

На правах рукописи

Баль Наталья Вячеславовна

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

Специальность 03.03.01 – «Физиология»

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОКСИД АЗОТА И УБИКВИТИН-ЗАВИСИМАЯ ДЕГРАДАЦИЯ БЕЛКОВ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ.....	9
1.1. Оксид азота.....	9
1.1.1. Общие данные о синтезе оксида азота с помощью фермента NO-синтазы.....	9
1.1.2. Локализация нейрональной NO-синтазы в центральной нервной системе	12
1.2. Убиквитин-зависимая деградация белков	12
1.2.1. Общие данные о строении системы убиквитин-зависимой деградации белков	13
1.2.2. Механизмы регуляции убиквитин-зависимой деградации белков.	15
1.2.3. Участие оксида азота в регуляции убиквитин-зависимой деградации белков	21
2. УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА И УБИКВИТИН-ЗАВИСИМОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ.....	22
2.1. Роль оксида азота в синаптической пластичности.....	22
2.2. Роль убиквитин-зависимой деградации белков в синаптической пластичности	29
3. РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И УБИКВИТИН-ЗАВИСИМОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ В ОБУЧЕНИИ И ПАМЯТИ	34
3.1. Роль оксида азота в обучении и памяти.	34
3.2. Роль убиквитин-зависимого распада белков в обучении и памяти	40
3.3. Сравнение данных о роли оксида азота и распада белков в протеасомах в дестабилизации памяти во время напоминания.	42
4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44

4.1. Эксперименты с культурой нейронов	44
4.1.1. Протокол получения культуры нейронов и трансдукция вирусом.....	44
4.1.2. Продукция вирусов	45
4.1.3. Проведение экспериментов с конфокальным микроскопом	46
4.1.4. Иммуноцитохимия	47
4.1.5. Полупроводниковое секвенирование и биоинформатический анализ данных	49
4.2. Электрофизиологические эксперименты	50
4.3. Поведенческие эксперименты	52
5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
5.1. Экспрессии нейрональной NO-синтазы и других белков в культуре нейронов.....	56
5.2. Ингибирование NO-синтазы замедляет падение флуоресценции генетически-кодированного сенсора убиквитин-зависимой деградации белков ...	63
5.3. Блокада синтеза оксида азота нарушает долговременную потенциацию, в то время как одновременная блокада оксида азота и синтеза белка предотвращает это нарушение.....	67
5.4. Ингибирование синтеза NO предотвращает нарушение памяти, вызванное блокадой синтеза белка во время реактивации условно-рефлекторного страха.	74
6. ОБСУЖДЕНИЕ	82
7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ	91
БЛАГОДАРНОСТИ	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	93

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Исследование обучения и памяти на самых разных уровнях организации, несмотря на длительную историю, остается одним из центральных разделов как нейробиологии, так и фундаментальной науки вообще. Бурное развитие разных областей науки, в первую очередь развитие молекулярно-биологических и генетических методов, а также сложных инструментальных методов, таких как конфокальная и мультифотонная микроскопия, функциональная магнитно-резонансная томография и других, привели к лавинообразному накоплению новых данных, которые постепенно встраиваются в существующую картину знаний о мозге.

Несмотря на значительные успехи в исследовании механизмов обучения и памяти, на протяжении десятилетий остаются некоторые загадки, которые еще ждут своего раскрытия. 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, Balaban PM, 2014; Балабан, Рошин, 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 Эрика 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 в нейронах. 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 UbG76V-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 UbG76V-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 (Balaban и др., 2014), 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 механизмов 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

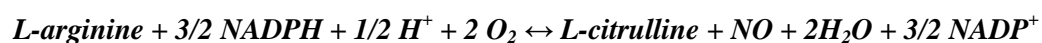
Основные результаты работы были доложены на 9-м Форуме европейских обществ нейробиологии (Милан, 2014), Зимней конференции по нейробиологии (Зольден, Австрия, 2014), Конференциях молодых ученых ИВНД и НФ РАН (2013-2016гг.), международной конференции «Простые нервные системы» (Звенигород, 2016).

1. ОКСИД АЗОТА И УБИКВИТИН-ЗАВИСИМАЯ ДЕГРАДАЦИЯ БЕЛКОВ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ.

1.1. Оксид азота

1.1.1. Общие данные о синтезе оксида азота с помощью фермента NO-синтазы

Оксид азота – это газовый нейротрансмиттер в нервной системе. Благодаря своим физико-химическим особенностям, эта молекула может свободно проникать сквозь клеточные мембраны, выполняя роль внутри- и межклеточной сигнальной молекулы. Оксид азота синтезируется из L-аргинина с помощью фермента NO-синтазы, другим продуктом этой реакции является L-цитруллин.



Существует три изоформы NO-синтазы – нейрональная (nNOS или NOS1), эндотелиальная (eNOS или NOS3) и индуцибельная (iNOS или NOS2). В некоторых нейронах центральной и периферической нервной системы экспрессируется нейрональная изоформа (Förstermann, Sessa, 2012). Эндотелиальная изоформа присутствует в клетках эндотелия, некоторых клетках соединительной ткани, в сердечной мускулатуре, а также в некоторых глиальных клетках в нервной системе (Förstermann, Sessa, 2012; Lin, Taktakishvili, Talman, 2007; Maltsev и др., 2014). Индуцибельная изоформа синтезируется в разных типах клеток, в том числе в клетках иммунной системы, где участвует в механизмах защиты от патогенов путем производства большого количества оксида азота, который в высокой концентрации обладает токсичным действием на микробы (Förstermann, Sessa, 2012).

Все NO-синтазы являются кальмодулин-зависимыми, при этом для продукции оксида азота с помощью конститутивных изоформ nNOS и eNOS требуется связывание кальмодулина с ионами кальция, для индуцибельной формы влияние ионов кальция менее выражено (Alderton, Cooper, Knowles, 2001). Помимо наличия L-аргинина и Ca^{2+} -кальмодулина, синтетическая активность

нейрональной NO-синтазы также требует присутствия молекулярного кислорода, восстановленного НАДФ, флавин-содержащих кофакторов (ФМН и ФАД), и тетрагидробиоптерина (Wiesinger, 2001).

NO-синтазы состоят из двух доменов: N-концевой редуктазный домен, в котором расположены сайты связывания аргинина и тетрагидробиоптерина (ТГБП), а также гемовая структура, и С-концевой редуктазный домен, связывающий флавин-содержащие кофакторы (ФМН и ФАД), НАДФН. Между ними располагается участок связывания кальмодулина (рис.1). Ферментативная активность требует димеризации NO-синтазы, которая происходит в районе оксигеназного домена (Alderton, Cooper, Knowles, 2001).

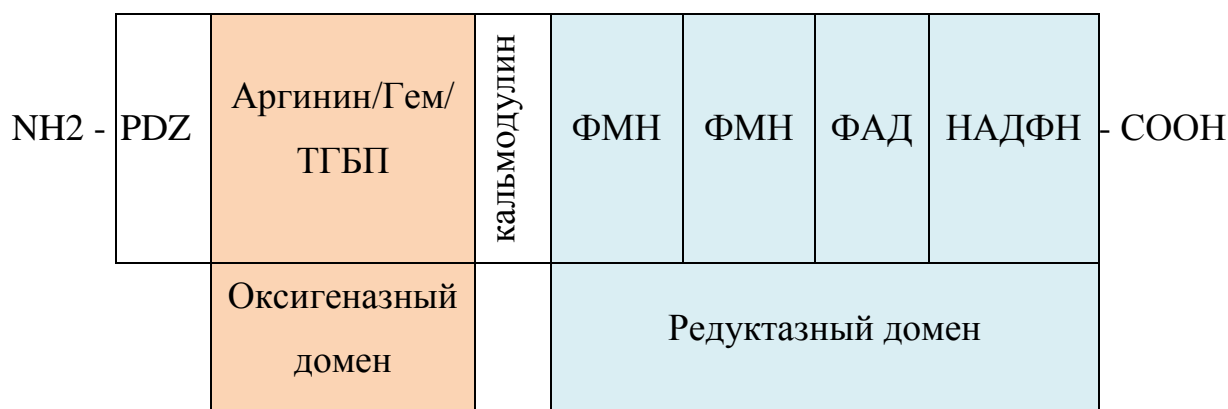


Рис.1. Схематическая структура доменной структуры нейрональной NO-синтазы. PDZ (PSD-95 discs large/ZO-1 homology) – домен для связывания с PSD-95; ТГБП – тетрагидробиоптерин; ФМН – фламинмононуклеотид; ФАД – флавинадениндинуклеотид; НАДФН – восстановленный НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, связанный с водородом.

Связывание Ca²⁺-кальмодулина обеспечивает дополнительную структурную стабильность, которая способствует переходу электрона из редуктазного домена NOS в оксигеназный домен (Alderton, Cooper, Knowles, 2001). Нейрональная NO-синтаза на N-конце содержит также дополнительный PDZ-домен, который позволяет ферменту связываться с белком PSD-95 и заякориваться в подмембранном пространстве отростков нейронов (Alderton, Cooper, Knowles,

2001; Christopherson и др., 1999a; Eliasson и др., 1997) . Активность NO-синтазы, помимо концентрации кальция, зависит от доступности субстрата (аргинина), кофакторов, а также посттрансляционных модификаций, в том числе фосфорилирования (Rameau и др., 2007; Rameau, Chiu, Ziff, 2004; Tsikas и др., 2000).

По данным литературы, существует два основных метаболических пути, с помощью которых оксид азота осуществляет свои функции. Первый – активация фермента гуанилатциклазы (ГЦ). Связывание оксида азота с гемовым центром ГЦ приводит к активации последней и синтезу циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который, в свою очередь, активирует фермент протеинкиназу G (PKG). PKG имеет множество мишеней в клетке, в том числе кальциевые, калиевые каналы, а также некоторые транскрипционные факторы. Таким образом, PKG путем фосфорилирования различных белков участвует в самых различных клеточных реакциях.

Другим хорошо описанным действием оксида азота является посттрансляционная модификация белков. Основными аминокислотами в составе полипептидной цепи, которые подвергаются ковалентной модификации под действием NO, являются цистеин с превращением группы $-SH$ в $-S-NO$ (S-нитрозилирование), и тирозин с образованием групп NO_2-Tyr (нитрование тирозина), $NO-Tyr$ (нитрозирование тирозина) (Bradley, Steinert, 2016; Недоспасов, Беда, 2005). При этом, если S-нитрозилирование цистеина является обратимым и может происходить во время восстановительных реакций, например, с участием тиоредоксинов и S-нитрозоглутатионредуктазы, то образование 3-нитротирозина является необратимым. Кроме того, S-нитрозилирование цистеина наблюдается как в физиологических, так и в патологических реакциях, в то время как формирование 3-нитротирозина в основном отражает патологический процесс (Bradley, Steinert, 2016).

1.1.2. Локализация нейрональной NO-синтазы в центральной нервной системе

Нейрональная NO-синтаза представлена несколькими сплайсинг-вариантами. Длинная изоформа нейрональной NOS (α NOS1) содержит PDZ-связывающий домен, который способен связываться с PDZ2-доменом белка PSD95 (Brenman и др., 1996; Christopherson и др., 1999a). Такое связывание способствует локализации нейрональной NO-синтазы в постсинаптическом уплотнении. Существуют также укороченные варианты фермента, известные как β NOS1 и γ NOS1, в которых отсутствует PDZ-связывающий домен. Изоформа β NOS1 найдена в некоторых участках мозга, а γ NOS1 не обнаружена (Eliasson и др., 1997). Так, 5-10% α NOS1-экспрессирующих клеток в стриатуме и коре экспрессируют также β -изоформу, при этом некоторые клетки стриатума экспрессируют только β NOS1 (Eliasson и др., 1997). В коре и гиппокампе, по последним данным, существует два основных типа локализации нейрональной NO-синтазы. Во-первых, NOS1 хорошо экспрессируется в цитоплазме некоторых ГАМКергических нейронов в коре и гиппокампе (Hardingham, Dachtler, Fox, 2013; Kubota и др., 2011). Во-вторых, с помощью *in situ* гибридизации показано наличие мРНК нейрональной NO-синтазы в телах пирамидальных нейронов гиппокампа (Blackshaw и др., 2003), а эксперименты с электронно-микроскопической иммуногистохимией продемонстрировали, что многие пирамидальные возбуждающие нейроны содержат белок NOS1 в головке дендритных шипиков (Burette и др., 2002).

В другом исследовании проанализировано относительное расположение разных белков в синапсах (Valtschanoff, Weinberg, 2001). Так, показано, что белок PSD95 расположен в цитоплазме на расстоянии около 12 нм от поверхности мембраны, при этом связанная с ним NO-синтаза располагается примерно в 18 нм от мембраны. В то же время сам белок PSD95 связан с NR2-субъединицей NMDA-рецептора, локализованной в мембране (Valtschanoff, Weinberg, 2001).

1.2. Убиквитин-зависимая деградация белков

Обзор литературы о протеасомах и убиквитин-зависимом распаде белков здесь и далее базируется на статье «Убиквитин-зависимый распад белков необходим для долговременной пластичности и памяти», Баль Н.В., Балабан П.М. // Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 4. С. 275-284 (Баль, Балабан, 2015)

По современным представлениям, процессы обучения и памяти основаны на возможности внутриклеточных перестроек, в том числе способности синаптических и внесинаптических структур менять свой молекулярный состав. Одним из элементов, необходимых для такой перестройки, является протеасома, которая осуществляет убиквитин-зависимый распад белков. Особенности данного процесса является ее точность – протеасомы расщепляют предварительно обозначенные мишени, достаточно высокая скорость и возможность локального воздействия. Данные свойства определили важное участие протеасом в синаптической пластичности, поскольку позволяют за короткое время провести перестройку молекулярных комплексов в пре- и постсинаптическом компартментах синапса (Баль, Балабан, 2015).

1.2.1. Общие данные о строении системы убиквитин-зависимой деградации белков

Распад белков в протеасомах представляет собой необходимый для нормального метаболизма процесс, участвующий в разнообразных функциях клеток, в том числе в нервных клетках.

При убиквитин-протеасомальном распаде белки-мишени «метятся» ковалентным присоединением убиквитина, после чего белок направляется к полисубъединичному комплексу - протеасоме. Убиквитин представляет собой маленький белок, состоящий из 76 аминокислот. Связывание убиквитина осуществляется тремя классами ферментов: E1, E2 и E3-лигазами. E1-лигаза осуществляет активацию убиквитина. Ферменты E2 связывают активированный убиквитин с E3-лигазой. Субстратная специфичность определяется в основном лигазами класса E3, которые узнают белки-мишени и присоединяют к ним молекулу убиквитина. Описанный процесс присоединения убиквитина является

общим, но иногда имеются особенности способов присоединения убиквитина и субстрата в случае разных E2 и E3-лигаз (Сорокин, Ким, Овчинников, 2009).

После связывания первой молекулы убиквитина, следующая молекула убиквитина может связываться с остатком лизина в составе первого убиквитина. Полиубиквитинированный субстрат распознается протеасомой и расщепляется до небольших пептидов и аминокислот. При этом сама цепь полиубиквитина не деградирует в протеасоме, а отщепляется от субстрата с помощью деубиквитирующих ферментов. Существует два класса деубиквитирующих ферментов: низкомолекулярные (С-концевые убиквитиновые гидролазы) и высокомолекулярные убиквитин-специфичные протеазы (Tai, Schuman, 2008).

Протеасомы, которые расщепляют полиубиквитинированные белки, называются 26S-протеасомами (Цимоха, 2010). Они состоят из одного каталитического 20S-центра, имеющего форму цилиндра, и одной или двух регуляторных 19S-частиц, располагающихся на его концах. Диаметр протеасом составляет порядка 11-12 нм, из-за чего внутрь протеасомы проходят белки только в развернутом виде. Разворачивание полипептидной цепи обеспечивается «основанием» 19S-частицы, которая содержит шесть субъединиц с АТФ-азной активностью (Rpt1-6) и четыре субъединицы, не имеющие АТФ-азной активности (Rpn1, 2, 10). Другая часть регуляторной частицы называется «крышкой» и включает в себя не-АТФ-азные субъединицы (Rpn 3, 5-9, 11, 12) (Цимоха, 2010). 20S-каталитическая частица имеет три протеазные активности: химотрипсин-подобную, трипсин-подобную и пост-глутамил пептидазную активность, которые расщепляют белки после гидрофобных, основных и кислых остатков, соответственно (Vigneron, Eynde Van den, 2014).

Одним из свойств убиквитин-зависимого распада белков является их тонкая пространственно-временная настройка. Хотя некоторые белки, в первую очередь неправильно свернутые, могут расщепляться в любое время, другие белки становятся мишенью для убиквитинлигаз в строго определенное время, например, при входе клетки в митотическую фазу. Поскольку одной из особенностей нейрона является распределение его функций между разными частями клетки, то

способность протеасом осуществлять локальную деградацию белков в разных компартментах в строго определенный момент определила их важную роль в нормальном функционировании нервной системы (Pines, Lindon, 2005).

1.2.2. Механизмы регуляции убиквитин-зависимой деградации белков.

Фосфорилирование

Одной из основных посттрансляционных модификаций, регулирующих активность ферментов, является фосфорилирование. Присоединение остатка фосфорной кислоты с помощью киназ и дефосфорилирование с помощью фосфатаз играет огромную роль как в синаптической пластичности, так и в процессах обучения и памяти. Фосфорилирование регулирует как проводимость рецепторов и каналов в синаптической мембране, различные внутриклеточные процессы, так и процессы синтеза белка. В настоящее время накапливаются данные о том, что фосфорилирование может регулировать и процессы распада белков (Djakovic и др., 2012; Upadhyа и др., 2006).

