). На 13-14 день культивирования аликвоту вируса добавляли в лунки с клетками, предварительно разбавив ее нейробазальной средой.

**Конфокальная микроскопия.** На 17-18 день культивирования стекло с нейронами помещалось в камеру конфокального микроскопа. Ингибитор синтеза белка анизомицин (50μM) добавлен за 1 час до начала эксперимента для исключения влияния синтеза нового белка и исследования только распада белка. Блокатор синтеза оксида азота L-NAME (200μM) добавлен одновременно с анизомицином в экспериментальной группе. Антагонист ГАМКА-рецепторов пикротоксин (30 μM) добавлен ко всем культурам на 10 минут для активации нейронов и отмыт за 15 минут до начала записи.

Для записи флуоресцентных изображений использовался конфокальный микроскоп LSM5 Live (Zeiss). Апохроматическая линза Plan-Apochromat 639/1.0 W VIS-IR, зеленый лазер с длиной волны 488 нм и эмиссионный фильтр, пропускающий длины волн выше 505 нм, были использованы для получения флуоресцентного сигнала. Конфокальные изображения (512x512 точек, 20 слоев с шагом 0,5  $\mu\text{m}$ ) фотографировались каждые 5 минут в течение 40 минут. В ходе анализа полученных изображений производилось измерение флуоресценции в отростках нейронов. Данные были распределены нормально, поэтому анализ проведен с помощью непарного критерия Стьюдента.

### **Иммуноцитохимия**

Культуры нейронов гиппокампа, выращенные на стекле в 24-луночном планшете, были зафиксированы в 4% параформальдегиде на основе PBS в течение 15 мин. После отмывки с помощью PBS с 0,1% Tween 20 и инкубирования в блокирующем растворе (PBS; 0,1% Tween 20; 5% сыворотка козы) клетки последовательно окрашивали антителами на nNOS (антитела кролика против nNOS, ThermoFisher, кат.номер 61-7000) в концентрации 1:1000 и вторичными антителами против IgG кролика, конъюгированные с Alexa 488 (ThermoFisher A-11008) в концентрации 1:1000. После отмывки антител к культуре добавлены первичные мышинные антитела против нейронального белка микротрубочек MAP2 (клон AP18, ThermoFisher, кат. номер MA5-12826) в концентрации 1:200 на 1 час, затем после отмывки добавлены вторичные антитела против мыши, конъюгированные с Alexa 546 (ThermoFisher, кат.номер A11003), в концентрации 1:1000. Регистрация флуоресценции производилась на конфокальном микроскопе LSM5 Live (Zeiss) в режиме съемки по оси Z, а также на эпифлуоресцентном микроскопе Keyence BZ9000 BioRevo. Обработка изображений производилась с помощью программы ImageJ.

### **Электрофорез и вестерн-блоттинг**

Культура нейронов гиппокампа была выращена в лунке 6-луночного планшета. На 15 день культивирования клетки были собраны в холодном PBS и отцентрифугированы в течение 3 минут при 700g и 4°C, после чего осадок ресуспендирован в 25 мкл холодного PBS с последующим добавлением 5 мкл 6-кратного буфера Лэммли. После нагревания при 95°C в течение 15 мин проба была заморожена на -70°C.

Электрофорез проводился в 10% полиакриламидном геле толщиной 0,75 мм. Состав геля: 2,440 мл воды, 1.5 мл Tris-HCl (1.5 M, pH=8.8), 2 мл 30% акриламида, 60 мкл SDS 10%, 6 мкл TEMED, 60 мкл PSA (10%).

Электрофорез проводили в буфере, содержащем 1,525 г Трис, 7,3 г глицина, 500 мл воды, 1 г SDS. В лунки нанесли пробу культуры нейронов и маркер (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Invitrogen). Параметры

электрофореза: 100 мА, 60 В, 17 Вт до входа проб в разделяющий гель, после чего напряжение увеличено до 160В.

Перенос белков на ПДВФ-мембрану (Immun-Blot®Low Fluorescence PVDF Membrane) проводился в системе Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) с параметрами 1,3А, 25В в течение 7 минут.

Окраска антителами производилась с помощью системы SNAP i.d. 2.0 (Millipore). Забивка мембраны производилась раствором PBS, содержащим 0,5% сухого молока и 0,1% Tween 20. Концентрация первичных антител (антитела кролика против nNOS, ThermoFisher, кат. номер 61-7000) и вторичных антител (антитела козы против кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, Bio-Rad, кат.номер 1706515) 1:1000.

Проявка мембраны производилась с помощью ECL-системы (Bio-Rad, кат.номер 170-5060). Регистрация хемилюминесценции производилась с помощью системы ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad). Обработка изображений проводилась в программе Image Lab Software Version 5.2.1.

### **Полупроводниковое секвенирование и биоинформатический анализ данных**

Пробы с культуры нейронов были собраны с помощью ExtractRNA реагента (Евроген) и заморожены на -70°С для дальнейшей работы. Тотальную РНК выделяли согласно протоколу производителя.

Для приготовления библиотек кДНК из каждого образца брали 0,5 микрограмма очищенной тотальной РНК. Удаление рибосомальной РНК производилось с помощью набора NEBNext®rRNA Depletion Kit. Далее готовили библиотеки фрагментированной кДНК с помощью набора Ion Total RNA-Seq Kit v2 for Whole Transcriptome Libraries производства Ion Torrent (Life Technologies). Качество (концентрации и среднюю длину молекул ДНК) каждой библиотеки оценивали с помощью приборов NanoDrop 2000, Qubit®2.0 Fluorometer и Agilent 2100 Bioanalyzer. Библиотеки с разными баркодами объединяли в пулы по 4 штуки, далее проводили клональную амплификацию библиотек (методом эмульсионной ПЦР) и полупроводниковое секвенирование на чипе IonPI™Chipv2.

Анализ результатов проводился с помощью бесплатной платформы Galaxy (usegalaxy.org). Полученные риды от каждого образца с помощью программы Trim были обрезаны на основе контроля качества FastQC. Далее риды выравнивались на геном крысы (сборка m6) с помощью программы TopHat. Далее полученные данные обрабатывались в программе Cufflinks для определения FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments) каждого фрагмента. Далее в программе Cuffcompare производилось сравнение полученных данных с референсной аннотацией. Аннотация была



получена с сайта проекта USCS (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>) – Jul.2014 (RGSC6.0/rn6), она включает как матричные транскрипты, так и некоторые не матричные РНК. Полученные с помощью программы Cuffcompare данные загружались для анализа в программу Cuffdiff для сравнения данных из разных экспериментов. Названия генов соответствующих транскриптов взяты из базы данных NCBI, [ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Rattus\\_norvegicus/RNA/](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Rattus_norvegicus/RNA/).