В работе (Upadhyа и др., 2006) было проведено сравнительное исследование влияния различных протеинкиназ на активность протеасом в ядрах и синапсах мыши и аплизии. Показано, что разные протеинкиназы в модели *in vitro* по-разному влияют на протеасомы, при этом одна и та же киназа может изменять разные типы протеолитических активностей протеасом (химотрипсин-, трипсин-подобную и пептидилглутамилпептидазную) с неодинаковой эффективностью и даже в противоположных направлениях. Так, протеинкиназа С активирует химотрипсин-подобную активность, не влияет на пептидилглутамилпептидазную и ингибирует трипсин-подобную активность протеасом в синапсах аплизии. Протеинкиназа А активирует химотрипсин- и трипсин-подобную активности протеасом из синапсов мыши и аплизии, при этом ингибирует химотрипсин-подобную активность протеасом из ядер мыши и аплизии (Upadhyа и др., 2006). Таким образом, в моделях *in vitro* наблюдается разнонаправленное влияние фосфорилирования на активность протеасом, однако, как происходит регуляция деградации белков в протеасомах в моделях *in vivo* или

приближенным к ним, остается неясным. Кроме того, как видно из предыдущей и настоящей частей данного обзора, регуляция деградации белков может происходить не только на уровне протеасом, но также и на уровне их мишеней. Также важным аспектом регуляции является пространственная координация деградации белков в протеасомах.

Кальций-кальмодулин зависимая протеинкиназа II.

Кальций-кальмодулин зависимая протеинкиназа II (CaMKII) является одним из самых распространенных ферментов в нервной клетке, который регулирует такие процессы, как рост отростков, синаптическая пластичность, обучение и память (Achterberg и др., 2014; Hell, 2014). Некоторые авторы предполагают, что функции CaMKII связаны не только с ее ферментативной активностью, но и с особенностями структурной организации этого белка, поскольку CaMKII способен формировать крупные полимерные структуры, состоящие из множества мономеров (Otmakhov, 2004; Rose, Jin, Craig, 2009). Кроме того, CaMKII характеризуется способностью на некоторое время переходить в «автономное» состояние, не требующее присутствия кальция для своей киназной активности, поэтому иногда рассматривается как «молекула памяти» (Hell, 2014).

В настоящее время активно исследуется роль протеинкиназы CaMKII в регуляции протеасом в нейронах. Так, показано, что после обучения в модели условнорефлекторного замирания возрастает химотрипсин-подобная активность протеасом в миндалинах, причем увеличение этой активности блокируется ингибитором кальций-кальмодулин зависимой протеинкиназы II, но не протеинкиназы A (Jarome и др., 2013).

Предполагается, что важную роль в увеличении активности протеасом во время обучения играет фосфорилирование субъединицы Rpt6. В экспериментах *in vitro* показано, что фосфорилирование белка Rpt6 с помощью CaMKII α в 1,8 раз увеличивает активность 26S протеасомы (Bingol и др., 2010).

Однако роль CaMKII заключается не только в фосфорилировании. В экспериментах на культуре нейронов с помощью генетически флуоресцентного белка, конъюгированного с одной из субъединиц протеасом, показано, что при

активации нейронов с помощью деполяризующего агента хлорида калия или агониста НМДА-типа глутаматных рецепторов наблюдался транспорт протеасом из отростков в шипики (Bingol, Schuman, 2006). Этот процесс блокировался хелаторами кальция, а также антагонистом НМДА-рецепторов. Позднее было установлено, что для транспорта протеасом из отростков в шипики необходимо автофосфорилирование субъединицы CaMKII α , которая в таком состоянии становится способной связываться как с белками постсинаптического уплотнения, так и с протеасомой, индуцируя заякоривание протеасом в районе синапса. При этом нарушение связывания и транслокации протеасом наблюдалось у мутантных клеток, в которых у CaMKII α была нарушена способность к транслокации, но не у тех клеток, в которых экспрессировалась CaMKII α с нарушенной киназной активностью. Это означает, что для транслокации протеасом в шипики не требуется фосфорилирование белков с помощью протеинкиназы CaMKII, но необходимо связывание с ней (Bingol и др., 2010).

В экспериментах на моллюсках показано, что через 6 часов после обучения увеличивается уровень фосфорилирования CaMKII по сайту T-305, которое сопровождается повышением количества GluA1-субъединицы АМПА-рецептора. Обучение животных и повышение уровня рецепторов нарушалось добавлением ингибиторов протеасом. Авторы предполагают, что увеличение количества GluA1-субъединицы регулируется с помощью CaMKII, которая уменьшает активность протеасом (Naskar, Wan, Kemenes, 2014).

Фосфорилирование также влияет на процесс убиквитинирования белков, в частности, влияющих на рост и ветвление отростков. Ранее упомянутая убиквитинлигаза Cdc20-APC подвергается контролю со стороны киназы CaMKII β , которая фосфорилирует белок Cdc20 и приводит к его освобождению из комплекса Cdc20-APC, что вызывает ингибирование убиквитинлигазной активности. Этот процесс, в свою очередь, управляет ретракцией дендритов в нейронах мозжечка (Puram и др., 2012).

Таким образом, кальций-кальмодулин зависимая протеинкиназа II регулирует активность протеасом, убиквитинлигаз, а также служит якорем для транслокации протеасом из дендрита в синапс во время активации нейронов.

Протеинкиназа Plk

В настоящее время также исследуется роль другой протеинкиназы, Plk (Polo-like kinase), в регуляции активности убиквитин-зависимого распада белков (Feng, Longo, Ferris, 2001; Seeburg, Pak, Sheng, 2005). Одной из мишеней Plk является белок SPAR, участвующий в ремоделировании цитоскелета в синапсах. После активации нейронов наблюдается увеличение количества Plk, что приводит к исчезновению белка SPAR и последующему уменьшению плотности зрелых шипиков и увеличению количества незрелых шипиков (Seeburg, Pak, Sheng, 2005). Уменьшение количества белка SPAR также наблюдается после индукции LTP в срезах гиппокампа (Chen и др., 2012). Одним из механизмов исчезновения мишени Plk является, по-видимому, убиквитин-зависимая деградация белка SPAR, поскольку добавление ингибиторов деградации белков в протеасомах частично восстанавливает количество SPAR в экспрессионной системе, в которой также экспрессируется Plk (Pak, Sheng, 2003). При этом предполагается, что фосфорилированию подвергаются не протеасомы, а субстрат, формируя при этом так называемый фосфодегрон – определенную последовательность аминокислот, в которой фосфорилированный серин служит сигналом для взаимодействия с белком β -TRCP, который, в свою очередь, обеспечивает убиквитинирование SPAR с помощью E3-убиквитинлигазы SCF (Ang и др., 2008).

Протеинкиназа A

Протеинкиназа A, как и CaMKII, является киназой, вовлеченной в процессы синаптической пластичности и памяти. Ее активация происходит после взаимодействия с цАМФ, в результате чего неактивная форма фермента распадается на каталитическую и регуляторную субъединицы. Каталитическая субъединица, в свою очередь, фосфорилирует белки-мишени.

Хотя в работе (Jarome и др., 2013) показано, что протеинкиназа A, в отличие от CaMKII, не вовлечена в регуляцию активности протеасом после обучения,

некоторые исследования показывают, что РКА все же участвует в контроле некоторых процессов убиквитин-зависимого распада белков после стимуляции нейронов (Iwase и др., 2014). В культуре нейронов коры было показано, что одновременная аппликация форсколина, которая приводит к повышению уровня цАМФ, и нейротрофического фактора BDNF приводит к зависимому от протеасом уменьшению уровня протеинкиназы EF2K. При этом, как и в случае с Pk, авторы предположили, что регуляция распада белка происходит не на уровне протеасом, а на уровне субстрата.

На модельных клетках PC12 авторы показали, что РКА фосфорилирует EF2K по серину-499. Фосфорилированный аминокислотный остаток вместе со своим окружением формирует фосфодегрон, который распознается E3-убиквитинлигазой SCF-типа, что приводит к убиквитинированию EF2K и его последующему распаду в протеасомах (Wiseman и др., 2013). Интересно, что синтез BDNF в дендритах, в свою очередь, зависит от фосфорилирования фактора элонгации eEF2 с помощью EF2K, то есть можно наблюдать механизм обратной связи, когда образование нейротрофического фактора приводит к деградации протеинкиназы, которая необходима для ее синтеза (Verpelli и др., 2010).

Кальцинейрин.

В регуляции убиквитин-зависимого распада белков в нейронах также играет роль дефосфорилирование белков. Показано, что реактивация памяти во время напоминания приводит к увеличению убиквитинирования белков по Lys-48 в клетках миндалины, гиппокампа и медиальной префронтальной коры в модели условнорефлекторного страха. Интересно, что убиквитинирование, но не появление c-fos-позитивных клеток, блокировалось ингибиторами кальцинейрина, серин-треониновой фосфатазы, которые были введены за 5 минут до напоминания (Fukushima и др., 2014). Таким образом, активация одного из ферментов, отвечающего за дефосфорилирование белков, необходима для усиления скорости убиквитинирования белков.

Белок-белковое взаимодействие

В настоящее время накапливаются данные о том, что регуляция активности протеасом осуществляется также с помощью других белков. Часть этих белков участвует в распознавании и доставке субстратов к протеасомам, другие могут влиять на стабильность комплекса протеасомы, а также регуляцию ее активности (Puram и др., 2013).

Одними из основных ассоциированных с протеасомами белками являются ферменты, связывающие меченые убиквитином белки и доставляющие их к протеасомам. Одним из таких белков является белок Rpn10, который связывает полиубиквитиновые цепи белков и доставляет эти белки к протеасоме, активируя их деградацию. В нейронах мозжечка показана необходимость локальной регуляции убиквитин-зависимого распада белков, в частности, в районе клеточного центра. Нокдаун субъединицы протеасомы Rpn10 в районе центросомы с помощью РНК-интерференции вызывает укорочение дендритов, но не аксонов, в гранулярных клетках мозжечка как *in vitro* (в культуре нейронов), так и *in vivo*, что свидетельствует о том, что распад белков в протеасомах необходим для раннего морфогенеза нейронов. При этом функцию Rpn10 около центросомы, в свою очередь, регулирует белок Id1, который блокирует связывание Rpn10 с белком регуляторной части протеасомы Rpn9 (Schmidt и др., 2005).

Доставку субстрата к протеасомам осуществляют белки, содержащие UBA/UBL-мотивы. При этом UBA-мотив необходим для связывания субстрата, тогда как рецепторами UBL-мотива являются субъединицы протеасом. Одним из таких белков является p62, который необходим для доставки интернализованного рецептора TrkA к протеасоме для его деубиквитинирования с последующим разрушением в лизосоме, при этом рецептором белка p62 является субъединица Rpt1 в регуляторной части протеасомы. Предполагается, что такой сложный механизм связан с использованием транспорта для убиквитинированных белков в тело нейрона (Geetha, Wooten, 2008).

Стоит отметить, что доставку субстрата к протеасомам может осуществлять также фактор элонгации трансляции eEF1A, который, помимо доставки аминоксил-тРНК к рибосомам, может связывать неправильно синтезированные

цепи и отправлять их к протеасомам (Chuang и др., 2005). Представляется любопытным проверить, может ли eEF1A играть подобную роль в нейроне, поскольку показано, что активация нейронов с помощью KCl приводит к увеличению мРНК этого фактора элонгации в отростках (Moon и др., 2008; Tsokas и др., 2005).

Таким образом, для тонкой настройки деградации белков в нейронах требуется точно скоординированная работа комплекса белков, которые участвуют как в транспорте, так и в протеолизе белков-мишеней.

1.2.3. Участие оксида азота в регуляции убиквитин-зависимой деградации белков

В одной из работ, проведенных на нервных клетках, показано, что длительное (24 часа) добавление глутамата к культуре нейронов приводит к убиквитин-зависимой деградации белка PTEN (Kwak и др., 2010). Этот эффект частично ингибировался как блокатором NO-синтазы, так и блокатором протеасом, поэтому авторы предполагают участие оксида азота в регуляции деградации белка PTEN в протеасомах. В экспериментах с нервной системой каракатицы показано, что стимуляция NMDA-рецепторов приводила к NO-опосредованной деградации α -тубулина (Palumbo и др., 2002).

S-нитрозилирование, вызванное действием NO и его производных, может по-разному регулировать активность различных компонентов убиквитин-протеосомальной системы. Так, S-нитрозилирование может прямо ингибировать активность 26S-протеасомы путем воздействия на 10 цистеиновых остатков в ее каталитической части (Hu и др., 2005). В то же время, в клетках нейробластомы показано, что повышенная экспрессия нейрональной NO-синтазы увеличивает активность протеасом (Karadia и др., 2009). S-нитрозилирование также может приводить к модификации цистеиновых остатков, расположенных на N-конце белков-мишеней, что, в свою очередь, может контролировать распад этих белков в протеасомах по N-концевому правилу (Shang и др., 2005).

Белок паркин, участвующий в развитии паркинсонизма, является убиквитинлигазой, и также может подвергаться S-нитрозилированию. В работе

(Chung и др., 2004) показано, что инкубирование паркина с донором оксида азота приводит к ингибированию убиквитинлигазной активности, однако последующие данные продемонстрировали, что важную роль играет временной параметр, так как в первые несколько часов активность паркина увеличивается, и только затем происходит ее снижение (Lipton S.A. и др., 2005).

Проведенный нами анализ литературы показывает, что может существовать связь между синтезом оксида азота и распадом белков в протеасомах в нейронах. Однако эти данные касаются, в первую очередь, патологических процессов, поэтому изучение влияния оксида азота на регуляцию деградации белков в протеасомах в более физиологических условиях является важной задачей.

Задача 1: Исследование влияния NO-синтазы на распад белков в протеасомах нейронов с помощью генетически-кодируемого флуоресцентного сенсора убиквитин-зависимой деградации белков.

2. УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА И УБИКВИТИН-ЗАВИСИМОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

2.1. Роль оксида азота в синаптической пластичности

В настоящее время считается, что в основе обучения и памяти лежат изменения эффективности синаптической передачи между нейронами. Удобной моделью для изучения синаптических изменений является феномен долговременной потенциации/депрессии, который заключается в том, что различные паттерны стимуляции пресинаптических (а иногда и постсинаптических) нейронов или их отростков могут приводить к увеличению или уменьшению амплитуды токов в постсинаптической клетке в ответ на одиночные стимулы (в общем случае данный феномен называется синаптической пластичностью). Такие изменения могут быть кратковременными (кратковременная пластичность) и долговременными (долговременная пластичность).

Помимо временного аспекта, пластичность может различаться в зависимости от локализации произошедших изменений. В зависимости от места приложения эффекта различают:

1) Пресинаптическая пластичность – обусловлена изменением синаптического выброса медиатора в ответ на деполяризацию пресинаптической мембраны. Характеризуется изменением, в первую очередь, вероятности синаптического выброса. Механизмами такой модификации могут быть:

- изменение концентрации кальция в пресинаптической мембране;
- изменение количества пузырьков с медиатором, находящихся рядом с пресинаптической мембраной;
- изменение скорости наполнения пузырьков медиатором и др.

2) Постсинаптическая пластичность – обусловлена изменением проводимости каналов, открывающихся в ответ на связывание рецепторов. Основными механизмами такой пластичности являются

- изменение количества ионных каналов на синаптической мембране за счет встраивания новых каналов из внутриклеточного пространства либо за счет латеральной диффузии из внесинаптических участков;
- изменение проводимости отдельных каналов за счет их модификации с помощью внутриклеточных ферментов и других реакций. Типичным примером является фосфорилирование GluR1-субъединицы АМПА-рецептора, которое приводит к изменению проводимости этого рецепторного канала.

К настоящему времени накоплен большой массив данных о роли оксида азота в синаптической пластичности, в частности, потенциации возбуждающих ответов. При этом показано участие этой молекулы в кратковременной (Chakroborty и др., 2015), долговременной (Zorumski, Izumi, 1993), пре- (Hardingham, Dachtler, Fox, 2013; Johnstone, Raymond, 2013; Micheva и др., 2003) и

постсинаптической пластичности (Ko, Kelly, 1999), а также в фасилитации вызванных ответов в отдельных нейронах беспозвоночных (Korshunova, Balaban, 2014). Особую сложность представляет то, что, блокада синтеза оксида азота влияет не на все, а только на некоторые виды долговременной потенциации. В работе (Williams и др., 1993) показано, что влияние блокады синтеза оксида азота на долговременную потенциацию зависит от возраста животных и условий (температуры) эксперимента. Между тем, судя по более поздним работам (Johnstone, Raymond, 2011), это влияние не абсолютно и опосредовано другими факторами.

В ряде исследований показано, что блокада синтеза оксида азота оказывает влияние на потенциацию, вызванную «сильным» протоколом стимуляции, при котором во время стимуляции индуцируется ответ с максимальной амплитудой, при этом высокочастотная стимуляция с силой, вызывающей полумаксимальный ответ, индуцировала NO-независимую потенциацию (Gribkoff, Lum-Ragan, 1992). Противоположный эффект влияния «сильного» и «слабого» протокола на чувствительность к блокаде NO-синтазы обнаружен в работе (Chetkovich, Klann, Sweatt, 1993; Haley, Malen, Paul, 1993). Кроме того, в работе (Lu, Kandel, Hawkins, 1999) показано, что ДВП, вызванная тремя тетанусами с интервалом 5 минут, почти полностью ингибируется блокатором NO-синтазы, в то время как 4 высокочастотные стимуляции вызывают долговременную потенциацию, лишь частично зависящую от синтеза оксида азота. В сравнительной работе по данным многих экспериментов показано, что чувствительной к оксиду азота является более высокая по величине потенциация (25 из 36 проанализированных экспериментов с высокой величиной потенциации, средняя амплитуда 162% на 30-минутном отрезке после потенциации), тогда как более низкая потенциация (136%) была чувствительна к блокаде оксида азота в 11 из 36 экспериментов (Padamsey, Emptage, 2013). Несмотря на достоверную корреляцию, полученную в данном метаанализе, величина долговременной потенциации не является, судя по всему, единственным фактором чувствительности к оксиду азота.

Согласно другим данным, основную роль играет не сила стимуляции, а вероятность возникновения спайка в постсинаптической клетке во время индукции ДВП (Phillips, Hardingham, Fox, 2008). Поскольку стандартная высокочастотная стимуляция, состоящая из 100 импульсов с частотой 100 Гц приводит к быстрому угашению амплитуды постсинаптического ответа (возможно, связанному с истощением медиатора в пресинаптической терминали), то более предпочтительной для индукции NO-зависимой потенциации является протокол тета-стимуляции, поскольку он состоит из отдельных пачек с интервалом в 200мс, которые, по-видимому, позволяют заполнить пузырьки с медиатором (Phillips, Hardingham, Fox, 2008).

Интересные данные о роли оксида азота в долговременной потенциации получены в экспериментах с «депотенциацией» в гиппокампе *in vivo* (Doyle и др., 1996). В этих экспериментах сначала была вызвана ДВП с помощью одной пачки высокочастотной стимуляции, а через полчаса низкочастотная (10Гц) стимуляция приводила к падению амплитуды ВПСП. При этом блокада NO-синтазы с помощью блокатора 7-NI предотвращала падение амплитуды ВПСП в данных экспериментах (Doyle и др., 1996). Это может означать, что оксид азота участвует не только в процессах индукции потенциации, но и ее стабилизации.

Одним из методов изучения влияния оксида азота на физиологические процессы является добавление доноров оксида азота (вещества, которые в растворе спонтанно расщепляются с выделением оксида азота) или даже прямое насыщение раствора газом NO. Как и в случае с блокадой NO-синтазы, такое экзогенное увеличение концентрации оксида азота по-разному влияет на долговременную потенцию. Так, в ряде работ (Izumi, Clifford, Zorumski, 1992; Izumi, Tokuda, Zorumski, 2008; Li, Wieraszko, 1994) показано ингибирующее действие доноров NO, добавленных до индукции долговременной потенциации. Противоположный эффект продемонстрирован в работах (Bon, Garthwaite, 2001; Bon, Garthwaite, 2002; Zhuo и др., 1994), где добавление донора NO либо само по себе вызывало увеличение амплитуды ответов после отмывки (при частоте

базовой стимуляции 0,2 Гц), либо усиливало слабую потенциацию, когда действовало на фоне ее индукции. При этом усиление потенциации обусловлено активацией NO-зависимой гуанилатциклазы (Bon, Garthwaite, 2002; Lu, Kandel, Hawkins, 1999).

Одним из хорошо изученных сигнальных путей является NO-цГМФ-PKG каскад, при котором оксид азота связывается с гемовой группой гуанилатциклазы и активирует ее. Активированная гуанилатциклаза производит цГМФ, который, в свою очередь, активирует протеинкиназу G (PKG).

Поскольку гуанилатциклаза (ГЦ) расположена как на пре-, так и на постсинаптической мембране, то при диффузии оксида азота происходит цГМФ-зависимая регуляция синаптической пластичности с обеих сторон синапса (Taqatqeh и др., 2009). На основе электрофизиологических и микроскопических данных известно, что ГЦ1 локализована в пресинаптической мембране, в то время как ГЦ2 – в постсинапсе (Serulle и др., 2007; Serulle, Arancio, Ziff, 2008; Taqatqeh и др., 2009). Нокаутирование каждой из гуанилатциклаз приводит к нарушению ДВП. При этом нокаутирование гуанилатциклазы 1 (GC1) нарушает позднюю фазу ДВП, в то время как мутация гуанилатциклазы 2 оказывает влияние сразу на раннюю стадию долговременной потенциации. Наружная аппликация активатора протеинкиназы G 8-Br-PET-cGMP восстанавливает ДВП в срезах только у GC2-нокаутированных мышей.

Высокочастотная стимуляция пресинаптических волокон увеличивает уровень цГМФ на первой минуте (от 10 сек до 2 мин по разным данным) после тетанизации, при этом продукция цГМФ зависит от синтеза NO (Chetkovich, Klann, Sweatt, 1993; Monfort и др., 2002). После 5-10 минут уровень цГМФ снижается. Под действием цГМФ повышается активность фосфодиэстеразы, которая сохраняется в течении часа (Monfort и др., 2002). Фосфодиэстераза, в свою очередь, гидролизует цГМФ до ГМФ, то есть наблюдается обратная отрицательная связь. При этом интересно, что ингибиторы фосфодиэстеразы нарушают ДВП, как и ингибиторы гуанилатциклазы (Monfort и др., 2002).

Связывание цГМФ с регуляторным доменом протеинкиназы G высвобождает ее каталитический домен и позволяет последнему фосфорилировать белки-мишени. Одной из постсинаптических мишеней протеинкиназы G является GluR1-субъединица АМПА-рецептора, с которой данный фермент может прямо связываться и фосфорилировать ее по серину 845. Такое взаимодействие увеличивает связывание GluR1 с мембраной (Serulle и др., 2007; Wang и др., 2005). Кроме того, PKG фосфорилирует во время потенциации белок VASP, который участвует в регуляции цитоскелета как в пре-, так и в постсинаптических нейронах (Wang и др., 2005).

На культуре нейронов коры продемонстрировано, что оксид азота регулирует синтез ряда белков (Peunova, G Enikolopov, 1993), в том числе связанных с пластичностью (neuroplasticity-associated proteins) (Gallo, Iadecola, 2011), к которым относятся Arc/Arg3.1, c-Fos, Egr-1, BDNF, при этом регуляция часто осуществляется через цГМФ-зависимый путь. Группой Э.Кэндела показано, что протеинкиназа G фосфорилирует транскрипционный фактор CREB в постсинаптических нейронах при индукции ДВП (Lu, Kandel, Hawkins, 1999). Также в данной работе показано, что сама по себе фармакологическая активация PKG не приводит к фосфорилированию CREB, однако сочетание ее хотя бы с однократной тетанической стимуляцией вызывает резкое увеличение фосфорилирования транскрипционного фактора (Lu, Kandel, Hawkins, 1999).

В настоящее время появляются данные о том, что оксид азота может также связываться с гемовой группой HRI-киназы (heme-regulated eukaryotic initiation factor eIF2 α kinase). Этот фермент фосфорилирует фактор инициации трансляции и регулирует, таким образом, трансляцию некоторых белков, например, BACE1, участвующего в миелировании аксонов и формировании нейритов, а также в развитии болезни Альцгеймера (Ill-raga, Tajés, Busquets-garcí, 2015), GluN2B-субъединицы NMDA-рецептора (Ramos-fernández и др., 2016). Той же группой ранее было показано, что HRI-киназа участвует в памяти, связанной с распознаванием предметов (Ill-Raga и др., 2013).

Помимо активации гуанилатциклазы и, возможно, HRI-киназы, оксид азота регулирует синаптическую пластичность с помощью **нитрозилирования белков** (Bradley, Steinert, 2016; Davis и др., 2001). Этому процессу в последнее время уделяется все больше внимания. В биполярных нейронах сетчатки золотой рыбки оксид азота путем нитрозилирования влияет на кратковременную пластичность, которая влияет на адаптацию зрения к разной освещенности (Tooker и др., 2013).

Ряд исследований показывает, что оксид азота может регулировать транспорт АМПА-рецепторов с помощью нитрозилирования белков, вовлеченных в этот процесс. Транспорт АМПА-рецепторов играет важную роль в синаптической пластичности, так как определяет количество рецепторов, встроенных в постсинаптическую мембрану. Количество АМПА-рецепторов на мембране в большой степени определяет амплитуду постсинаптического ответа, при этом увеличение/уменьшение количества рецепторов часто определяет, в свою очередь, потенциацию/депрессию синаптической передачи.

Одним из белков, регулирующих поверхностную экспрессию GluR1-содержащих АМПА-рецепторов, является старгазин. Нитрозилирование старгазина приводит к связыванию этого белка с GluR1-субъединицей и увеличению количества последней на поверхности мембраны (Selvakumar, Huganir, Snyder, 2009). В то же время той же группой показано, что нитрозилирование самой GluR1-субъединицы по цистеину 875 усиливает ее фосфорилирование по серину 831, и это, с одной стороны, приводит к увеличению проводимости рецепторного канала, а с другой – к усилению эндоцитоза рецептора путем связывания с AP2 белком, что снижает количество рецепторов на мембране (Selvakumar и др., 2013).

Оксид азота также регулирует встраивание в мембрану GluR2-субъединицы АМПА-рецептора. В частности, нитрозилирование белка NSF (N-Ethylmaleimide Sensitive Factor) увеличивает его связывание с GluR2-субъединицей и повышает встраивание последней в мембрану (Huang и др., 2005). Одновременно с этим

оксид азота снижает кластеризацию PICK1, который в виде кластеров удерживает GluR2-субъединицу в подмембранном пространстве (Sossa, Beattie, Carroll, 2007).

Большую роль в регуляции поверхностной экспрессии глутаматных рецепторов играет белок PSD-95, который способен образовывать кластеры и увеличивать площадь постсинаптического уплотнения. Кластеризация PSD-95 зависит от пальмитоилирования белка по цистеину 3 и 5. Однако эти же сайты являются мишенью для нитрозилирования белка. Таким образом, эти две модификации конкурируют между собой, и нитрозилирование белка приводит к снижению кластеризации PSD-95 (Ho и др., 2011).

Таким образом, нитрозилирование белков может регулировать другие посттрансляционные модификации. Также нитрозилирование белков может регулировать их распад. Так, S-нитрозилирование белка p35, активатора циклин-зависимой киназы 5 (Cdk5), приводит к его быстрой убиквитин-зависимой деградации. Фармакологическая блокада синтеза оксида азота или нокаут NO-синтазы приводят к увеличению активности Cdk5, что вызывает изменение цитоскелета, нарушение поверхностной экспрессии NMDA-рецепторов и синаптической дисфункции (Zhang и др., 2015). Гиперактивность Cdk5, в свою очередь, связана с нейродегенеративными и психическими заболеваниями (Cheung, Fu, Ip, 2006; Cheung, Ip, 2012). Нокаутирование белка p35 приводит к снижению порога индукции ДВП (Wei и др., 2005).

2.2. Роль убиквитин-зависимой деградации белков в синаптической пластичности

В последние годы накапливаются данные о том, что наряду с синтезом белка в процессах обучения и синаптической пластичности необходимым является распад белков, основная часть которого происходит в протеасомах (Hegde, 2010; Jarome, Helmstetter, 2013).

У млекопитающих активность протеасом необходима для формирования долговременной потенциации, хотя существуют разногласия, в какой именно фазе

– ранней или поздней, или в обеих. Ранняя фаза длится 1-2 часа после индукции ДВП и вовлекает вход кальция, активацию CaMKII и увеличение концентрации АМПА-рецепторов в синапсах. В срезах гиппокампа фармакологическая блокада протеасом приводит, по разным данным, к усилению индукции ДВП (Dong и др., 2008; Santos и др., 2015), уменьшению ранней фазы ДВП (Karpova и др., 2006) или не оказывает на неё влияния (Fonseca и др., 2006). Эти различия объясняются специфичностью и концентрацией используемых ингибиторов (Dong и др., 2008).

Поздняя фаза долговременной потенциации выделяется многими авторами как отдельный важный этап, который длится в течение многих часов и требует трансляции белков и транскрипции генов. Блокирование активности протеасом на этом этапе нарушает поддержание поздней фазы долговременной потенциации (Dong и др., 2008; Fonseca и др., 2006; Karpova и др., 2006; Santos и др., 2015). Что интересно и несколько парадоксально, одновременная блокада и трансляции белка и активности протеасом приводит к сохранению поздней фазы долговременной потенциации (Dong и др., 2008; Fonseca и др., 2006). Механизм данного явления в настоящее время является дискуссионным. *Fonseca R.* и соавторы предполагают существование баланса между синтезом и деградацией белков, которые регулируют структуру синапсов, и нарушение этого баланса приводит к дезорганизации синапсов и снижению вызванных синаптических ответов. При этом одновременная блокада трансляции и деградации белков, по их мнению, сохраняют относительный баланс существующих белков, поэтому потенция, сформированная в раннюю фазу и не требующая сама по себе трансляции и деградации белков, сохраняется (Fonseca и др., 2006).

Стоит также обратить внимание, что одновременная блокада транскрипции мРНК и распада белков в протеасомах не сохраняет позднюю стадию ДВП (Dong и др., 2008). Предполагается, что блокада протеасом сама по себе приводит к подавлению транскрипции некоторых генов путем ингибирования распада транскрипционных репрессоров. Показано, что индукция ДВП приводит к деградации белка ATF4, который является транскрипционным репрессором, блокирующим синтез нейротрофического фактора BDNF, необходимого, по

некоторым данным, для развития нормальной ДВП (Dong и др., 2008). То есть, одним из механизмов необходимости активности протеасом для пластических процессов может быть распад репрессора ATF4, который приводит к увеличению транскрипции генов, необходимых для ДВП.

Исследование влияния протеасом на индукцию и поддержание ДВП показало, что под действием блокаторов протеасом увеличивается трансляция белков по PI3K-mTOR-eIF4G-пути, то есть распад белков в протеасомах регулирует также процесс трансляции белков в нейронах (Dong и др., 2014). При этом одним из механизмов контроля является деградация позитивных (eIF4E и eEF1A) и негативных (Paip2 и 4E-BP2) белковых регуляторов трансляции во время ДВП (Dong и др., 2014).

Помимо участия в потенциации, для убиквитин-протеасомной системы показано, что она играет важную роль и в долговременной депрессии у позвоночных и беспозвоночных животных (Citri и др., 2010; Fioravante, Liu, Byrne, 2008; Klein, Castillo, Jordan, 2015).

Таким образом, убиквитин-протеасомальная система является активным участником процессов пластичности в нервной системе. Каким же образом распад белков в протеасомах участвует в регуляции синаптических ответов и как этот процесс взаимодействует с уже известными механизмами контроля передачи нервного сигнала?

Ряд исследований показывает, что повышенная синаптическая активность приводит к увеличению количества шипиков (Hamilton и др., 2012; Maletic-Savatic, Malinow, Svoboda, 1999). Усиление возбуждения нейронов в культуре, вызванное блокатором ГАМК_A-рецепторов, увеличивает количество шипиков, причем этот процесс зависит от деградации белков в протеасомах (Hamilton и др., 2012). Также показано, что увеличение числа шипиков зависит от фосфорилирования субъединицы Rpt6 протеасом, активности кальций-кальмодулин зависимой протеинкиназы II, а также от взаимодействия этой протеинкиназы с GluN2B субъединицей NMDA-рецептора (Hamilton и др., 2012).

Исследования с помощью молекулярно-биологических методов показывают, что важные синаптические белки, такие как PSD-95, Shank, GKAP, AKAP, SPAR, RIM-1 и GRIP1 подвергаются убиквитин-зависимой деградации белков (Colledge и др., 2003; Ehlers, 2003; Guo, Wang, 2007; Lee и др., 2011; Tsai, 2014; Yao и др., 2007).

Некоторые из этих белков участвуют в круговороте рецепторов, а также в их интернализации. Показано, что интернализация глутаматных рецепторов после добавления АМПА или НМДА зависит от распада белков в протеасомах (Patrick и др., 2003). Одним из белков, подвергающимся распаду в ходе этого процесса, является PSD-95, который убиквитинируется и элиминируется с помощью протеасом после активации нейронов с помощью НМДА (Patrick и др., 2003), хотя в двух работах попытка детектировать полиубиквитинирование PSD-95 не увенчалась успехом, что может быть связано с методическими особенностями (Bingol, Schuman, 2004; Mao, Lin, Gean, 2008). PSD-95 является белком постсинаптического уплотнения, участвующим как в связывании рецепторов и закреплении их в синаптическом уплотнении, так и в связывании ферментов, в том числе СаМКП и NO-синтазы, регулирующих фосфорилирование, нитрозилирование и другие модификации рецепторов и других белков постсинаптического уплотнения. Таким образом, деградация PSD-95 может приводить к локальному распаду рецептор-белкового комплекса и перестройке структуры постсинаптического уплотнения. Помимо PSD-95, в регуляции круговорота глутаматных рецепторов участвует белок постсинаптического уплотнения GRIP1, количество которого также регулируется активностью протеасом (Guo, Wang, 2007).

Сравнительное исследование убиквитинирования ряда постсинаптических белков после активации нейронов, проведенное на культуре, показало, что в наибольшей степени данной модификации подвержены белки Shank, GKAP и AKAP97/I50 (Ehlers, 2003). Белок GKAP служит связующим элементом в синапсе, который обеспечивает взаимодействие между PSD-95 и Shank и участвует в формировании постсинаптического уплотнения. Показано, что усиление

нейрональной активности под действием ингибитора ГАМК_A-рецептора приводит к убиквитин-зависимому распаду GKAP, при этом мутация одного из сайтов фосфорилирования GKAP предотвращает этот распад. Важность этого механизма подтверждается тем, что данная мутация приводит к нарушению гомеостатической пластичности в нейронах, вызванной как хроническим повышением, так и понижением синаптической активности (Shin и др., 2012). Убиквитинирование GKAP происходит с помощью специфичной E3-убиквитинлигазы TRIM3, при этом дальнейшая деградация GKAP в протеасомах приводит к снижению количества Shank1 (Hung и др., 2010). Таким образом, убиквитин-зависимая деградация белка GKAP приводит к перестройке молекулярного комплекса в постсинаптическом уплотнении. Влияние протеасом на структуру пресинаптического белкового комплекса рассмотрено в обзоре (Кудряшова, 2014).