### **Электрофизиологические эксперименты**

Самцы крыс линии Вистар возрастом 6-8 недель были декапитированы с помощью гильотины, после чего мозг был быстро помещен в ледяной раствор для порезки (концентрации в мМ: 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, и 10 D-глюкозы, pH поддерживается с помощью продувки газом 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>). Поперечные срезы гиппокампа толщиной 400 мкм были приготовлены с помощью вибратора (Leica VT1000S, Германия), после чего сразу перенесены в холодный рабочий раствор (состав такой же, за исключением замены CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> и D-глюкозы на концентрации 2,5; 1,3 и 25 мМ, соответственно). Срезы нагревались постепенно при комнатной температуре по крайней мере 1 час до переноса в камеру для электрофизиологической записи.

Во время эксперимента срезы перфузировали постоянным потоком жидкости со скоростью около 3 мл/мин с температурой 32-34°C. Фокальные возбуждающие постсинаптические потенциалы записывались от радиального слоя (str.radiatum) CA1 поля гиппокампа. В данном поле расположено большое количество контактов между коллатеральными Шаффера и дендритами пирамидных нейронов поля CA1. Тестовые синаптические ответы были вызваны с помощью стимуляции коллатералей Шаффера с частотой 0,033Гц подачей тока длительностью 100 мкс с помощью концентрического электрода. Интенсивность тестовой стимуляции была подобрана так, чтобы амплитуда ВПСП составляла 50% от максимальной и сохранялась постоянно, кроме эпизода пачечной тета-стимуляции.

Долговременная потенциация индуцировалась протоколом пачечной тета-стимуляции, которая состояла из 10 пачек с частотой 100 Гц (5 стимулов в пачке), разделенных межпачечным интервалом 200 мс (что соответствует тета-частоте 5Гц). Такие пачечные стимуляции подавались 8 раз с интервалом 30 секунд. Во время индукции ДВП интенсивность стимуляции была увеличена в 2 раза для увеличения вероятности возникновения потенциала действия в постсинаптической клетке, так как показано, что это необходимое условие для развития NO-зависимой потенциации (Phillips, Hardingham, Fox, 2008).

Электрофизиологические данные были собраны и отфильтрованы (0,3-500Гц) с помощью экстраклеточного усилителя DL 302P (NBlab, Россия). Данные были оцифрованы с частотой 5кГц с помощью аналого-цифрового преобразователя (Digidata 1322A, Molecular Devices) и записаны с помощью программы AxoScope (Molecular Devices, США).

Электрофизиологические данные анализировались с помощью программы pClamp. Усредненный возбуждающий постсинаптический потенциал (ВПСП) за 5 минут до индукции ДВП был принят за 100%. С помощью критерия Краскелла-Уоллиса был проведен статистический анализ средних значений 30-минутных интервалов после индукции ДВП. Непараметрический критерий Краскелла-Уоллиса был выбран после проверки на нормальное распределение, которое показало что данные распределены не нормально в интервалах с 1 по 30 и с 31 по 60 минуты ( $p < 0.05$ ; Shapiro–Wilk test). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### **Поведенческие эксперименты**

Объектом исследования были самцы крыс линии Вистар весом 210-370г. Ингибитор синтеза белка циклогексимид (Sigma-Aldrich) был растворен в день введения в физиологическом растворе (0,9% NaCl) с добавлением 1% ДМСО. Инъекция препарата осуществлялась подкожно в концентрации 2,8 мг/кг. Селективный ингибитор нейрональной синтазы оксида азота 3-бromo-7-нитроиндазол (3-Br 7-NI, Enzo Life Sciences) был растворен в день введения в 100% ДМСО и вводился внутривнутрибрюшинно в дозе 10мг/кг. Другой ингибитор нейрональной NO-синтазы ARL 17477 дигидрохлорид (ARL, Tocris) был инъецирован в дозе 5мг/кг. Все препараты вводились сразу после напоминания (Тест1) в объеме 0,1мл/100г веса животного, при этом сначала препараты вводили внутривнутрибрюшинно, а затем подкожно.

Обучение (Тест 0), напоминание (Тест 1) и тестирование (Тест 2 и 3) проводилось в разных контекстах, отличающихся по геометрии, запаху и освещению. В день обучения крысу помещали в контекст А и через две минуты предъявляли 2 звуковых условных стимула (5кГц, 75 дБ, 30 с) с интервалом 3 минуты. В конце каждого звукового сигнала следовал удар тока через решетку с силой 0,4мА и длительностью 2 секунды (Тест 0). После дополнительной минуты животное извлекали из обучающей камеры.

Через 24 часа после обучения крыс приучали к контексту В в течение 10 минут. На следующий день проводилась процедура напоминания путем предъявления одиночного звукового стимула длительностью 30 секунд после 2 минут нахождения в камере (Тест 1), после чего крысам вводили исследуемые вещества. На следующий день крыс приучали к контексту С в течение 5 минут. Через 24 часа в контексте С после 2-минутной тишины крысам предъявляли три

последовательных звуковых условных стимула длительностью 30 секунд с интервалами 60 и 20 секунд (Тест 2), после чего незамедлительно вводили исследуемые вещества. Еще через 2 дня крысам предъявили одиночный звуковой стимул в контексте D после двух минут тишины (Тест 3).

Животные были исключены из поведенческих экспериментов если: 1) процент замирания в контексте до предъявления звука был более 60% в Тестах 0 и 1, что свидетельствовало о высоком уровне общей тревожности; 2) процент замирания на звук в Тесте 1 был менее 20%, в данном случае крысу считали необученной.

Замирание определялось как остановка всех движений кроме дыхания, при этом считались эпизоды длительностью не менее 2 секунд. Уровень замирания был выражен в процентах (длительность замирания/общая длительность)\*100%.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ**

### **Экспрессии нейрональной NO-синтазы и других белков в культуре нейронов**

Секвенирование культуры нейронов продемонстрировало экспрессию мРНК многих нейрональных и других (??) белков, в том числе NO-синтазы. Обнаружено, что среди NO-синтаз в основном экспрессируется нейрональная NO-синтаза (Nos1) – значение FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped) равно 12,56 на основе секвенирования двух культур. Фрагменты мРНК эндотелиальной NO-синтазы (Nos3) представлены гораздо меньше, чем мРНК Nos1 (FPKM=0,2). Существуют данные, что эндотелиальная NO-синтаза экспрессируется в глиальных клетках (Lin, Taktakishvili, Talman, 2007). мРНК индуцибельной NO-синтазы (Nos2), которая экспрессируется в основном в клетках иммунной системы, в культуре нейронов не обнаружена (FPKM=0). Кроме того, обнаружена экспрессия мРНК других белков, участвующих в NO-зависимом сигнальном пути и убиквитин-зависимом распаде белков.

С помощью первичных антител против нейрональной NO-синтазы проведено исследование экспрессии этого белка методом вестерн-блоттинга (рис.1). Проба с лизатом культуры нейронов гиппокампа была нанесена на дорожку полиакриламидного геля, в соседнюю лунку нанесен маркер. Обнаружено окрашивание выше маркера на 140 кДа, что соответствует массе нейрональной NO-синтазы (160 кДа).

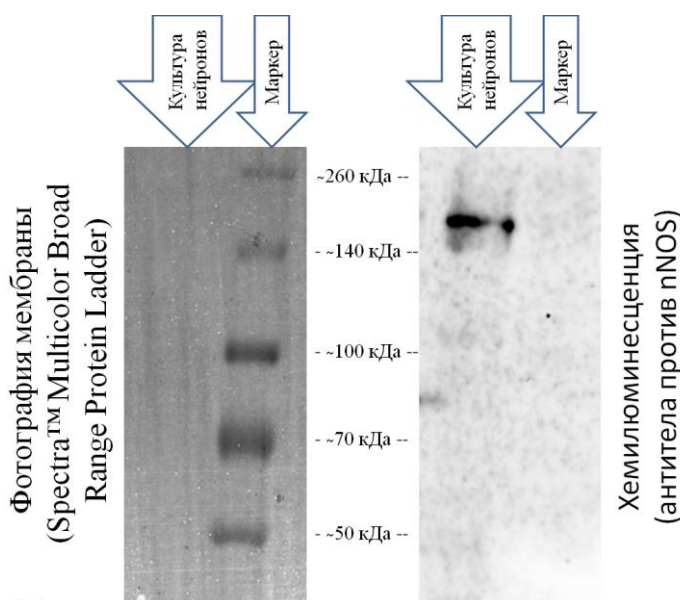


Рис.1. Иммунохимическое окрашивание мембраны после переноса с полиакриламидного геля. Показано окрашивание пробы с белками культуры нейронов гиппокампа первичными антителами кролика против pNOS и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, против кроличьих IgG. Проявление мембраны производилось с помощью ECL-системы.

Иммуноцитохимическое окрашивание культуры нейронов показало, что практически все клетки, экспрессирующие нейрональный белок микротрубочек MAP-2, демонстрируют также присутствие нейрональной NO-синтазы (рис.2). При этом наблюдается как диффузное распределение нейрональной NO-синтазы в теле и отростках нейронов, так и наличие кластеров в отростках. Таким образом, исходя из полученных данных, можно сделать вывод о высокой экспрессии нейрональной NO-синтазы в культуре нейронов.

### **Ингибирование NO-синтазы замедляет падение флуоресценции генетически-кодируемого сенсора убиквитин-зависимой деградации белков**

Деградация белков характеризуется точной пространственно-временной регуляцией. В настоящей работе мы сосредоточились на исследовании убиквитин-зависимой деградации белков в отростках нейронов во время активации нейронов, так как известно, что регуляция деградации белков в отростках и телах нейронов имеет отличия. При этом для синаптической пластичности, по крайней мере в первые часы, важную роль играют процессы, идущие в дендритах и аксонах, но не телах нейронов.

Для исследования деградации белков в отростках нейронов мы экспрессировали генетически-кодируемый репортер убиквитин-зависимого распада белков под специфическим нейрональным промотором. В данной конструкции зеленый флуоресцентный белок GFP конъюгирован с сигналом для деградации белков убиквитином.

Перекрывание изображений

Mouse MAP-2 + Anti-Mouse 546

Rat nNOS + Anti-Rat Alexa 488

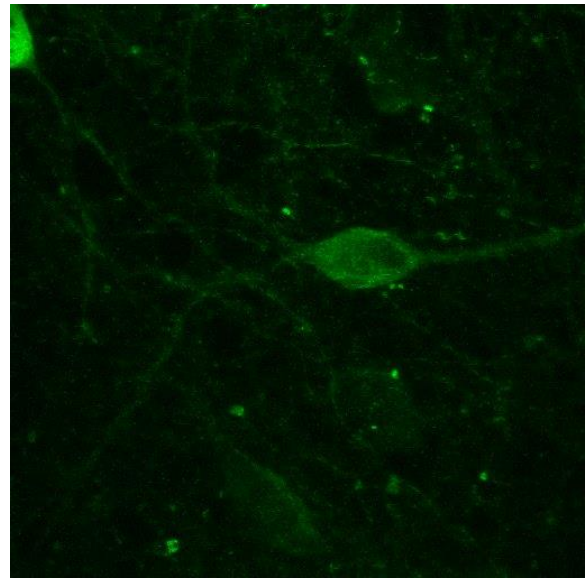
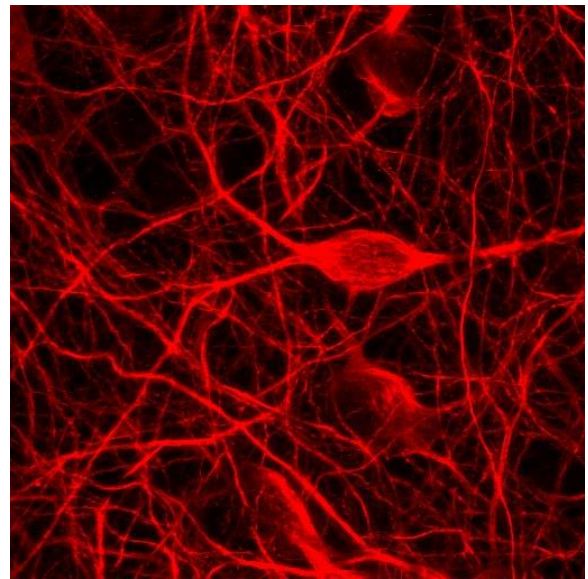
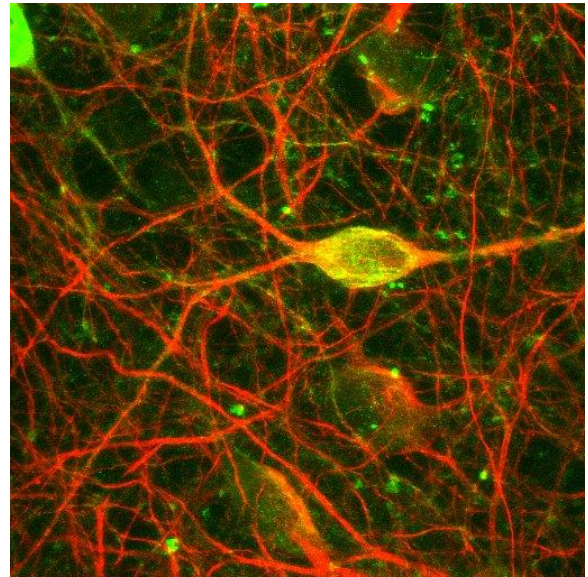
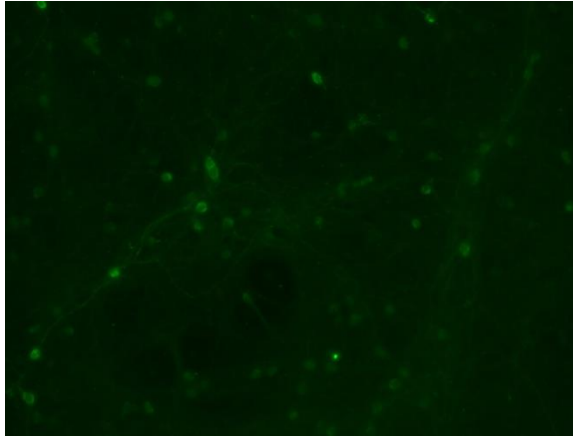
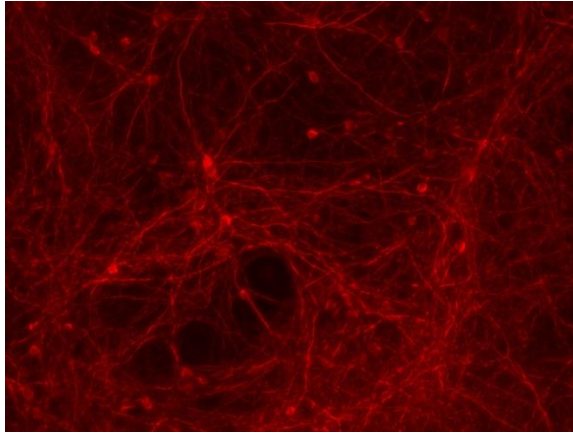
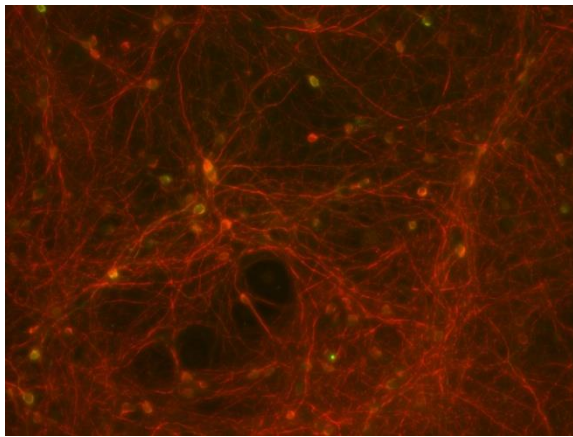