Анализ данных литературы о роли оксида азота и убиквитин-зависимой деградации белков показывает, что оба компонента играют неоднозначную роль в синаптической пластичности. Интригующим процессом, который, возможно, сможет пролить свет на понимание внутримолекулярных процессов во время синаптических процессов, является потенциация, которую условно можно назвать «стабилизированной потенциацией», которая наблюдается в условиях блокады синтеза белка и распада белков в протеасомах. При этом как синтез белка, так и деградация выступают как дестабилизирующие агенты, поскольку только при их одновременной блокаде наблюдается сохранение амплитуды потенциации. Участвует ли в этом процессе оксид азота? Ряд данных, полученных в поведенческих экспериментах в нашей лаборатории на беспозвоночных животных, показывают, что оксид азота может являться дестабилизирующим фактором, участвующих в синаптических перестройках во время реактивации нейронов (подробнее см. в п.3 настоящего обзора). Кроме того, эксперименты с «депотенциацией» *in vivo*, о которых шла речь в настоящем разделе, также дают основание полагать, что блокада NO-синтазы способствует стабилизации долговременной потенциации, в частности, препятствуя падению амплитуды

ВПСП при низкочастотной стимуляции после индукции ДВП (Doyle и др., 1996). Таким образом, представляется важным проверить, может ли блокада синтазы оксида азота, подобно ингибиторам деградации белков, нарушать долговременную потенцию и стабилизировать ее на фоне ингибитора синтеза белка.

Задача 2: исследовать влияние блокады NO-синтазы на долговременную потенцию в срезах гиппокампа без/на фоне ингибитора синтеза белка.

3. РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И УБИКВИТИН-ЗАВИСИМОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ В ОБУЧЕНИИ И ПАМЯТИ

3.1. Роль оксида азота в обучении и памяти.

Как и в случае экспериментов с долговременной потенцией, существуют различные данные о роли оксида азота в механизмах обучения и памяти.

Распознавание знакомых/незнакомых объектов

Эксперименты с распознаванием новых объектов являются хорошим методом для изучения памяти, поскольку не сопряжены с сильным стрессом и связаны с работой многих сенсорных систем. В ходе экспериментов обычно оценивается время, которое животное затрачивает на исследование знакомых и незнакомых предметов или помещений.

В ранних экспериментах с обонятельным исследованием знакомых/незнакомых клеток, в которых ранее находились другие животные, было показано, что блокада синтеза оксида азота нарушает их различение, хотя между знакомством и тестированием проходило меньше часа (Böhme и др., 1993). Однако в другой работе (Boultadakis, Georgiadou, Pitsikas, 2010) показано, что блокада NO-синтазы не влияет на дискриминацию знакомых и незнакомых предметов через час после знакомства с ними, при этом крысы хуже их различают через 24 часа, если L-NAME был введен до ознакомления, сразу после ознакомления с предметами или за час до тестирования. Интересно, что такой эффект показан для концентрации 1-3 мг/кг, но не 10 мг/кг.

В то же время, в другом исследовании тех же авторов обнаружено, что хотя L-NAME сам по себе не влияет на память, протестированную через 3 часа после ознакомления, такая память нарушалась под действием ингибиторов NMDA-рецепторов, при этом блокада NO-синтазы с помощью L-NAME (10 мг/кг, но не 1-3 мг/кг) предотвращала это нарушение (Boultadakis, Pitsikas, 2010).

Такие данные свидетельствуют о том, что в ходе формирования промежуточной (в пределах 1-3 часов) и долговременной памяти оксид азота вовлечен в разные механизмы, которые могут иметь разнонаправленный эффект, а потому их иногда сложно обнаружить.

Сходные данные получены в некоторых экспериментах на крысах в лабиринте Морриса и радиальном водном лабиринте. Под влиянием различных блокаторов NMDA-рецепторов показано нарушение пространственного обучения, в то время как блокада NO-синтазы с помощью L-NAME в концентрации 10 мг/кг снимала этот эффект (Boultadakis, Pitsikas, 2010; Wass и др., 2006). При этом интересно, что сама блокада синтеза оксида азота влияла на рабочую и референсную память во время обучения в концентрации 3 мг/кг, но не в концентрации 10 мг/кг (Boultadakis, Pitsikas, 2010).

Обучение с отрицательным подкреплением

Обучение с отрицательным подкреплением заключается в формировании у животного ассоциации между нейтральным условным стимулом и неприятным или даже болезненным безусловным стимулом. При этом формируется условно-рефлекторная реакция, которую и анализируют в ходе экспериментов. Существует несколько вариантов экспериментов с негативным подкреплением, при этом часто в качестве безусловного стимула применяется удар током, поскольку его легко дозировать и стандартизировать. Кроме того, преимуществом данного обучения является простота, так как обычно требуется однократное сочетание (либо слабое многократное с небольшим интервалом в несколько минут) условного и безусловного стимула для формирования длительной памяти, которая может сохраняться вплоть до нескольких месяцев.

Нейрофизиологические данные показывают, что в формировании условных рефлексов с отрицательным подкреплением участвует миндалина (Overeem, Kokkinidis, 2012; Schafe и др., 2005). В зависимости от условного стимула в формировании рефлекторной реакции также участвует гиппокамп (реакция на обстановку) (Dobryakova, Gurskaya, Markevich, 2015; Fabri и др., 2014; Ramirez и др., 2013), таламус (на звук) (Hong и др., 2012; Ota и др., 2010b), зрительная кора (на зрительный стимул) (Kelley и др., 2011), а также другие структуры.

В экспериментах с классическим условно-рефлекторным замиранием на звук после сочетания последнего с ударом тока показано, что в формировании памяти участвует оксид азота, синтезируемых в латеральной миндалине (Schafe и др., 2005). При этом с помощью ретроградной сигнализации и цГМФ-зависимого пути происходит запуск транскрипции раннего гена EGR-1 в ядрах таламуса (Overeem и др., 2010). Также NO-зависимый синтез цГМФ вовлечен в увеличение количества GluR1-субъединицы АМПА-рецептора (постсинаптического) и синапсина (пресинаптического белка) в синапсах латеральной миндалины в течение месяца после обучения (Ota и др., 2010a). Также показано, что в регуляции количества этих белков участвует GluN2B-субъединица NMDA-рецептора (Ota и др., 2010a), для которой ранее продемонстрирована связь с NO-синтазой. Прямая регистрация с помощью микродиализного сбора другого продукта NO-синтазы – цитруллина - показала активацию фермента в медиальной префронтальной коре во время обучения, напоминания и тестирования (Судоргина, 2016).

В экспериментах с пассивным избеганием на приподнятой платформе показано влияние синтеза оксида азота на консолидацию (Baratti, Kopf, 1996; Komsuoglu-Celikyurt и др., 2011) и реконсолидацию памяти, при этом в экспериментах с напоминанием показано влияние времени введения блокатора (блокада синтеза оксида азота влияет через 0-30, но не 180 минут после введения), а также влияние «возраста памяти» - если напоминание происходит через 45 дней после обучения, то блокада NO-синтазы не влияет на сохранение памяти (Baratti и

др., 2008). Однако в экспериментах с локальным введением блокатора L-NNA в миндалину показан эффект только на обучение, но не на реактивацию памяти (Zinn и др., 2009). Также в процессах консолидации памяти во время пассивного избегания играют роль другие участники NO-зависимого сигнального пути – гуанилатциклаза и протеинкиназа G (Komsuoglu-Celikyurt и др., 2011; Zinn и др., 2009). В работе (Zinn и др., 2009) также показано, что дополнительная активизация NO-зависимого сигнального каскада с помощью L-аргинина, донора оксида азота и аналога цГМФ увеличивает время, проведенное животным на платформе после обучения.

Исследование влияния блокады синтеза оксида азота на угашение памяти также показало неоднозначные данные. В экспериментах с условно-рефлекторным замиранием на звук показано, что L-NAME нарушает угашение только в том случае, если процедура обучения и угашения памяти проводилась в разной обстановке, при этом последнее тестирование должно было проводиться также не в обучающей камере (то есть эффект обнаружен в комбинации контекстов АВВ, но не ААА или АВА) (Luo, Han, Tian, 2014).

Нокаутирование гена нейрональной NO-синтазы, на первый взгляд, сходным образом нарушает условно-рефлекторное замирание в ответ на контекст и на предъявление зрительного стимула, однако не влияет на условно-рефлекторный страх на звуковой стимул (Kelley и др., 2009; Kelley и др., 2011). Увеличение количества предъявлений ударов тока в сочетании с условным стимулом восстанавливало память на обстановку, но не на отдельный зрительный стимул у таких мышей (Kelley и др., 2011). Интересно, что ингибитор гистондеацетилазы бутират натрия восстанавливал долговременную (1-7 дней), но не кратковременную (1 час) обстановочную память у мышей с нокаутом по гену *Nos1*, что может свидетельствовать о роли оксида азота в регуляции транскрипции генов во время обучения (Itzhak и др., 2012).

Интересно, что в другом тесте пассивного избегания – темно-светлой камере, показано достоверное влияние оксида азота в гиппокампе только на

кратковременную, но не долговременную память (Vöhme и др., 1993; Harooni и др., 2009), хотя в некоторых экспериментах наблюдалась тенденция к снижению времени избегания животных и через 24 часа после обучения при введении вещества до обучения (Harooni и др., 2009).

Ряд данных о роли оксида азота в обучении и памяти с отрицательным подкреплением показан в экспериментах на брюхоногих наземных моллюсках в нашей лаборатории и в лаборатории Х.Л.Гайнутдинова (Balaban и др., 2014; Korshunova TA, Balaban PM, 2014; Балабан, Рошин, Коршунова, 2011). Показано, что блокада NO-синтазы вызывает нарушение обучения, связанное с распознаванием опасной (в которой улитку били током) и неопасной обстановки (Korshunova TA, Balaban PM, 2014; Балабан, Рошин, Коршунова, 2011). Также блокада NO-синтазы препятствует забыванию сформированной памяти, вызванной блокадой синтеза белка при напоминании (Balaban и др., 2014; Балабан, Рошин, Коршунова, 2011). Кроме забывания, блокада синтеза оксида азота препятствует переучиванию улиток, которое заключается в том, что восприятие опасной обстановки меняется на безопасное при сочетании с положительным подкреплением, в частности, с предъявлением пищи (Балабан, Рошин, Коршунова, 2011). Таким образом, можно предположить, что оксид азота необходим не только для формирования памяти, но также для ее изменения при напоминании или переобучивании.

Обучение с положительным подкреплением

В отличие от отрицательного подкрепления, формирование ассоциации между условным стимулом или окружающей обстановкой и положительным подкреплением обычно требует их многократного сочетания. И хотя существует мнение, что такое обучение сопряжено с более низким уровнем стресса, успешное обучение в данных экспериментах обычно сопровождается достаточно длительным (иногда – до нескольких дней) ощущением недостатка. Поскольку в качестве подкрепления обычно используется пища или жидкость, то для успешного обучения у животного вызывают состояние голода или жажды.

В ранних работах показано, что оксид азота **не** участвует в оперантном обусловливании, при котором навык формируется благодаря многократному сочетанию условного и безусловного стимула (в данном случае положительного подкрепления – еды или воды) у крыс (Кнеппер, Kurylo, 1998; Tobin и др., 1995).

Пространственное обучение

Влияние синтеза оксида азота показано в экспериментах с пространственным обучением в водном бассейне (Moosavi и др., 2014). При этом показано, что введение неспецифического блокатора NO-синтазы L-NAME до и после обучения, а также до напоминания увеличивает время и дистанцию поиска скрытой платформы по сравнению с контрольной группой. В то же время блокада NO-синтазы предотвращала фосфорилирование CaMKII и ERK, вызванное данными поведенческими процедурами. В другом исследовании в бассейне Морриса показано, что обучение приводит к NO-зависимому повышению Ca²⁺-кальмодулин-независимой активности CaMKII (Tan, 2009). Эти данные свидетельствуют о том, что оксид азота во время пространственного обучения может регулировать активность таких важных для памяти ферментов, как кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа II, а также ERK (Moosavi и др., 2014; Tan, 2009).

В заключение данного подраздела о роли оксида азота в синаптической пластичности и памяти стоит обратить внимание, что блокада NO-синтазы оказывает неоднозначный эффект, и его иногда можно обнаружить только при совместном действии с другими веществами, например, ингибиторами NMDA-рецепторов. Также стоит отметить, что эффект блокады NO-синтазы иногда зависит от концентрации так, что разные концентрации приводят к различным результатам. Такие данные приводят к предположению, что оксид азота участвует в различных механизмах синаптической пластичности, при этом, возможно, даже разнонаправленном. Возможно, подсказка может скрываться в экспериментах на беспозвоночных животных. Так, ранее было показано, что блокада NO-синтазы предотвращает нарушение памяти во время напоминания, вызванное блокадой

синтеза белка на брюхоногих наземных моллюсках (Balaban и др., 2014; Балабан, Рошин, Коршунова, 2011). Сходный эффект был обнаружен в экспериментах на аплии, в которой блокада распада белков в протеасомах предотвращала нарушение клеточной модели памяти под действием блокады синтеза белка во время напоминания (Lee и др., 2012).

3.2. Роль убиквитин-зависимого распада белков в обучении и памяти

Показано, что обучение условно-рефлекторному страху приводит к зависимому от НМДА-рецепторов увеличению убиквитинирования белков в миндалине (Jarome и др., 2011). Кроме того, блокада протеасом сразу после обучения нарушает консолидацию памяти у крыс, мышей, а также у краба *Chasmagnathus* (Jarome и др., 2011; Sol Fustiñana и др., 2014), хотя в некоторых экспериментах влияния блокады протеасом на консолидацию не было обнаружено (Lee и др., 2008).

Сочетание поведенческих экспериментов с последующим анализом биохимических изменений вестерн-блотом показало, что обучение приводит к убиквитинированию и деградации трансляционного репрессора MOV10 (Jarome и др., 2011). В культуре нейронов показано, что деградация белка MOV10 после стимуляции с помощью деполяризующего агента хлорида калия приводит к локальному увеличению трансляции белков в дендритах (Banerjee, Neveu, Kosik, 2009). Таким образом, обучение, как и ДВП в срезах, может приводить к убиквитин-зависимой деградации трансляционных регуляторов, то есть распад белков в протеасомах регулирует локальный синтез белков.

В ряде исследований была изучена роль убиквитинлигазы APC/C в синаптической пластичности и памяти. APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) хорошо известна своим участием в клеточном делении, однако о ее роли в постмитотических клетках известно меньше. Данная убиквитинлигаза состоит из 12 субъединиц и ее активность контролируется белками Cdh1 или Cdc-20. Комплекс Cdc20-APC регулирует ретракцию дендритов в постмитотических нейронах (Pugan и др., 2012). Кондициональный нокаут

(conditional knockout - генетические изменения «включаются» при активации промотора) субъединицы Arc2 в возбуждающих нейронах переднего мозга приводит к нарушению угашения памяти у мышей, что свидетельствует об участии убиквитинирования белков-мишеней в процессе забывания (Kuczera и др., 2011). Полный нокаут активирующего белка Cdh1 приводит к нарушению ДВП в гиппокампе (Li и др., 2008). Однако дальнейшие исследования показали, что это нарушение связано, скорее всего, с нарушением развития гиппокампа, поскольку нокаут Cdh1 с помощью Cre-рекомбиназы под α CaMKII-промотором не нарушает долговременную потенцию в гиппокампе, хотя нарушает ее в миндалине, а также препятствует формированию условнорефлекторного страха (Pick, Malumbres, Klann, 2013).

В недавнем исследовании также было выявлено, что комплекс Cdh1-APC/C участвует в убиквитинировании белка FMRP, которое ведет к его последующей деградации. Данный процесс играет важную роль в синаптической пластичности, в частности, в долговременной депрессии, вызванной активацией метаботропных глутаматных рецепторов 1 типа (Huang и др., 2015). FMRP является трансляционным ингибитором, который препятствует локальному синтезу некоторых белков (Arc, PSD95 и других) в синапсе (Muddashetty и др., 2011; Rovozzo и др., 2016). Таким образом, активация метаботропных глутаматных рецепторов 1 типа приводит к убиквитин-зависимой деградации FMRP, что вызывает увеличение локального синтеза белков, участвующих в синаптической пластичности.

Стоит отметить, что в отличие от ДВП, одновременная блокада синтеза и распада белков в протеасомах сразу после обучения не приводит к сохранению реакции на условный стимул (Lee и др., 2008). Однако одновременная блокада синтеза и распада белков после **напоминания** как раз сохраняет условно-рефлекторный ответ, в то время как блокада только синтеза белка сразу после напоминания приводит к забыванию ранее выработанной памяти (Jarome и др., 2011; Lee и др., 2008). Кроме того, блокада протеасом во время напоминания предотвращает амнестический эффект ингибитора IKK/NF- κ B, а также

усиливающий обучение эффект ингибитора фосфатазы кальцинеина (Silva Da и др., 2013; Sol Fustiñana и др., 2014). Таким образом, распад белков в протеасомах вовлечен в сигнальные пути, участвующие в консолидации и реконсолидации памяти. Существует предположение, что деградация белков, зависящая от активации нейронов, приводит к дестабилизации памяти, которая таким образом становится лабильной и чувствительной к ингибиторам синтеза и другим воздействиям (Lee и др., 2008).

Наряду с работами, в которых изучалось влияние деградации белков на консолидацию и реконсолидацию памяти, были также проведены исследования влияния распада белков в протеасомах на угашение памяти (Lee и др., 2008; Мао, Lin, Gean, 2008; Ren и др., 2013). Продемонстрировано, что предъявление условного стимула без подкрепления в течение двух дней приводит к уменьшению условно-рефлекторного замирания, в то время как введение ингибиторов протеасом после таких предъявлений предотвращает угашение памяти (Lee и др., 2008). Сходное влияние ингибитора протеасом на угашение памяти показано в модели обучения с кокаиновым подкреплением (Ren и др., 2013). При этом блокада деградации белков предотвращала также снижение уровня синаптического белка NSF и GluR2-субъединицы АМПА-рецептора, вызванного процедурой угашения памяти (Ren и др., 2013).

3.3. Сравнение данных о роли оксида азота и распада белков в протеасомах в дестабилизации памяти во время напоминания.

Анализ литературы показывает, что блокада синтеза белка во время напоминания нарушает память, выработанную ранее, что свидетельствует о необходимости синтеза белка во время процесса реконсолидации. При этом, как показано ранее, блокада протеасом как у беспозвоночных, так и у млекопитающих (Jarome и др., 2011; Lee и др., 2008) предотвращает нарушение, вызванное блокадой синтеза белка. В работе (Lee и др., 2008) высказывается мысль о том, что при напоминании происходит деградация белков, которая лежит в основе дестабилизации памяти. Сходный эффект был показан в экспериментах

на брюхоногих наземных моллюсках, в которых и блокада NO-синтазы, и «захват» молекул NO с помощью скавенджера предотвращает нарушение выработанной памяти, вызванное блокадой синтеза белка во время напоминания (Balaban и др., 2014; Балабан, Рошин, Коршунова, 2011). Однако у млекопитающих подобного влияния блокады синтеза белка на реконсолидацию памяти показано не было. Более того, в работе (Chen и др., 2016) авторы указывают на то, что оксид азота не участвует в реконсолидации памяти после напоминания. Стоит отметить, что в работе (Chen и др., 2016) не проводились эксперименты с одновременной блокадой NO-синтазы и синтеза белка.

Таким образом, в соответствии с предполагаемой ролью оксида азота как агента, вызывающего дестабилизацию синаптической структуры, являющейся основой «памятного следа», нами была поставлена задача исследовать роль оксида азота в реконсолидации памяти у млекопитающих.

Задача 3: исследование роли NO-синтазы в реконсолидации памяти после напоминания у крыс в модели условно-рефлекторного замирания.

4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Эксперименты с культурой нейронов

Объектом исследования была культура нейронов гиппокампа на 17-21 день культивирования, трансдуцированная вирусом, несущим ген зеленого флуоресцентного белка GFP, конъюгированного с меткой деградации белков убиквитином^{G76V}.

4.1.1. Протокол получения культуры нейронов и трансдукция вирусом.

Перед посадкой культуры готовили следующие растворы:

Полилизин. Стоковый раствор 1 мг/мл в воде. Перед экспериментом замороженный концентрированный раствор размораживали и разводили в 10 раз водой.

Раствор ДМЕМ. К 50 мл готового раствору ДМЕМ, содержащем глутамин и глюкозу 4,5 г/л (ПанЭко, Россия), добавляли 750 мкл 1М раствора HEPES. Перед использованием охлаждали в холодильнике.

Раствор с трипсином. К 12,5 мл готового раствора ДМЕМ добавляли 10 мг трипсина, после чего раствор стерилизовали с помощью шприцевого фильтра с диаметром пор 0,22 или 0,45 мкм. Перед использованием нагревали в инкубаторе или термостате до 37°C.

Нейробазальная среда. К 48,5 мл готовой нейробазальной среды (Gibco, Neurobasal medium) добавляли 1 мл раствора B-27 и 0,5 мл GlutaMax.

В 4-луночные планшеты помещали автоклавированные стекла диаметром 12 мм. В лунки со стеклами наливали 500 мкл раствора полилизина на 20 минут, после чего 2 раза отмывали водой и один раз – раствором ДМЕМ.

Гиппокампы крысенка возрастом 0-2 дня выделяли и очищали под бинокулярным микроскопом в холодном растворе ДМЕМ, содержащем HEPES в качестве буфера.

Далее гиппокамп измельчали скальпелем и инкубировали в растворе с трипсином при 37°C в инкубаторе или термостате в течение 15 минут. После инкубирования пробирку с клетками центрифугировали 2 минуты при 2000 оборотов/мин (600g).

После центрифугирования надосадочную жидкость удаляли и добавляли 12 мл ДМЕМ комнатной температуры. Суспензию клеток пипетировали, избегая пузырьков воздуха. Центрифугировали при тех же настройках.

Далее вновь удаляли надосадочную жидкость и добавляли 5 мл готовой нейробазальной среды. После пипетирования давали осесть неразбившимся кускам ткани и переносили 1 мл в новую 15 мл пробирку. В старую пробирку добавляли новый 1 мл нейробазальной среды и повторяли процедуру 3-5 раз под визуальным контролем. После сбора клеток новую пробирку с клетками центрифугировали при прежних настройках. Получившийся осадок ресуспендировали в 2 мл нейробазальной среды и наносили на стекла по 500 мкл смеси, из которых предварительно удалили жидкость.

Планшет переносили в CO₂ инкубатор. Через 1-8 часов заменяли среду на свежую нейробазальную среду с доведением объема до 1 мл. Далее 1/3 объема среды меняли на свежую 2 раза в неделю.

На 13-14 день культивирования добавляли аликвоту вируса в лунки с клетками, предварительно разбавив ее нейробазальной средой. На следующий день после добавления вируса меняли 1/2 среды в лунках. Через 4 дня проводили эксперимент на конфокальном микроскопе.

4.1.2. Продукция вирусов

Вирусы были получены С.В.Саложиним в Лаборатории молекулярной нейробиологии. Методика их производства следующая.

Плазмиды, содержащие Ub^{G76V}-GFP, получены из Addgene (Nico Dantuma, Addgene plasmid # 11941). Конструкция UbG76V-GFP переклонирована в лентивирусный вектор p156RRLsinPPTCMVGFPPRE (подаренный Аланом Ченом) вместо EGFP. Успешные клоны проверены рестрикционным анализом и секвенированием. Трансдуцированные культуры показали очень сильную экспрессию флуоресцентного белка в глии, что мешало анализу изображений в

отростках нейронов, поэтому CMV-промотор был изменен на специфичный для возбуждающих нейронов CaMKII-промотор.

Вирусы получены с помощью кальций-фосфатного метода трансфекции HEK293T клеток в чашках Петри диаметром 100 мм. К клеткам добавлены (из расчета на 10 чашек) плазмиды: 12 µg pLenti, 7.8 µg pMDL, 4.2 µg pVSV-G, and 3 µg pRev. Через 6 часов после трансфекции, среду заменяли на раствор ДМЕМ с 10% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (FBS, fetal bovine serum) и 5 мМ бутирата натрия.

Надосадочная жидкость была собрана два раза: через 24 и 48 часов, и сконцентрирована центрифугированием при 50000g в CP80WX ультрацентрифуге. Осадок был ресуспендирован в растворе ОПТИ-МЕМ, разделен на аликвоты и заморожен при -70°C. Два микролитра концентрированной вирусной суспензии были переразведены в нейробазальной среде и добавлены в 4 лунки 24-луночной планшеты, что приводило к трансдукции большинства нейронов в поле зрения (Саложин, Большаков, 2008).

4.1.3. Проведение экспериментов с конфокальным микроскопом

Эксперименты проводились на культуре возрастом 17-21 дней после начала культивирования. Стекло с нейронами помещалось в камеру конфокального микроскопа, где ранее была включена перфузия раствором Хэнкса с температурой 32-34°C и скоростью перфузии 1,5 мл/мин. Ингибитор синтеза белка анизомицин (50µM) добавлен за 1 час до начала эксперимента для того, чтобы предотвратить синтез нового белка и исследовать распад только уже синтезированного белка. Блокатор синтеза оксида азота L-NAME (200µM) добавлен одновременно с анизомицином в экспериментальной группе. Антагонист ГАМК_A-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 μm) фотографировались каждые 5 минут в течение 40 минут.

Изображения клеточных культур анализировались с помощью программы ImageJ с использованием плагина TurboReg (<http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/turboreg/>) и статистического языка программирования R (<http://www.r-project.org>). Сначала изображения с последовательных временных точек были выровнены по трем пространственным осям для того, чтобы исключить артефакты, вызванные случайными движениями. Затем хорошо видимые отростки, не пересекающиеся с телами других клеток или мусором, были выделены как области интереса (regions of interest (ROIs)). Движущиеся по стеклу отростки также исключались, поэтому для анализа выбирались только морфологически стабильные участки. Далее были измерены средние интенсивности всех выделенных областей интереса. Значение интенсивности в первую временную точку было принято за 1,0. В ходе статистического анализа измеряли среднюю скорость падения флуоресценции. Данные были распределены нормально, поэтому анализ проведен с помощью непарного критерия Стьюдента.

4.1.4. Иммуоцитохимия

Культуры нейронов гиппокампа, выращенные на стекле в 24-луночном планшете, были зафиксированы в 4% параформальдегиде на основе PBS в течение 15 мин. Далее производилась отмывка (3 раза по 10 мин) на качающейся платформе раствором PBS с 0,1% Tween 20, после чего культуры инкубировали в блокирующем растворе (PBS; 0,1% Tween 20; 5% сыворотка козы) в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее клетки инкубировали в холодильнике с антителами на nNOS (антитела кролика против nNOS, ThermoFisher, кат.номер 61-7000) в концентрации 1:1000 в течение ночи. На следующий день первичные антитела были отмыты 3 раза и добавлены вторичные антитела против IgG кролика, конъюгированные с Alexa 488 (ThermoFisher A-11008) в концентрации 1:1000 на 1 час в комнатной температуре. 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). После 3-кратной отмывки вторичных антител стекло с культурой прикрепляли к предметному стеклу. 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

Экспрессия фермента нейрональной NO-синтазы в культуре нейронов гиппокампа определялась с помощью белкового иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга). Этапы:

Подготовка пробы

Культура нейронов гиппокампа была выращена в лунке 6-луночного планшета. На 15 день культивирования нейробазальную среду удалили и заменили на холодный PBS (1мл). С помощью чистого скребка клетки были собраны в 1,5 мл пробирку и отцентрифугированы в течение 3 минут при 700g и 4°C. После удаления надосадочной жидкости клеткам были добавлены 25 мкл холодного PBS, после чего смесь ресуспендировали. Далее в смесь с клетками добавили 5 мкл 6-кратного буфера Лэммли. После ресуспендирования смесь нагревали при 95°C в течение 15 мин, после чего пробу заморозили на -70°C.

Полиакриламидный электрофорез

Электрофорез проводился в 10% полиакриламидном геле. Состав разделяющего геля: 2,440 мл воды, 1.5 мл Tris-HCl (1.5 М, pH=8.8), 2 мл акриамид 30%, 60 мкл SDS 10%, сразу перед нанесением 6 мкл TEMED, 60 мкл PSA (10%). Гель толщиной 0,75 мм заливали в между стеклами. После застывания разделяющего геля сверху наслаивали концентрирующий гель: - 1.4 мл воды, 250 мкл Tris-HCl (1 М, pH=6.8), 330 мкл AA 30%, 4 мкл TEMED, 40 мкл PSA (10%).

Далее стекла с гелем помещали в камеру для электрофореза, куда также добавили буфер для электрофореза: 1,525 г Трис, 7,3 г глицина, 500 мл воды, 1 г SDS. В лунки добавлены 8 мкл пробы и 5 мкл маркера (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Invitrogen). Объем маркера выровнен до 8 мкл с помощью 1-кратного буфера Лэммли. Параметры электрофореза: 100 мА, 60 В до входа проб в разделяющий гель, после чего напряжение увеличено до 160В. Время электрофореза определялось визуально по разделению цветного маркера.

Перенос на мембрану

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) и вакуумного насоса. 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 производилась в программе Image Lab Software Version 5.2.1.

4.1.5. Полупроводниковое секвенирование и биоинформатический анализ данных

Пробы с культуры нейронов были собраны с помощью ExtractRNA реагента (Евроген) и заморожены на -70 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 с помощью набора Ion Total RNA-Seq Kit v2 for Whole Transcriptome Libraries производства Ion Torrent (Life Technologies) согласно протоколу производителя. Приготовление библиотек и секвенирование проводилось Чесноковой Е.

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 rn6) 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 UCSC (<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/. В таблице с результатами представлены усредненные данные секвенирования двух культур.

4.2. Электрофизиологические эксперименты

Самцы крыс линии Вистар возрастом 6-8 недель были декапитированы с помощью гильотины, после чего мозг быстро помещен в ледяной раствор для приготовления срезов (концентрации в мМ: 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1.3 CaCl₂, 7 MgCl₂, и 10 D-глюкозы, pH поддерживается с помощью продувки газом 95% O₂ – 5% CO₂). 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 CaCl₂, MgCl₂ and D-глюкозы на концентрации 2,5, 1,3 и 25 мМ, соответственно). Срезы нагревались постепенно в 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 и температурой 32-34°C. Фокальные возбуждающие постсинаптические потенциалы записывались от радиального слоя (str.radiatum) поля CA1 гиппокампа. В данном поле расположено большое количество контактов между коллатералиями Шаффера и дендритами пирамидных нейронов поля CA1. Тестовые синаптические ответы были вызваны с помощью стимуляции коллатералей Шаффера с частотой 0,033 Гц 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 потенция 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 5 Гц). 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 потенции (Phillips, Hardingham, Fox, 2008).

Электрофизиологические данные были собраны и отфильтрованы (0,3-500 Гц) с помощью экстраклеточного усилителя DL 302P (NBlab, Россия). Данные были оцифрованы с частотой 5 кГц 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.

4.3. Поведенческие эксперименты

Объектом исследования были самцы крыс линии Вистар весом 210-370г. Крысы содержались индивидуально в отдельных клетках в виварии, в котором поддерживалась температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$ с 12-часовым циклом смены света/темноты, со свободным доступом к пище и воде. Животные приучались ежедневно в течение недели до начала эксперимента, при этом в первые дни происходило привыкание к манипуляциям экспериментаторов, затем приучались к прозрачным пластиковым переноскам, процессу переноса по лестнице в другое помещение, а также к посадке в условные камеры, роль которых в это время играли картонные коробки. Все эти манипуляции значительно снижали последующий стресс после обучения.

Исследуемые препараты и способы инъекции.

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. Для данной дозы ранее было показано, что она вызывает амнезию в экспериментах с пассивным избеганием (Díaz-Trujillo и др., 2009).

В начальных поведенческих экспериментах в качестве ингибитора NO-синтазы применялся неселективный блокатор NO-синтазы L-NAME, который был растворен в физиологическом растворе в день эксперимента в концентрации 30 мг/кг и вводился внутривентриально. В дальнейших экспериментах мы использовали селективные блокаторы нейрональной NO-синтазы.

Сильный и 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 внутривентриально в дозе 10мг/кг. Ранее показано, что эта доза нарушает память в тесте пассивного избегания (Komsuoglu-Celikyurt и др., 2011). Другой селективный ингибитор нейрональной NO-синтазы

ARL 17477 дигидрохлорид (ARL, Tocris) был также растворен в ДМСО и инъецировался внутривентрикулярно в дозе 5мг/кг. Ранее было показано, что ARL оказывает дозозависимое (0,1-10 мг/кг) влияние на ассоциативное обучение (Du, Weiss, Harvey, 2000).

Все препараты вводились сразу после напоминания (Тест1) в объеме 0,1мл/100г веса животного, при этом сначала препараты вводили внутривентрикулярно, а затем подкожно.

Поведенческая установка. Обучение проводилось в камере размером 28x30x45 см с диагональной разделяющей перегородкой. Стенки камеры образованы из прозрачного пластика, в качестве пола использовали решетку из нержавеющей стали с прутьями толщиной 3 мм (Контекст А). Электрический шок подавался на решетку с помощью источника с компьютерным управлением (PanLab, Harvard Apparatus). Предъявление звука производилось с помощью динамика на верхней крышке камеры. Камера очищалась с помощью 5%-ной уксусной кислоты после каждой крысы. Неяркое освещение обеспечено лампой (30 люкс).

Тестирование после обучения производилось в другой камере (28 × 28 × 28 см, PanLab/Harvard Apparatus), в которой оценивался уровень замирания в ответ на звук независимо от обстановки. Во время разных сессий тестирования в этой камере были созданы три разных контекста - В, С и D. Во всех тестированиях в комнате была полная темнота, освещалась лишь камера с помощью 20Вт красной лампы.

Контекст В (Тест 1, напоминание): латексное покрытие пола с наполнителем Fresh Step и белыми металлическими стенками. Камера очищалась 70%-ным этанолом после каждой крысы.

Контекст С (Тест 2, тестирование): округлая стенка из прозрачного пластика, на полу коврик с древесными опилками, для очистки камеры использовали раствор мяты (1 часть медицинской настойки мяты перечной на 90% этиловом спирте (ООО "Тульская фармацевтическая фабрика"), 15 частей 96% этилового спирта, 20 частей дистиллированной воды).

Контекст D (Тест 3, тестирование): пол покрыт полиэтиленовой воздушно-пузырчатой пленкой, для очистки камеры использовали раствор эвкалипта.

Регистрация замирания животных производилась во время эксперимента двумя экспертами, также производилась видеозапись экспериментов с помощью фотоаппарата Canon EOS 600D.

Поведенческие процедуры.

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 силой 0,4мА и длительностью 2 секунды (Тест 0). После дополнительной минуты тишины 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). Сразу после напоминания крысам вводили внутривенно и подкожно следующие растворы:

Контрольная группа: ДМСО 100% + ДМСО 1% в физиологическом растворе (n=15);

Группа СХМ (n=23): ДМСО 100% + циклогексимид 2,8 мг/кг в 1% растворе ДМСО;

Группа 3-Br-7-NI (n=12): 3-Br-7-NI в 100% ДМСО + ДМСО 1% в физиологическом растворе;

Группа 3-Br-7-NI/СХМ (n=13): 3-Br-7-NI в 100% ДМСО+ циклогексимид 2,8 мг/кг в 1% растворе ДМСО;

Группа ARL/СХМ (n=9): ARL 5мг/кг в 100% ДМСО+ циклогексимид 2,8 мг/кг в 1% растворе ДМСО.

В некоторых экспериментах были другие сочетания реагентов, см. «Исследуемые препараты и способы инъекции» и «Результаты экспериментов».

На следующий день крыс приучали к контексту С в течение 5 минут. Через 24 часа в контексте С после 2 минут тишины крысам предъявляли три последовательных звуковых условных стимула длительностью 30 секунд с интервалами 60 и 20 секунд (Тест 2).

Еще через 2 дня крысам предъявили одиночный звуковой стимул в контексте D после двух минут тишины (Тест 3).

Критерии для исключения.

Животные были исключены из поведенческих экспериментов если: 1) процент замирания в контексте был более 60% в Тестах 0 и 1, и 2) процент замирания на звук в Тесте 1 был менее 20%, в данном случае крысу считали необученной.

Обработка данных и статистический анализ.