Рис.2. Иммуноцитохимическая окраска культуры нейронов гиппокампа.

В аминокислотной последовательности на границе между убиквитином и GFP присутствует мутация (замена глицина на валин), которая предотвращает отщепление убиквитина от GFP с помощью деубиквитиназ (Dantuma и др., 2000). Через несколько дней после трансдукции культуры нейронов лентивирусом, содержащим Ub<sup>G76V</sup>-GFP, в телах и отростках нейронов регистрировалась флуоресценция.

Ранее было показано, что активация нейронов с помощью антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов приводит к увеличению скорости падения флуоресценции фотоактивируемого Ub<sup>G76V</sup>-раGFP (Djakovic и др., 2009). Также было продемонстрировано, что падение флуоресценции Ub<sup>G76V</sup>-GFP и Ub<sup>G76V</sup>-раGFP зависит от активности протеасом (Dantuma и др., 2000; Djakovic и др., 2009; Djakovic и др., 2012). Для исследования активности протеасом в активированных нейронах ко всем культурам (в том числе в контрольной группе) на 10 минут до начала записи был добавлен антагонист ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пикротоксин (30 мкМ). Регистрация флуоресцентного сигнала производилась 1 раз в 5 минут в течение 40 минут (рис.3А).

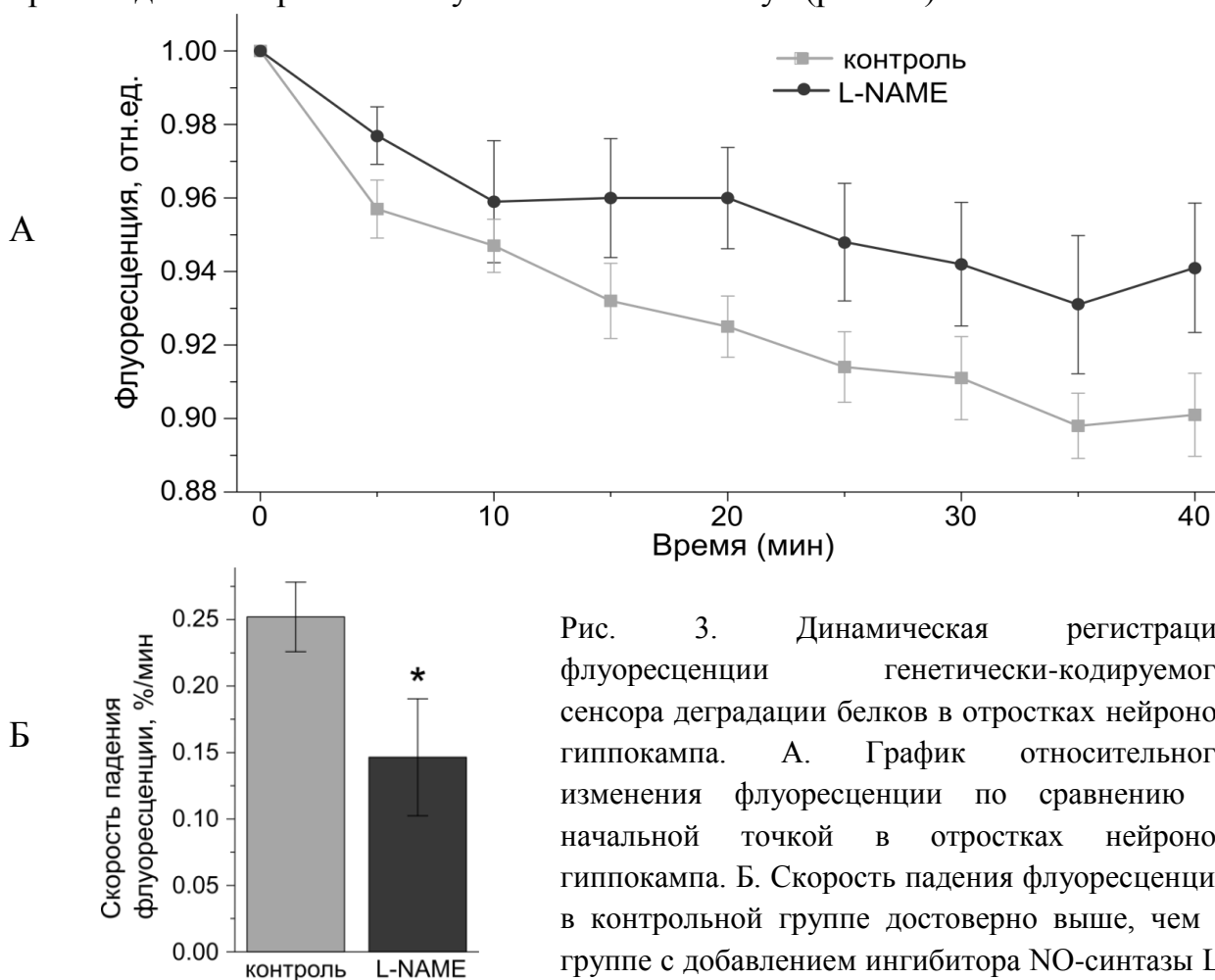


Рис. 3. Динамическая регистрация флуоресценции генетически-кодируемого сенсора деградации белков в отростках нейронов гиппокампа. А. График относительного изменения флуоресценции по сравнению с начальной точкой в отростках нейронов гиппокампа. Б. Скорость падения флуоресценции в контрольной группе достоверно выше, чем в группе с добавлением ингибитора NO-синтазы L-NAME ( $p < 0,05$ , t-test, контроль –  $n=6$ , L-NAME –  $n=4$ ).

В контрольной группе обнаружено, что в отростках нейронов наблюдается снижение флуоресценции по сравнению с начальной временной точкой (рис.3), что согласуется с данными литературы (Djaković и др., 2009). Добавление блокатора NO-синтазы L-NAME (200мкМ) приводило к достоверному снижению скорости падения флуоресценции (0.25%/мин в контрольных экспериментах против 0.14%/мин в группе L-NAME,  $p < 0.05$ , t-test) (рис.3Б). Ранее такой эффект был показан для блокаторов CaMKII, НМДА, АМПА-рецепторов, блокатора натриевых каналов (Bingol, Schuman, 2006; Djaković и др., 2009).

Таким образом, мы впервые показали, что блокада NO-синтазы с помощью L-NAME замедляет падение флуоресцентного репортерного сигнала деградации белков в активированных нейронах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что оксид азота участвует в регуляции распада белков в протеасомах.

**Блокада синтеза оксида азота нарушает долговременную потенциацию, в то время как одновременная блокада синтеза оксида азота и синтеза белка предотвращает это нарушение**

В ряде работ продемонстрировано, что блокада деградации белков в протеасомах нарушает позднюю фазу долговременной потенциации, в то время как одновременная блокада распада и синтеза белков предотвращает это нарушение (Dong и др., 2008; Fonseca и др., 2006). Поскольку в предыдущем эксперименте было показано, что оксид азота регулирует распад белков в протеасомах, мы решили проверить его участие в синаптической пластичности.

Для проверки участия оксида азота и синтеза белка в синаптической пластичности были проведены эксперименты с долговременной потенциацией (ДВП). Исследуемые вещества были добавлены в проток, омывающий срезы, за 40 минут до начала электрофизиологической записи, и оставались в нем до конца эксперимента. После 20 минутной записи базовой линии долговременная потенция была вызвана с помощью тета-стимуляции с удвоенной силой стимула.

Полученные результаты показали, что блокада NO-синтазы привела к постепенному снижению угла наклона ВПСП по сравнению с контролем, что привело к достоверному снижению этого показателя в 31-60 (146 ± 7% в группе L-NAME против 180 ± 11% в контрольной группе,  $p < 0,05$ , критерий Краскелла-Уоллиса) и 61-90-минутные интервалы (128 ± 8% против 160 ± 9%,  $p < 0,05$ , критерий Краскелла-Уоллиса, рис.4, 5).

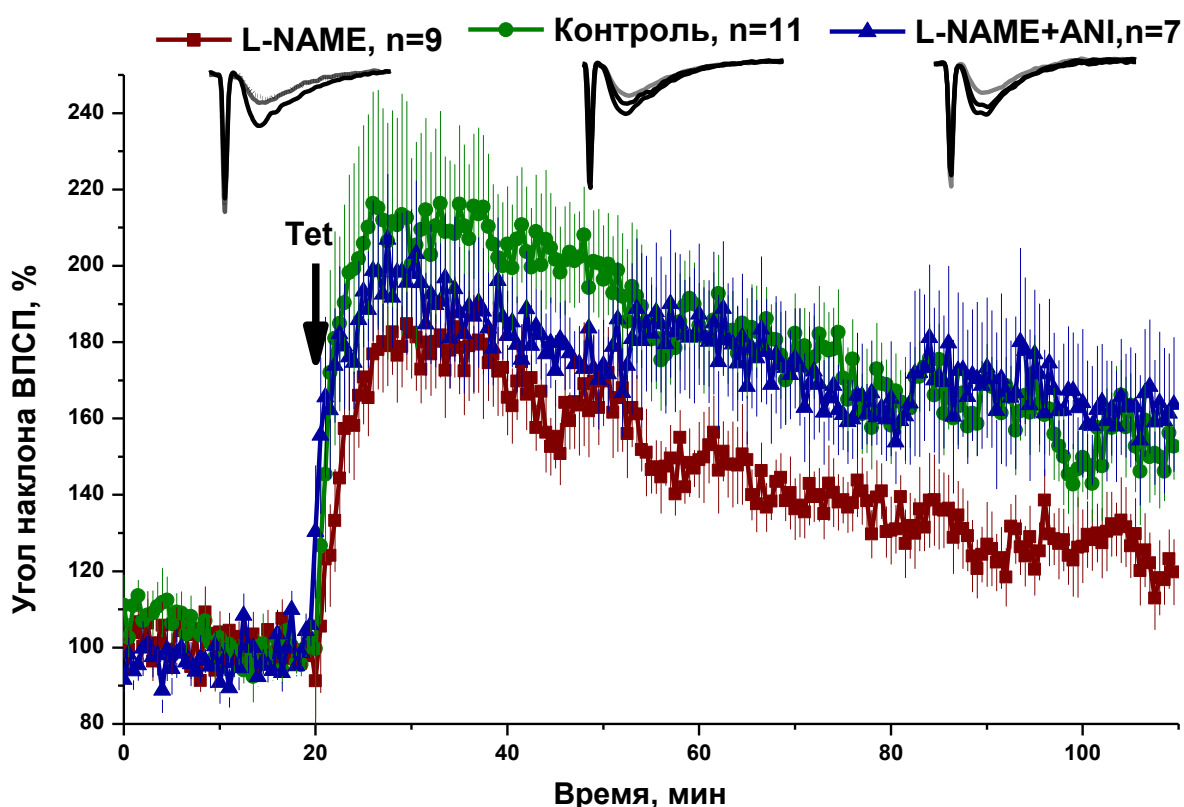


Рис.4. Долговременная потенция в срезах гиппокампа. На графике показан угол наклона ВПСП во временной развертке в контрольной группе (зеленые кружки), в группе с блокадой NO-синтазы с помощью L-NAME (красные квадраты) и одновременной блокадой синтеза оксида азота и синтеза белка (синие треугольники).

Результаты экспериментов совпадают с продемонстрированными ранее данными о роли синтеза оксида азота в синаптической пластичности (Musleh et al., 1993; Phillips et al., 2008; Johnstone and Raymond, 2011), хотя есть некоторые противоречия с другими (Williams и др., 1993).

Одновременное добавление ингибитора синтеза оксида азота и синтеза белка анизомидина (50мкМ) привело к сохранению угла наклона ВПСП в течение 1,5 часов после индукции ДВП по сравнению с контрольной группой: (1-30 мин:  $184 \pm 12$  % в группе L-NAME+анизомидин против  $201 \pm 12$  % в контрольной группе,  $p > 0.05$ ; 31-60 мин:  $175 \pm 14$  % против  $180 \pm 11$  %,  $p > 0.05$ ; 61-90 мин:  $166 \pm 16$  % против  $160 \pm 9$  %,  $p = 0 > 0.05$ , критерий Краскелла-Уоллиса, рис.4, 5). Таким образом, впервые обнаружено, что блокада синтеза оксида азота нарушает долговременную потенцию, в то время как одновременная блокада синтеза оксида азота и синтеза белка предотвращает это нарушение.