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%). В ходе статистического анализа использовали метод Repeated Measures ANOVA с поправкой Бонферрони для множественных сравнений (при этом производилось сравнение с контрольной группой и Тестом 1). Данные представлены на графиках как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1. Экспрессии нейрональной NO-синтазы и других белков в культуре нейронов

Культура нейронов гиппокампа – один из широко применяемых объектов для изучения физиологических процессов внутри клеток благодаря, с одной стороны, их сходству (хотя и не полному) с нейронами в мозге животных, а с другой – удобству проведения различных микроскопических исследований. В настоящей работе проводилось исследование роли оксида азота в различных процессах в нервной системе, в том числе с помощью культуры нейронов и конфокальной микроскопии. Поскольку данных об экспрессии NO-синтаз в культуре нейронов немного (Dawson и др., 1993; Mahairaki и др., 2009), мы провели анализ экспрессии этих ферментов в нашей культуре гиппокампа крыс линии Вистар с помощью различных методов.

Полупроводниковое секвенирование транскриптома культуры нейронов гиппокампа крысы

Исследование экспрессии различных генов с помощью глубокого секвенирования является одним из наиболее удобных методов исследования, который дает широкую картину представленности различных транскриптов (матричной и другой РНК) в тех или иных объектах. В настоящей работе мы провели секвенирование культуры нейронов гиппокампа и обнаружили экспрессию многих нейрональных и других генов, в том числе генов NO-синтазы (Табл.1).

Обнаружено, что среди NO-синтаз в основном экспрессируется нейрональная NO-синтаза (Nos1). Фрагменты мРНК эндотелиальной NO-синтазы (Nos3) представлены гораздо меньше, чем мРНК Nos1, на основе данных FPKM. 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 (Табл.1).

Кроме того, в таблице показаны данные для некоторых других белков, участвующих в NO-зависимом сигнальном пути и убиквитин-зависимом распаде белков (Табл.1).

Таблица 1. Экспрессия различных мРНК в культуре нейронов гиппокампа по данным полупроводникового секвенирования (на основании секвенирования двух культур).

Транскрипт	Название транскрипта	Описание кодируемого белка	Относительное содержание мРНК в культуре на основе FPKM
NM_052799	Rattus norvegicus nitric oxide synthase 1 (Nos1), mRNA	Нейрональная NO-синтаза	12.5
NM_012611	Rattus norvegicus nitric oxide synthase 2 (Nos2), mRNA	Индукцибельная NO-синтаза	0
NM_021838	Rattus norvegicus nitric oxide synthase 3 (Nos3), mRNA	Эндотелиальная NO-синтаза	0.2
NM_138895	Rattus norvegicus ubiquitin B (Ubb), mRNA	Убиквитин В	2417
NM_017314	Rattus norvegicus ubiquitin C (Ubc), mRNA	Убиквитин С	83.4
NM_031149	Rattus norvegicus proteasome 26S subunit, ATPase 5 (Psmc5), mRNA	Белок Rpt6 регуляторной субчастицы протеасомы	81.9
NM_001105727	Rattus norvegicus proteasome subunit beta 5 (Psmb5), mRNA	Белок каталитической субчастицы протеасомы β 5, обладающий химотрипсин-подобной активностью	169.8
NM_053532	Rattus norvegicus proteasome subunit beta 7 (Psmb7), mRNA	Белок каталитической субчастицы β 2, обладающий трипсин-подобной активностью	63.6
NM_057099	Rattus norvegicus proteasome subunit beta 6 (Psmb6), mRNA	Белок каталитической субчастицы β 1, обладающей каспаза-подобной активностью	25.3
NM_012708	Rattus norvegicus proteasome subunit beta 9 (Psmb9), mRNA	Белок каталитической субчастицы β 1i, обладающей каспаза-подобной активностью (также наз. LMP2,	49.5

		RING12)	
NM_080767	Rattus norvegicus proteasome subunit beta 8 (Psm8), mRNA	Белок каталитической субчастицы протеасомы $\beta 5i$, обладающий химотрипсин-подобной активностью (также наз. LMP7, RING10)	11.6
NM_001025637	Rattus norvegicus proteasome subunit beta 10 (Psm10), mRNA	Белок каталитической субчастицы $\beta 2i$, обладающий трипсин-подобной активностью (также наз. LMP10)	86.3
NM_012920	Rattus norvegicus calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha (Camk2a), mRNA	Кальций-кальмодулин зависимая протеинкиназа 2	316.4
NM_012574	Rattus norvegicus glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B (Grin2b), mRNA	Субъединица 2B NMDA-рецептора	36.3
NM_012573	Rattus norvegicus glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A (Grin2a), mRNA	Субъединица 2A NMDA-рецептора	15.9
NM_001270610	Rattus norvegicus glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1 (Grin1), transcript variant 8, mRNA	Субъединица 1 NMDA-рецептора (входит в состав NMDA-рецепторов как обязательная)	65.8
NM_019621	Rattus norvegicus discs large MAGUK scaffold protein 4 (Dlg4), mRNA	Белок постсинаптической плотности PSD-95 (также наз. DLG4)	169.6
NM_023956	Rattus norvegicus guanylate cyclase 1, soluble, alpha 2 (Gucy1a2), mRNA	Гуанилатциклаза 1, $\alpha 2$ -субъединица	5.4
NM_017090	Rattus norvegicus guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3 (Gucy1a3), mRNA	Гуанилатциклаза 1, $\alpha 3$ -субъединица	3.4
NM_001105731	Rattus norvegicus protein kinase, cGMP-dependent, type 1 (Prkg1), mRNA	Протеинкиназа G 1	0.3
NM_013012	Rattus norvegicus protein kinase, cGMP-dependent, type II (Prkg2), mRNA	Протеинкиназа G 2	1.8

Активация NO-синтазы во время деполяризации нейрона происходит благодаря входу кальция через NMDA-рецепторы, которые представляют собой тетрамеры с разным субъединичным составом. Субъединица NR1 (*Grin1*) является конститутивной субъединицей в составе NMDA-рецепторов, которая может сочетаться с другими субъединицами NMDA-рецептора. Помимо NR1, в гиппокампе в основном экспрессируются NR2B (*Grin2B*) и NR2A-субъединицы. мРНК всех этих субъединиц обнаружены при секвенировании культуры.

Заякоривание NO-синтазы к NR2B-субъединице NMDA-рецептора происходит через связывание с белком постсинаптической плотности PSD-95 с помощью PDZ-домена (Christopherson и др., 1999b). В культуре наблюдается высокая экспрессия мРНК PSD-95, что позволяет предположить, что по крайней мере часть NO-синтаз будет локализована в подмембранном пространстве дендрита, формируя полноценный ферментативный комплекс.

После синтеза NO-синтазы часть молекул NO активирует каскад NO-гуанилатциклаза-протеинкиназа G. Анализ данных секвенирования показывает низкую экспрессию мРНК белков, участвующих в данном каскаде.

Результаты секвенирования и последующей биоинформатической обработки показывают, что в культуре нейронов экспрессируются различные компоненты убиквитин-зависимого распада белков. В первую очередь, наблюдается высокая представленность мРНК гена убиквитина *Ubb*, и гораздо меньшая – гена *Ubc*. Убиквитин экспрессируется в виде пробелка с несколькими повторами, которые затем разрезаются с помощью убиквитин-специфичных протеаз (Ryu и др., 2007).

Также проведен анализ экспрессии некоторых белков, входящих в структуру протеасом. Исследование экспрессии мРНК каталитических субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, располагающихся во внутреннем кольце каталитической 20S частицы протеасомы и отвечающих за каспаза-, трипсин- и химотрипсинподобную активности, а также их индуцибельных изоформ $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ показало, что в культуре нейронов присутствует мРНК как конститутивных, так и индуцибельных изоформ. Полученные данные качественно согласуются с

результатами анализа экспрессии различных субъединиц протеасом в гиппокампе крыс линии Вистар, хотя количественное сравнение проводить нельзя из-за разных моделей и применяемых методов (Орлова и др., 2014; Радченко, 2015). Исходя из полученных данных, можно предположить, что в клетках культуры гиппокампа могут присутствовать протеасомы с разным субъединичным составом.

Биоинформатический анализ также продемонстрировал экспрессию мРНК белка Rpt6 (ген *Psmc5*), который входит в состав регуляторной 19S субчастицы протеасом. Поскольку ранее показано, что данный белок участвует в регуляции активности протеасом в нейронах, в том числе при обучении, то его экспрессия в исследуемой нами культуре нейронов также может оказывать влияние на активность протеасом (Bingol и др., 2010; Djakovic и др., 2012; Jarome и др., 2013).

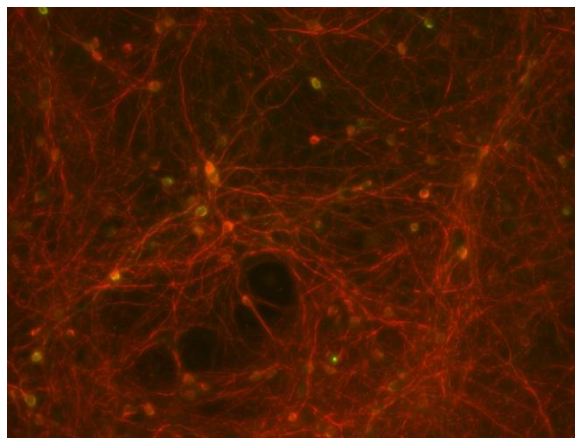
Иммуноцитохимия и вестерн-блоттинг

Экспрессию нейрональной NO-синтазы проверили также с помощью иммунофлуоресценции на конфокальном микроскопе (рис.2). На данной фотографии зеленым цветом окрашена нейрональная NO-синтаза, красным – белок микротрубочек MAP-2, являющийся маркером нейронов.

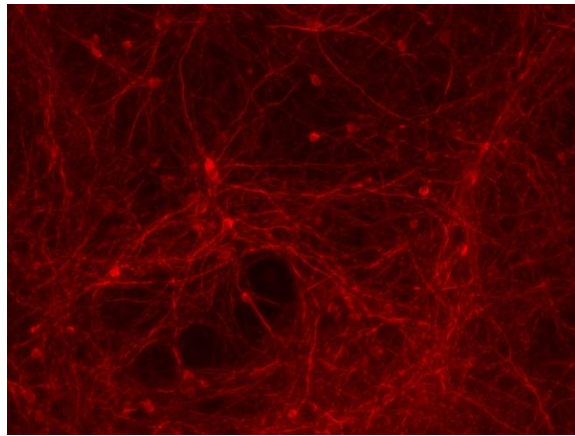
Слева изображены фотографии культуры, полученные с помощью объектива с увеличением 20x на микроскопе Keyence, справа – конфокальные изображения культуры, полученные с помощью объектива с увеличением 63x на конфокальном микроскопе LSM5 Live (Zeiss).

Судя по фотографиям, нейрональная NO-синтаза экспрессируется практически во всех телах нейронов, но с разной интенсивностью, а также во многих отростках нейронов, при этом в отростках иногда наблюдаются кластеры (рис.2).

Перекрывание изображений



Mouse MAP-2 + Anti-Mouse 546



Rat nNOS + Anti-Rat Alexa 488

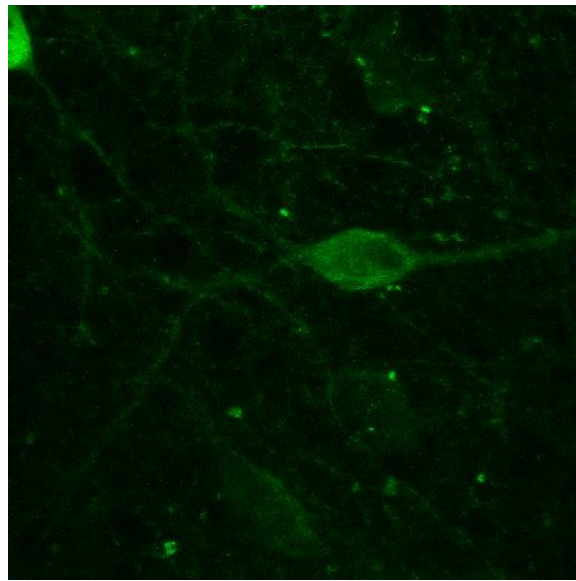
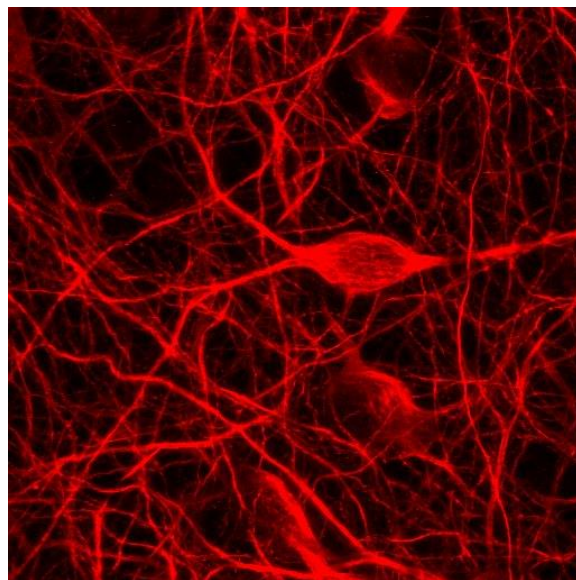
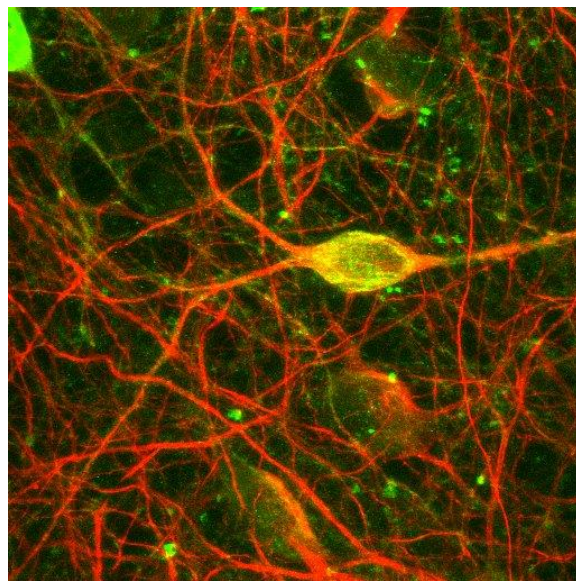
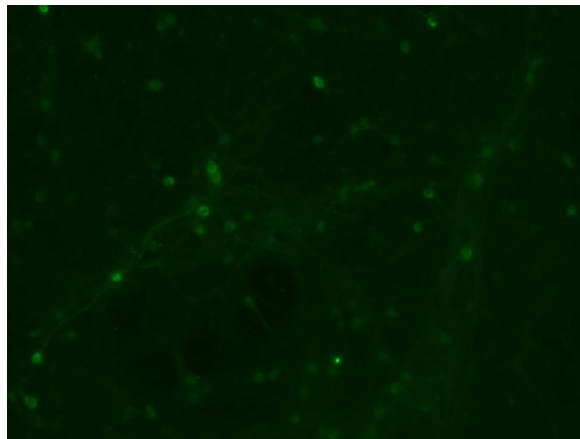


Рис.2. Иммуноцитохимическая окраска культуры нейронов гиппокампа.

Также с помощью тех же первичных антител проведено исследование с помощью вестерн-блоттинга (рис.3). Проба с лизатом культуры нейронов гиппокампа была нанесена на дорожку полиакриламидного геля, в соседнюю лунку нанесен маркер. Обнаружено окрашивание выше маркера на 140 кДа (масса нейрональной NO-синтазы 160 кДа). Таким образом, исходя из полученных данных, можно сделать вывод о высокой экспрессии нейрональной NO-синтазы в культуре нейронов.

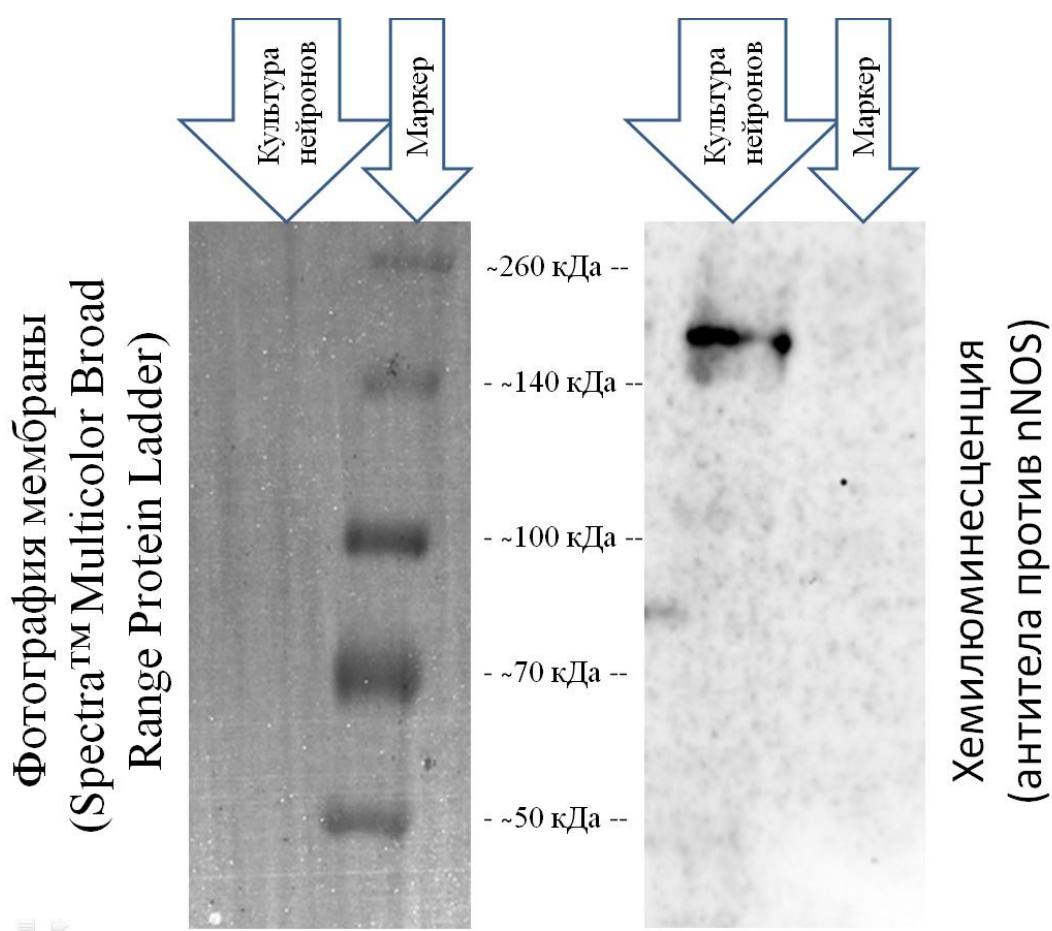


Рис.3. Вестерн блоттинг на нейрональную NO-синтазу.

5.2. 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 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.

Работа проведена совместно с Роциным М. и Саложиным С.В. 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. В аминокислотной последовательности на границе между убиквитином и GFP введена мутация (замена глицина на валин), которая предотвращает отщепление убиквитина от GFP с помощью деубиквитираз (Dantuma и др., 2000). Через несколько дней после трансдукции культуры нейронов лентивирусом, содержащим Ub^{G76V}-GFP, в телах и отростках нейронов регистрировалась флуоресценция. Для проверки жизнеспособности нейронов после трансдукции вирусом в некоторых культурах в конце эксперимента проводилась электрофизиологическая запись спайка нейрона в ответ на деполяризацию. Примеры таких спайков приведены на рис.4.

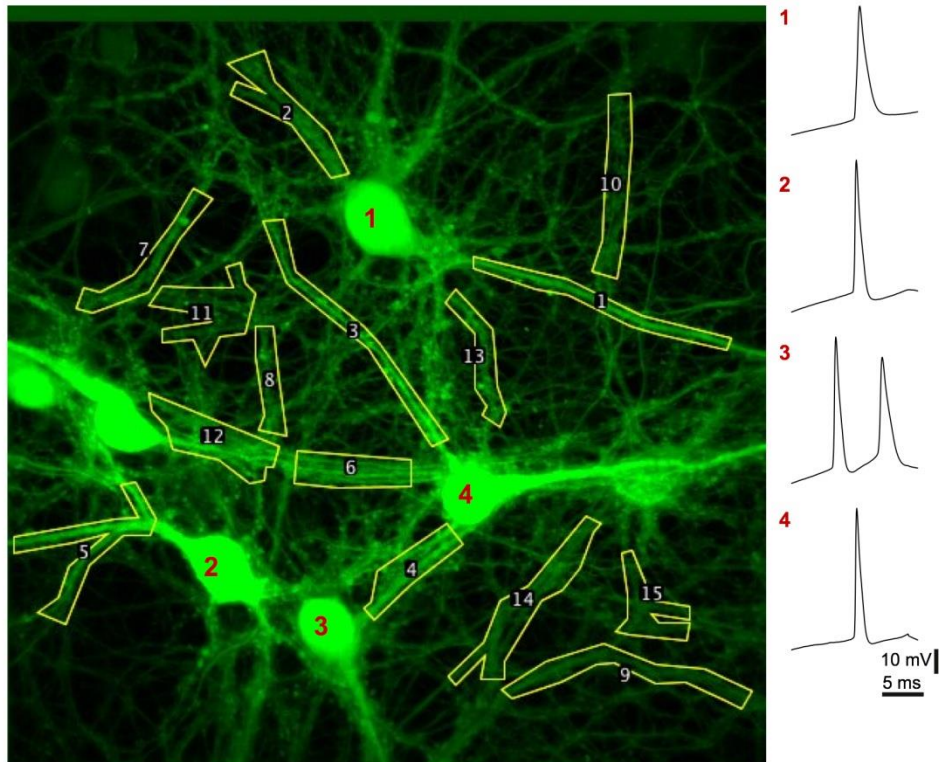


Рис.4. Культивируемые нейроны гиппокампа, экспрессирующие GFP-Ub^{G76V}. Многоугольниками выделены участки отростков нейронов, в которых производился анализ флуоресценции. Справа показаны электрофизиологические ответы нейронов на внутриклеточную деполяризацию.

Наличие убиквитина приводит к тому, что флуоресцентный белок становится мишенью для протеасом и подвергается деградации. Деградация флуоресцентного белка, в свою очередь, приводит к падению флуоресценции. Однако на флуоресценцию может оказывать влияние синтез нового белка, который, в свою очередь, может приводить к увеличению флуоресценции. Для исключения этого фактора за 1 час до эксперимента в культуру был добавлен ингибитор синтеза белка анизомицин (50мкМ), который блокирует производство белка на стадии элонгации, поэтому действует как на кЭП-зависимую, так и кЭП-независимую трансляцию белков.

Ранее было показано, что активация нейронов с помощью антагониста ГАМК_A-рецепторов приводит к увеличению скорости падения флуоресценции

фотоактивируемого Ub^{G76V}-раGFP (Djakovic и др., 2009). Также было продемонстрировано, что падение флуоресценции Ub^{G76V}-GFP и Ub^{G76V}-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_A-рецепторов пикротоксин (30 мкМ). После активации стекло с культурой помещалось в экспериментальную камеру конфокального микроскопа для регистрации флуоресцентного сигнала. Регистрация проводилась 1 раз в 5 минут в течение 40 минут (рис.5А).

В контрольной группе обнаружено, что в отростках нейронов наблюдается снижение флуоресценции по сравнению с начальной временной точкой (рис.5), что согласуется с данными литературы (Djakovic и др., 2009), в которых после добавления антагониста ГАМК_A-рецепторов наблюдалось падение флуоресценции белка. Добавление блокатора NO-синтазы L-NAME (200мкМ) приводило к достоверному снижению скорости падения флуоресценции (0.25%/мин в контрольных экспериментах (n=6) против 0.14%/мин в группе L-NAME, n=4, p<0.05, t-test) (рис.5Б). Ранее такой эффект был показан для блокаторов CaMKII, НМДА-, АМПА-рецепторов, блокатора натриевых каналов (Bingol, Schuman, 2006; Djakovic и др., 2009), при этом действие блокаторов NO-синтазы ранее не было исследовано.

Таким образом, мы впервые показали, что преинкубация с 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.

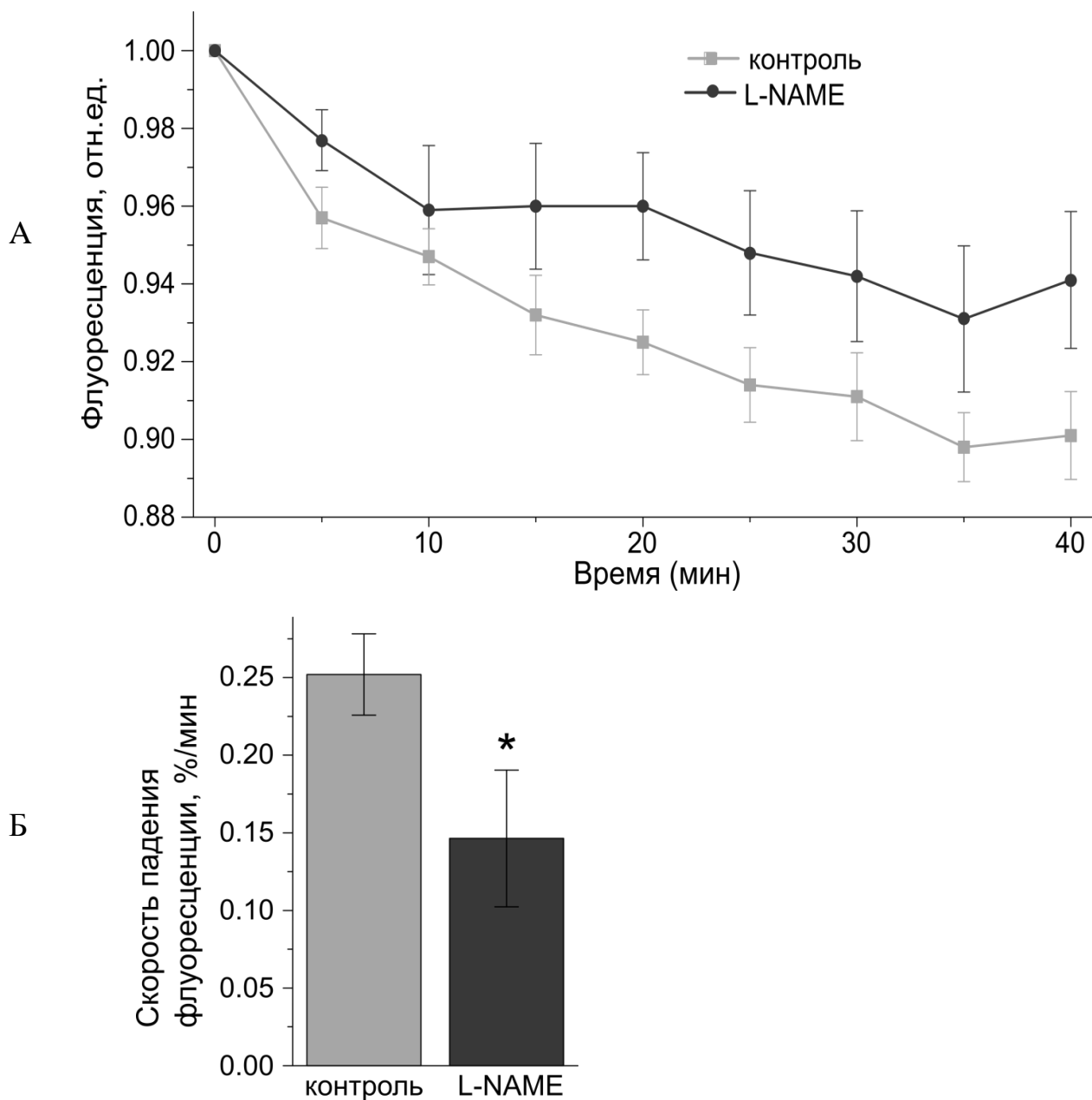


Рис.5. Динамическая регистрация флуоресценции генетически-кодируемого сенсора деградации белков в отростках нейронов гиппокампа. А. График относительного изменения флуоресценции по сравнению с начальной точкой в отростках нейронов гиппокампа. Б. Скорость падения флуоресценции в контрольной группе достоверно выше, чем в группе с добавлением ингибитора NO-синтазы L-NAME ($p < 0,05$, t-test, контроль – $n=6$, L-NAME – $n=4$).

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

Ранее было показано, 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). Для получения возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП) производилась стимуляция коллатералей Шаффера в переживающих срезах гиппокампа, регистрация производилась в районе дендритов нейронов поля CA1 (рис.6)

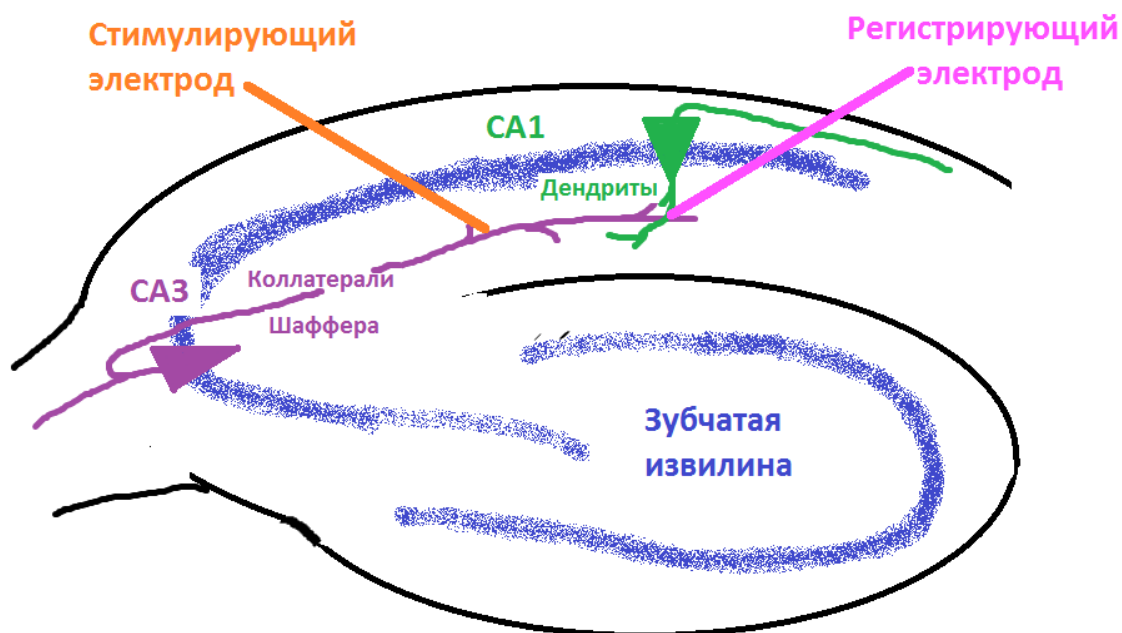


Рис.6. Схема расположения электродов в срезе гиппокампа крысы во время электрофизиологических экспериментов.

Во время записи базовой линии оценивалась стабильность амплитуды и формы ответов. При явно выраженном падении или росте амплитуды ВПСП производилась замена среза. На рис.7А показаны ВПСП одного из контрольных срезов в течение 20 минут контрольной записи до потенциации. Оценка ВПСП производится по углу наклона переднего фронта ВПСП, который отражает, в первую очередь, вклад быстрых АМПА-токов в амплитуду ответа. Поскольку основным типом регуляции амплитуды ответа является фосфорилирование/встраивание/эндоцитоз АМПА-рецепторов, то при анализе использовали скорость нарастания ВПСП. При этом выбирался наиболее прямой участок переднего фронта, и на этом участке были поставлены курсоры, расположение которых сохранялось на протяжении всего эксперимента.

Индукция долговременной потенциации производилась с помощью тета-протокола (Johnstone, Raymond, 2011), для которого ранее было показано, что он приводит к NO-зависимой потенциации (рис.8). Протокол состоял из 10 пачек 5-ти импульсов частотой 100 Гц, интервал между пачками составлял 200 мс (5 Гц – характерная частота тета-волн). Такой паттерн стимуляции повторялся 8 раз с интервалом 30 секунд. В общем стимуляцию можно представить формулой $8 \times 30 \text{ сек} \times 10 \times 200 \text{ ms} \times 5 \times 100 \text{ Гц}$. Развертка ответов дендритов на такую стимуляцию показана на рис 8.

Для увеличения вероятности деполяризации постсинаптических клеток, которая улучшает индукцию потенциации (Phillips, Hardingham, Fox, 2008), во время индукции потенциации сила стимула была увеличена в два раза, что приводит к увеличению амплитуды ВПСП и появлению противоположно-направленной волны – поп-спайка, который отражает популяционный спайк на фоне локального изменения потенциала. Форму и амплитуду ответов можно увидеть на рис. 8.В.

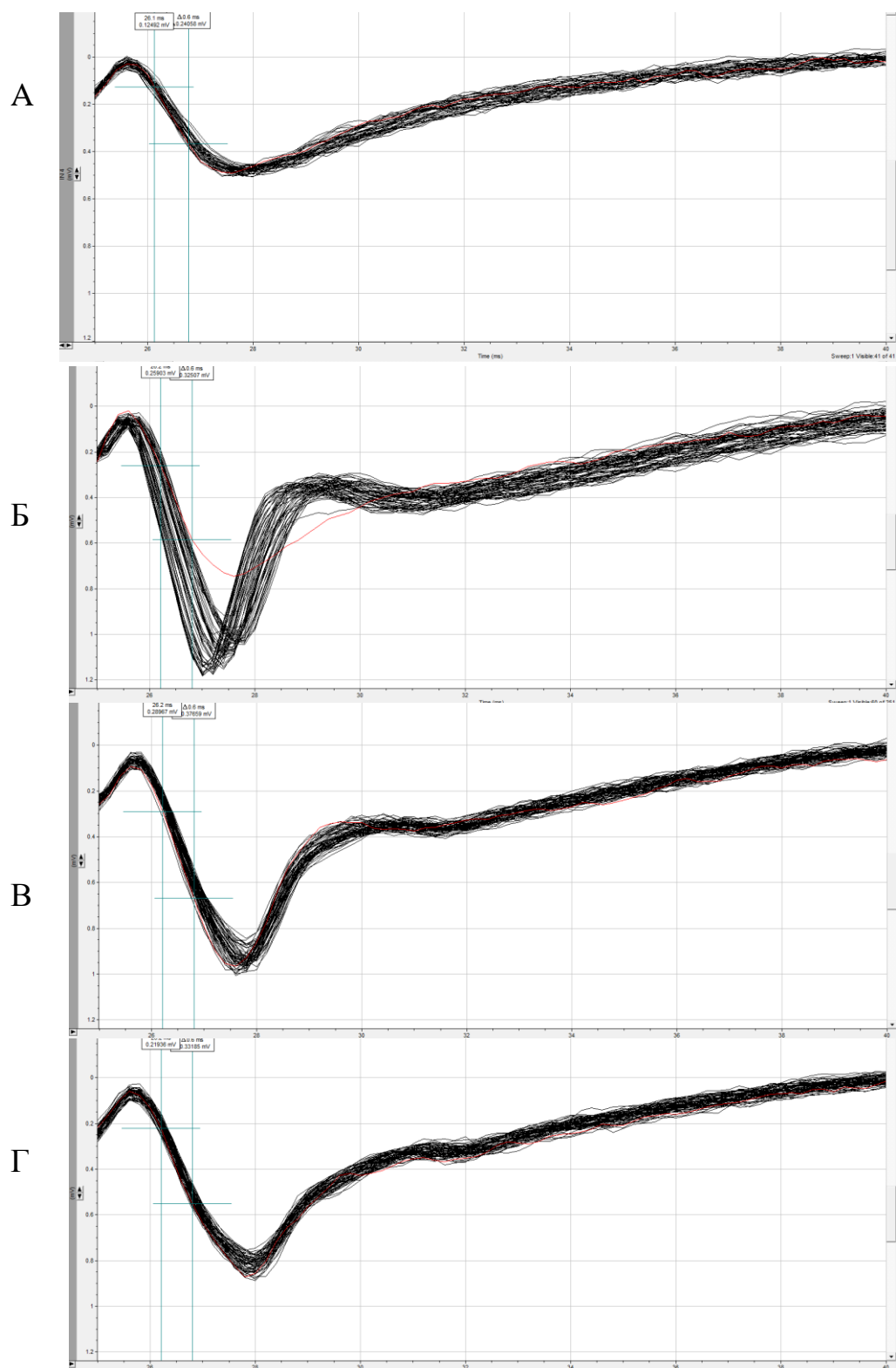


Рис.7. Возбуждающие постсинаптические потенциалы (один срез контрольной группы). А. ВПСП до потенциации. Б,В,Г. ВПСП после индукции потенциации. Б.1-30 мин.В.31-60 мин.Г.61-90 мин. Голубыми курсорами указаны промежутки, на которых определялся угол наклона ВПСП.