В полученных результатах наблюдается картина, сходная с экспериментами с блокаторами распада белков в протеасомах, полученными в других группах (Dong и др., 2008; Fonseca и др., 2006). Блокада синтеза NO-синтазы, как и блокада распада белков в протеасомах, в одиночку вызывает



падение угла наклона ВПСП, в то время как совместное действие с ингибитором синтеза белка приводит к сохранению поздней фазы долговременной потенциации. На основании этих и других данных можно предположить, что оксид азота, синтезируемый нейрональной NO-синтазой, вместе с синтезом и деградацией белков определяет некоторый белковый баланс, который определяет структурно-функциональную организацию синапсов.

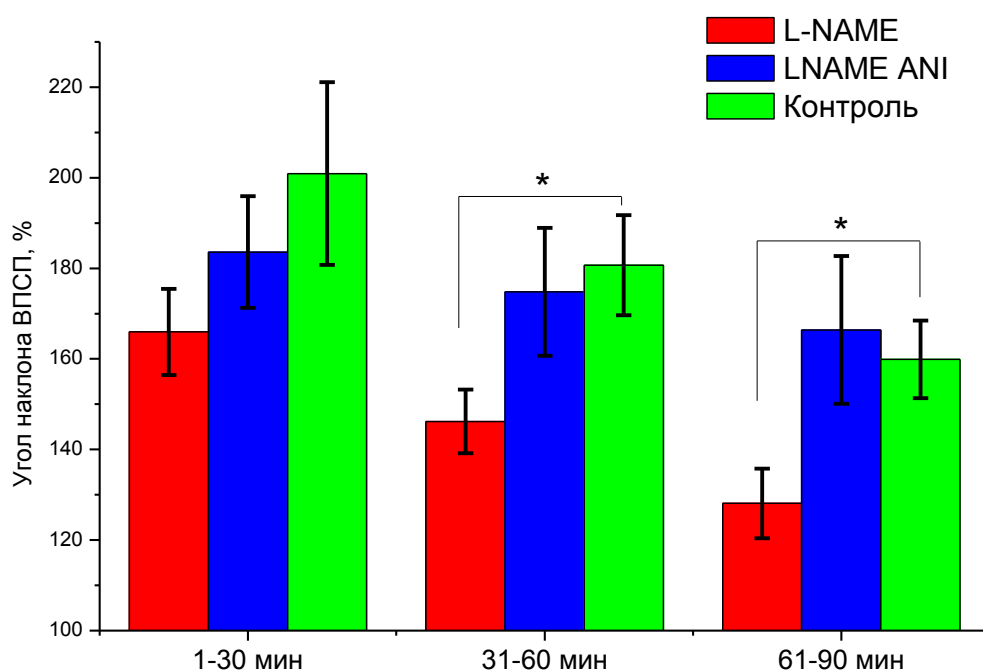


Рис.5. Анализ угла наклона ВПСП на разных временных промежутках после индукции ВПСП (1-30 мин, 31-60 и 61-90 мин). Зеленым цветом показан средний угол наклона ВПСП в контрольной группе, красным – в группе с L-NAME, синим – в группе с аннизомицином и L-NAME.

### **Ингибирование синтеза оксида азота предотвращает нарушение памяти, вызванное блокадой синтеза белка во время реактивации условно-рефлекторного страха**

Исследование роли оксида азота как сигнала для распада белков было продолжено в экспериментах с реконсолидацией памяти. Так, было показано, что ингибитор синтеза белка нарушает сохранение памяти во время напоминания (Nader, Schafe, Doux Le, 2000), в то время как совместное введение ингибиторов синтеза белка и блокаторов протеасом приводило к сохранению памяти (Lee и др., 2008) В экспериментах в нашей лаборатории сходный эффект блокады синтеза белка ранее был показан на виноградной улитке (Balaban и др., 2014; Балабан, Рошин, Коршунова, 2011). В настоящей серии экспериментов мы проверяли, может ли ингибитор синтеза оксида азота, как и ингибитор протеасом, препятствовать нарушению памяти во время

напоминания под действием блокады синтеза белка. Для экспериментов был выбран циклогексимид в качестве ингибитора синтеза белка на основе его доступности. Как и анизомицин, циклогексимид блокирует трансляцию на стадии элонгации. Для блокады нейрональной NO-синтазы вводили специфичные блокаторы 3-бromo-7-нитроиндазол (3-Br-7-NI) и ARL 17477 дигидрохлорид.

Крысы были обучены сочетанием звукового стимула длительностью 30 секунд с ударом тока в камере А в первый день эксперимента (Тест 0). На третий день производилось напоминание путем предъявления звука без подкрепления в камере В (Тест 1). Сразу после предъявления звука животным были введены активные вещества (ДМСО/физ.раствор, n=15; ДМСО/циклогексимид, n=23; 3-Br-7-NI /циклогексимид, n=13; 3-Br-7-NI /физ.р-р, n=12; ARL/циклогексимид, n=9). Ранее в экспериментах (Komsuoglu-Celikyurt и др., 2011) было показано, что введение ДМСО не оказывает значимого влияния на консолидацию памяти. Через два дня проводилось тестирование условно-рефлекторного замиранья в камере С (Тест 2), и еще одно тестирование проводилось через 3 дополнительных дня (Тест 3). На рисунке 6 представлен процент замиранья на первый звук.

Статистический анализ с помощью Repeated Measures ANOVA показал, что во время напоминания животные продемонстрировали сходный процент замиранья во всех группах (Drug:  $F(4.67)=0.31$ ,  $p>0.05$ ), при этом во всех группах было показано достоверное увеличение процента замиранья по сравнению с днем обучения (Session:  $F(1.67)=528.77$ ,  $p<0.001$ ). Таким образом, во всех группах наблюдалось обучение условно-рефлекторному замиранью.

Post-hoc анализ с помощью теста Бонферрони (сравнение с контрольной группой и Тестом 1) показал, что уровень замиранья в Тесте 2 в группе с введением циклогексимидом ниже по сравнению с контрольной группой ( $p=0,006$ ), что говорит о том, что был запущен процесс реконсолидации, требующий синтеза новых белков (Nader, Schafe, Doux Le, 2000). В то же время не обнаружено достоверных различий между контрольной и другими группами, кроме группы с введением циклогексимидом, в Тесте 2 ( $p>0,05$ ) (рис.6).

Полученные данные показывают, что одновременная блокада нейрональной NO-синтазы и синтеза белка после реактивации памяти предотвращает нарушение памяти, вызванной блокадой только синтеза белка. Важно отметить, что данная реакция имеет сходный эффект с разными блокаторами нейрональной NO-синтазы - 3-Br 7-NI и ARL 17477.

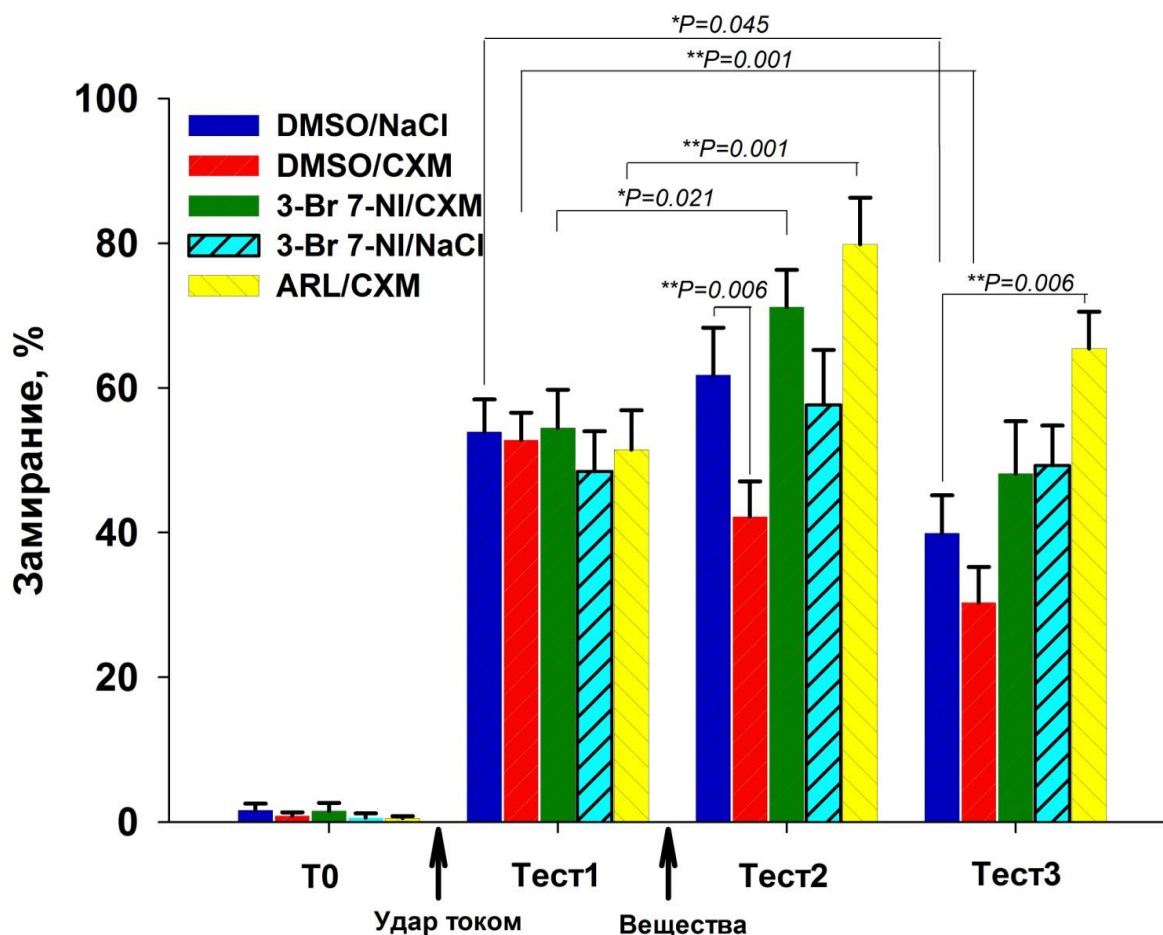


Рис. 6. Исследование замирания крыс на предъявление звукового стимула в разных группах. Синим цветом показано замирание крыс на звук в группе, которым проводилась инъекция контрольного раствора сразу после напоминания (Теста1), красным – инъекция блокатора синтеза белка циклогексимида, зеленым – 3-Br-7-NI и циклогексимида, голубым – 3-Br-7-NI, желтым – ARL и циклогексимида.

Внутригрупповое сравнение уровня замирания между Тестом 1 и Тестом 2 показало, что в группе ДМСО/циклогексимид (с блокадой синтеза белка) наблюдалась тенденция к снижению уровня замирания по сравнению с Тестом 1 ( $p=0,068$ ). Одновременная инъекция блокаторов синтеза белка и нейрональной NO-синтазы привела к увеличению условно-рефлекторной реакции по сравнению с Тестом 1 в группе ARL/циклогексимид, ( $p=0.001$ ), хотя в группе животных только с блокадой нейрональной NO-синтазы (3-Br 7-NI/ физ.р-р) различий между Тестом 1 и 2 не обнаружено ( $p>0.05$ ), что согласуется с результатами экспериментов (Chen и

др., 2016), хотя в этом исследовании авторы предположили, что оксид азота не участвует в реконсолидации, однако они не проводили экспериментов с одновременным введением блокаторов NO-синтазы и синтеза белка.

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что в условиях, когда новая память не может быть сформирована из-за блокады синтеза белка, старая память сохраняется после напоминания только при нарушении синтеза оксида азота.

Инъекция блокатора нейрональной NO-синтазы после напоминания не повлияла на память (по сравнению с контрольной группой,  $p > 0,05$ ), что, вместе с предыдущими данными, говорит о том, что блокада NO-синтазы способствует сохранению существующей памяти при ее реактивации с помощью напоминания. Можно предположить, что синтез оксида азота вовлечен в дестабилизацию памяти во время реконсолидации, и его блокада способствует ее сохранению.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование посвящено изучению роли оксида азота в различных нейрофизиологических процессах. Несмотря на то, что влияние оксида азота на функционирование нервной системы изучается в течение многих лет многими экспериментальными группами, мы обнаружили ряд новых механизмов и процессов, в которые вовлечен оксид азота.

В первую очередь, мы показали, что оксид азота вовлечен в регуляцию убиквитин-зависимого распада белков в отростках нейронов. Другими экспериментальными группами были получены противоречивые данные о том, как оксид азота влияет на деградацию белков (Chung и др., 2004; Kapadia и др., 2009; Lipton S.A. и др., 2005). В настоящей работе на культуре нейронов гиппокампа показано, что синтез оксида азота усиливает убиквитин-зависимый распад белков. Это открытие позволяет по-новому взглянуть на механизмы регуляции белкового состава в отростках нейронов, их морфофункционального строения.

NO-синтаза является ферментом, чья активность зависит от связывания кальмодулина с присоединенными к нему ионами кальция. Вход кальция в клетки во время возбуждения нейронов осуществляется, в первую очередь, через NMDA-рецепторы после снятия магниевого блока при деполяризации мембраны. Поскольку NO-синтаза часто заякорена к NMDA-рецепторам через PSD-95 (Alderton, Cooper, Knowles, 2001; Valtschanoff, Weinberg, 2001), то входящий кальций может локально активировать фермент после связывания с кальмодулином. Из-за такого локального расположения и локальной активации нейронов синтезируемый оксид азота может стимулировать убиквитин-

зависимый распад белков в определенное время и в определенном месте, в первую очередь, в области синапса. Такая локальная активация деградации белков может приводить к перестройкам синаптического комплекса.

Во-вторых, в настоящей работе проведены эксперименты с индукцией долговременной потенциации в CA1 поле гиппокампа. Блокада NO-синтазы приводит к достоверному снижению уровня потенциации в срезах гиппокампа на временных промежутках 31-60 и 61-90 минут после индукции. Однако одновременная блокада синтеза оксида азота и трансляции белка привела к тому, что угол наклона ВПСП оставался не отличимым от контрольных срезов до конца эксперимента (1,5 часа после индукции долговременной потенциации). Ранее такая стабилизация поздней фазы долговременной потенциации была показана в экспериментах с одновременной блокадой синтеза и деградации белков (Dong и др., 2008; Fonseca и др., 2006). Полученные данные также свидетельствуют о возможной взаимосвязи синтеза оксида азота и деградацией белков.

В последнее время феномен стабилизации и дестабилизации «памятных следов», к которым многие ученые относят синаптические изменения, рассматривается и в отношении поведенческих экспериментов с реконсолидацией памяти. Во время реактивации памяти при напоминании память становится чувствительной к действию ингибиторов синтеза белка (Finnie, Nader, 2012; Kim, Moki, Kida, 2011; Lee и др., 2008; Milton и др., 2013; Yu и др., 2016). Показано, что одновременная блокада синтеза белка и распада белков предотвращает нарушение памяти, вызванное инъекцией только блокатора синтеза белка во время напоминания (Jarome и др., 2011; Lee и др., 2008).

В настоящей работе были проведены эксперименты на крысах в модели условно-рефлекторного замирания на звук. Обнаружено, что два разных специфичных ингибитора нейрональной NO-синтазы предотвращают нарушение памяти, вызванное блокадой синтеза белка во время напоминания. Таким образом, оксид азота, синтезируемый нейрональной NO-синтазой, может являться агентом, вызывающим дестабилизацию памяти. Какой биохимический путь вовлечен в такую дестабилизацию памяти? Показано, что нарушение памяти можно предотвратить введением блокаторов GluN2B, но не GluN2A-субъединицы NMDA-рецепторов (Milton и др., 2013), ингибиторов CaMKII и протеасом (Jarome и др., 2011; Jarome и др., 2016; Lee и др., 2008). На основании литературных данных, полученных как другими группами, так и ранее в нашей лаборатории, а также результатов, полученных в настоящей работе, можно предположить следующую схему (рис. 7) биохимических

процессов, происходящих при реактивации памяти и ведущих к ее дестабилизации.



Рис.7. Предполагаемая схема молекулярных событий, вызывающих дестабилизацию памяти во время реактивации.

## ВЫВОДЫ

1. В культуре нейронов гиппокампа методами глубокого секвенирования, иммуноцитохимии, и вестерн-блоттинга продемонстрирована экспрессия нейрональной NO-синтазы.
2. В культуре нейронов гиппокампа блокада NO-синтазы снижает скорость падения флуоресценции генетически-кодируемого сенсора убиквитин-зависимой деградации белков в отростках нейронов.
3. В переживающих срезах гиппокампа крыс блокада синтеза оксида азота нарушает долговременную потенциацию, в то время как одновременная блокада синтеза оксида азота и синтеза белка приводит к сохранению потенциации.
4. В экспериментах с поведением на крысах продемонстрировано, что блокада нейрональной NO-синтазы предотвращает нарушение памяти,

вызванное блокадой синтеза белка во время реактивации условно-рефлекторного страха.

## ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА

### Статьи по теме диссертации

1. Баль Н.В., Балабан П.М. Убиквитин-зависимый распад белков необходим для долговременной пластичности и памяти // *Нейрохимия*. - 2015. - Т.32. - №4.2015 С. 275.
2. Bal N., Roshchin M., Salozhin S., Balaban P. Nitric Oxide Upregulates Proteasomal Protein Degradation in Neurons // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2016. doi: 10.1007/s10571-016-0413-9.
3. Bal N.V., Rysakova M.P., Vinarskaya A.Kh., Ivanova V., Zuzina A.B., Balaban P.M. Cued memory reconsolidation in rats requires nitric oxide // *European Journal of Neuroscience*. - 2017. doi: 10.1111/ejn.13503.

### Статьи

1. Bal N.V., Susorov D., Chesnokova E., Kasianov A., Mikhailova T., Alkalaeva E., Balaban P.M., Kolosov P. Upstream Open Reading Frames Located in the Leader of Protein Kinase M $\zeta$  mRNA Regulate Its Translation // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2016. - V.9. doi:10.3389/fnmol.2016.00103
2. Bal N., Malyshev A., Smirnov I., Balaban P. Expression of Channelrhodopsin-2 Using in Suspension Electroporation for Studying the Monosynaptic Transmission in Neuronal Culture // *BioNanoScience*. - 2016. – V.6. – P. 329. doi:10.1007/s12668-016-0228-7
3. Nikitin E.S., **Bal N.V.**, Malyshev A., Ierusalimsky V.N., Spivak Yu., Balaban P.M., Volgushev M. Encoding of High Frequencies Improves with Maturation of Action Potential Generation in Cultured Neocortical Neurons // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2017. - V.11. doi: 10.3389/fncel.2017.00028

### Тезисы конференций

1. Баль Н.В., Лемак М.С. Исследование роли NO в синаптической пластичности// XVII Школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. – Москва. - 21 октября 2013.
2. Bal N.V., Lemak M.S., Balaban P.M. Nitric oxide triggers protein degradation during synaptic plasticity // 9th FENS Forum of Neuroscience. – Милан. -2014.
3. Баль Н.В., Саложин С.В., Роцин М.В., Лемак М.С. Изучение роли NO в деградации белков в нейронах// XVIII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. – Москва. - 29 октября 2014 года.

4. Баль Н.В., Винарская А.Х., Рысакова М.П., Иванова В.О., Зюзина А.Б. Роль оксида азота и синтеза белка в синаптической пластичности// XIX школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. – Москва. - 27-28 октября 2015 года.
5. Bal NV, Lemak MS, Balaban PM. Nitric oxide synthase inhibitor impairs LTP while simultaneous blockade of NOS and protein synthesis rescues it //18th International Neuroscience Winter Conference. – Sölden, Austria. - April 2nd - 6th. – 2016.
6. Bal NV, Roshchin MV, Salozhin S, Balaban PM. Nitric oxide triggers protein degradation in neurons// XI East European Conference Of The International Society For Invertebrate Neurobiology. - 15-19 мая 2016, Москва-Звенигород.
7. Баль Н.В., Винарская А.Х., Рысакова М.П., Иванова В.О., Зюзина А.Б. Роль оксида азота в реконсолидации памяти XX Школы-Конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. – Москва. - 31 октября 2016 года.