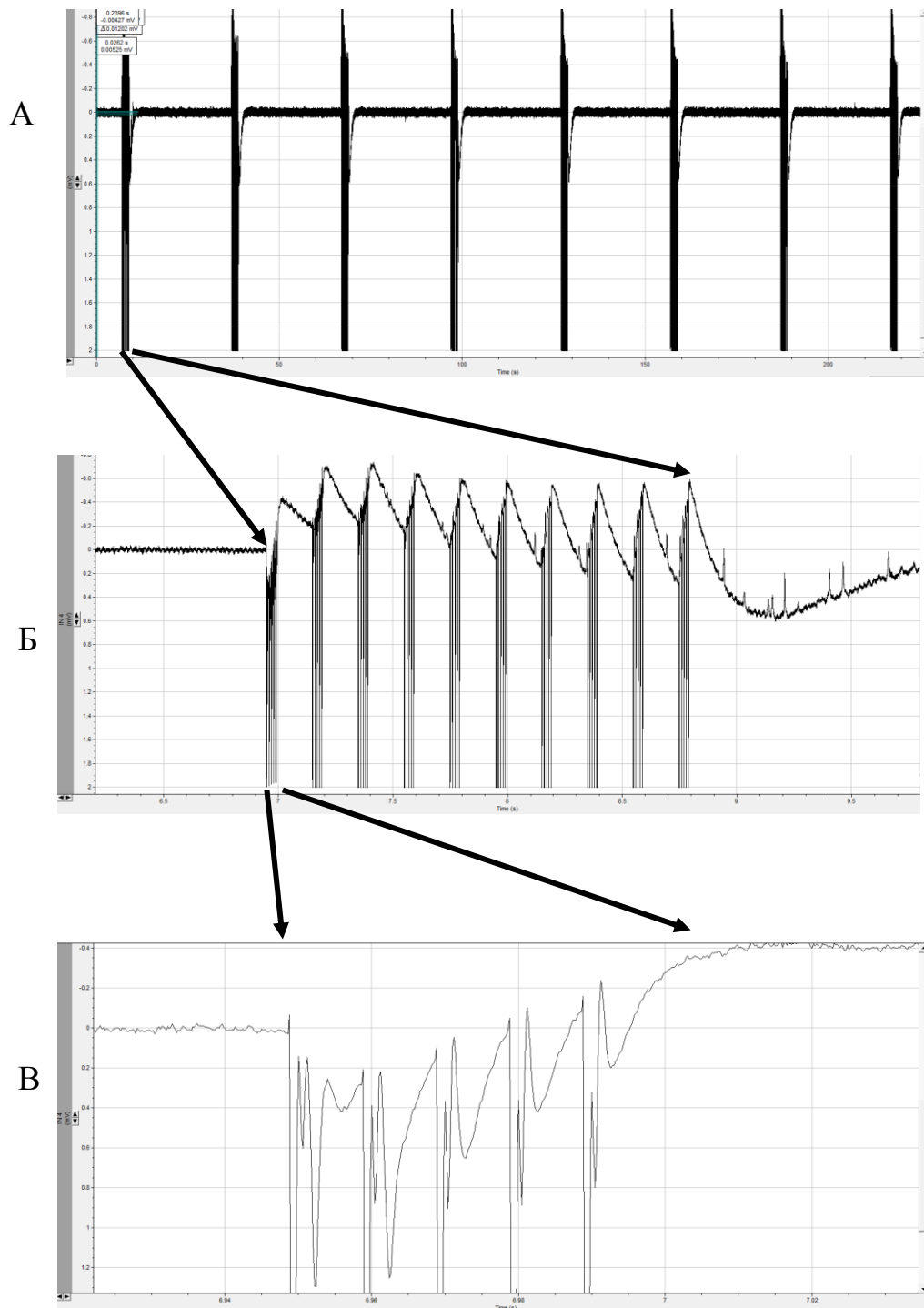


Рис.8. Тета-стимуляция для индукции долговременной потенциации в срезе гиппокампа. А. Общий план стимуляции (паттерны стимуляции с интервалом 30 с). Б. 10 пачек из 5 стимулов с интервалом 200 мс. В. Одна пачка, состоящая из 5 стимулов с интервалом 100Гц. Сила стимула увеличена в 2 раза по сравнению с базовой стимуляцией.

После индукции потенциации наблюдается увеличение амплитуды и скорости нарастания ВПСП. Также на заднем фронте можно видеть вклад поспайка. В первые полчаса амплитуда нестабильна и постепенно уменьшается, что отражается на разбросе между ответами (рис.7.Б). Далее амплитуда постепенно стабилизируется, и разброс уменьшается (рис.7.В, Г).

Срезы гиппокампа инкубировались в экспериментальной камере в течение 40 минут с ингибитором NO-синтазы L-NAME (200 мкМ) до начала электрофизиологической записи. 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 ($146 \pm 7\%$ в группе L-NAME против $180 \pm 11\%$ в контрольной группе) и 61-90-минутные интервалы ($128 \pm 8\%$ против $160 \pm 9\%$), $p < 0,05$ (рис.9, 10). Эти данные 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 анизомицина (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+анизомицин против $201 \pm 12\%$ in control group, $p > 0.05$; 31-60 мин: $175 \pm 14\%$ против $180 \pm 11\%$, $p > 0.05$; 61-90 мин: $166 \pm 16\%$ vs. $160 \pm 9\%$, $p = 0 > 0.05$, критерий Краскелла-Уоллиса) (рис.9, 10).

В полученных данных наблюдается сходная картина с экспериментами с блокаторами распада белков в протеасомах, полученными в других группах (Dong и др., 2008; Fonseca и др., 2006). То есть 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.

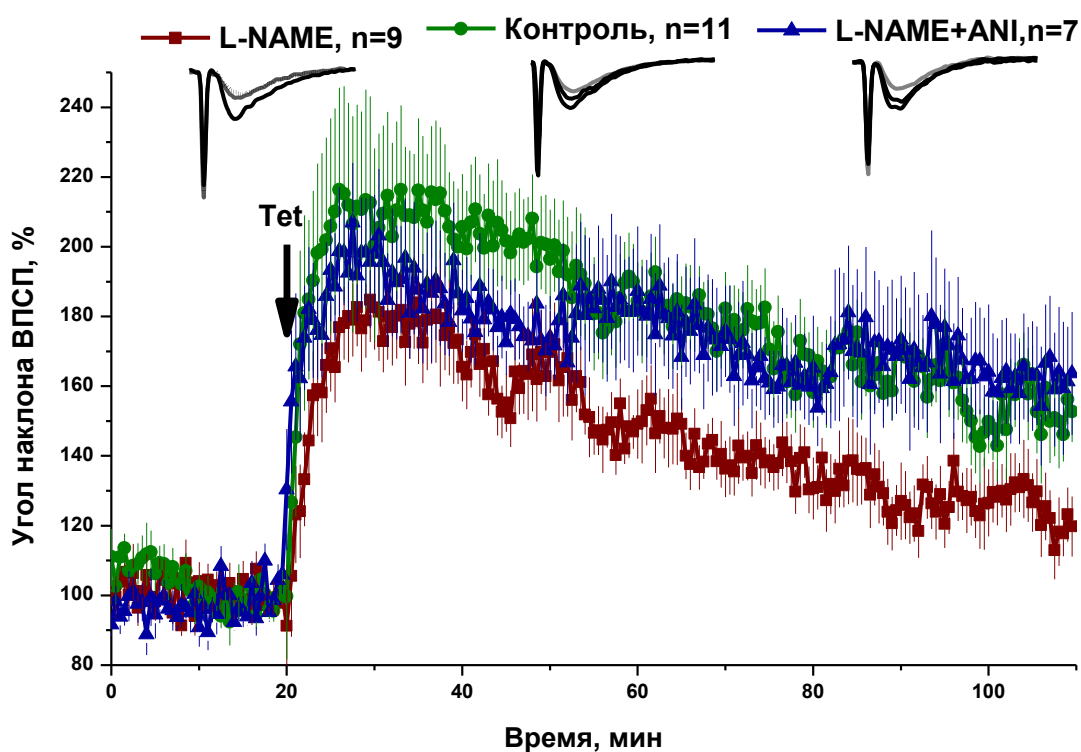


Рис.9. Долговременная потенциация в срезах гиппокампа. На графике показан угол наклона ВПСП во временной развертке в контрольной группе (зеленые кружки), в группе с блокадой NO-синтазы с помощью L-NAME (красные квадраты) и одновременной блокадой синтеза оксида азота и синтеза белка (синие треугольники).

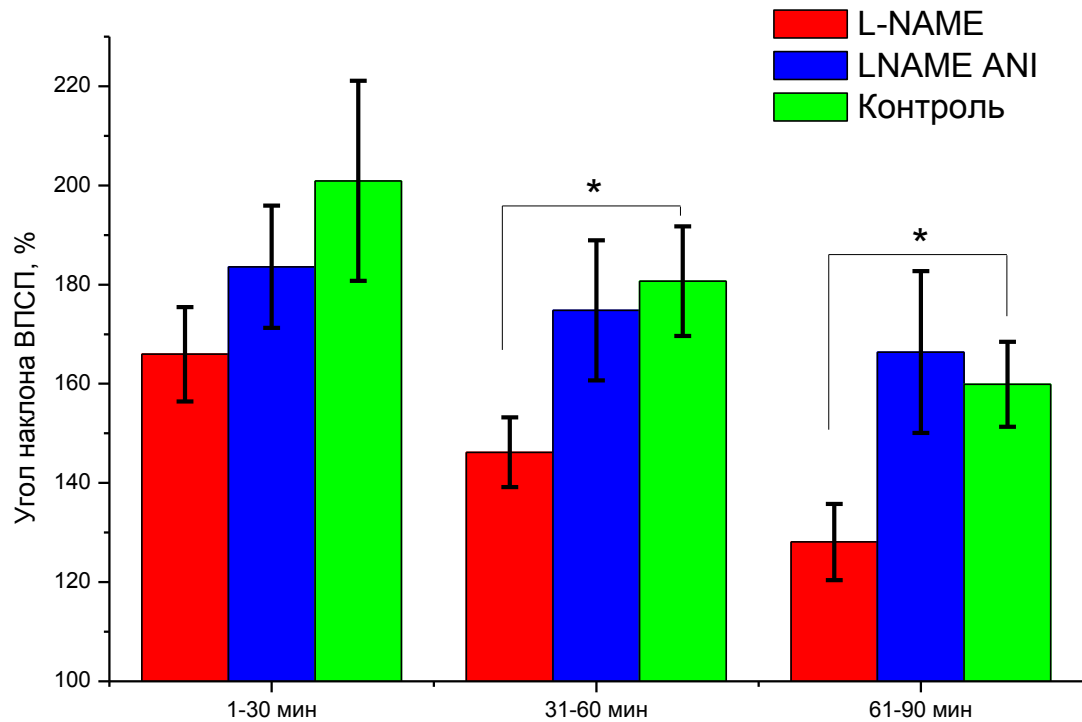


Рис.10. Анализ угла наклона ВПСП на разных временных промежутках после индукции ВПСП (1-30 мин, 31-60 и 61-90 мин). Зеленым цветом показан средний угол наклона ВПСП в контрольной группе, красным – в группе с L-NAME, синим – в группе с анннзомицином и L-NAME.

5.4. Ингибирование синтеза NO 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 приводит к сохранению памяти (Lee и др., 2008). В экспериментах в нашей лаборатории сходный эффект ранее был показан на виноградной улитке с ингибиторами синтеза белка и ингибиторами NO-синтазы (Balaban и др., 2014; Балабан, Рощин, 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 у крыс. Для экспериментов был выбран циклогексимид в качестве ингибитора синтеза белка на основе его доступности. Как и анизомицин, циклогексимид блокирует трансляцию на стадии элонгации.

Работа была выполнена совместно с Рысаковой М. П., Винарской А.Х., Зюзиной А.Б., Ивановой В.И. Для исследования влияния NO на стабильность памяти у млекопитающих мы обучили крыс согласно модели условно-рефлекторного замирания на звуковой стимул. 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 силой 0,4мА и длительностью 2 секунды (Тест 0). Через 48 часов после напоминания (Тест1, предъявление звука) им вводили либо контрольный раствор, либо блокатор синтеза белка циклогексимид (Циклогексимид; 2,8 мг/кг), либо блокатор синтеза оксида азота L-NAME

(30мг/кг), либо циклогексимид и L-NAME (рис.11). Концентрации веществ выбраны на основе работ (Díaz-Trujillo и др., 2009; Yildirim, Marangoz, 2004).

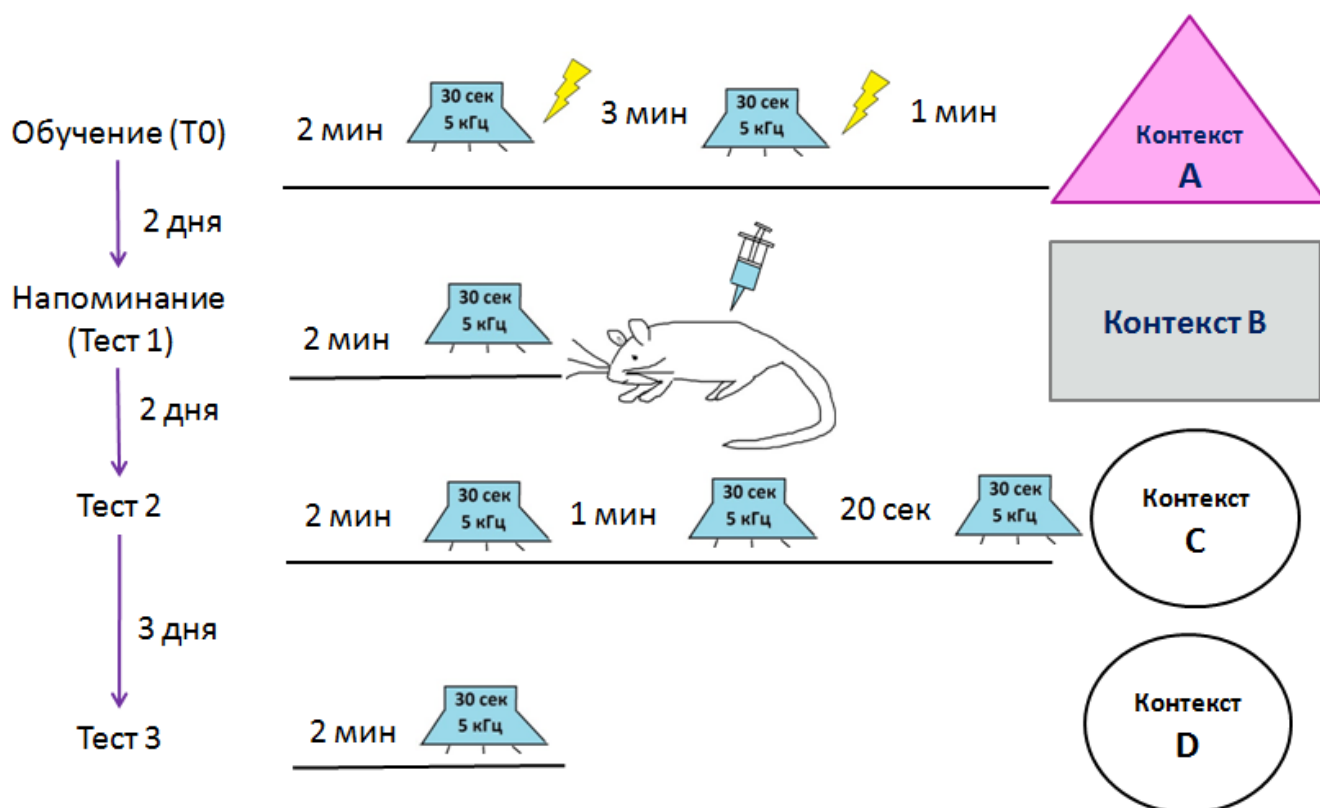


Рис.11. Протокол поведенческого эксперимента. Слева показано распределение тестов по дням эксперимента. В центре изображены предъявляемые стимулы и инъекции исследуемых веществ. Справа схематично изображены контексты, в которых проводилось тестирование поведенческих ответов (замирания животных на предъявление звукового стимула).

Введение циклогексимиды приводило к статистически значимому уменьшению замирания через 48 часов (Тест 2) после напоминания ($29,0 \pm 4,0$ %, $n=14$) по сравнению с контрольной группой ($48,6 \pm 7,8$ %, $n=14$), $p=0,036$. Блокада NO-синтазы после напоминания не вызвала статистически значимых изменений ($45,3 \pm 8,0$ %, $n=10$) (рис.12). Таким образом, мы обнаружили, что реактивация памяти при напоминании в данной модели обучения приводит к ее реконсолидации, в то время как блокада синтеза оксида азота не влияла на ранее сформированную память.

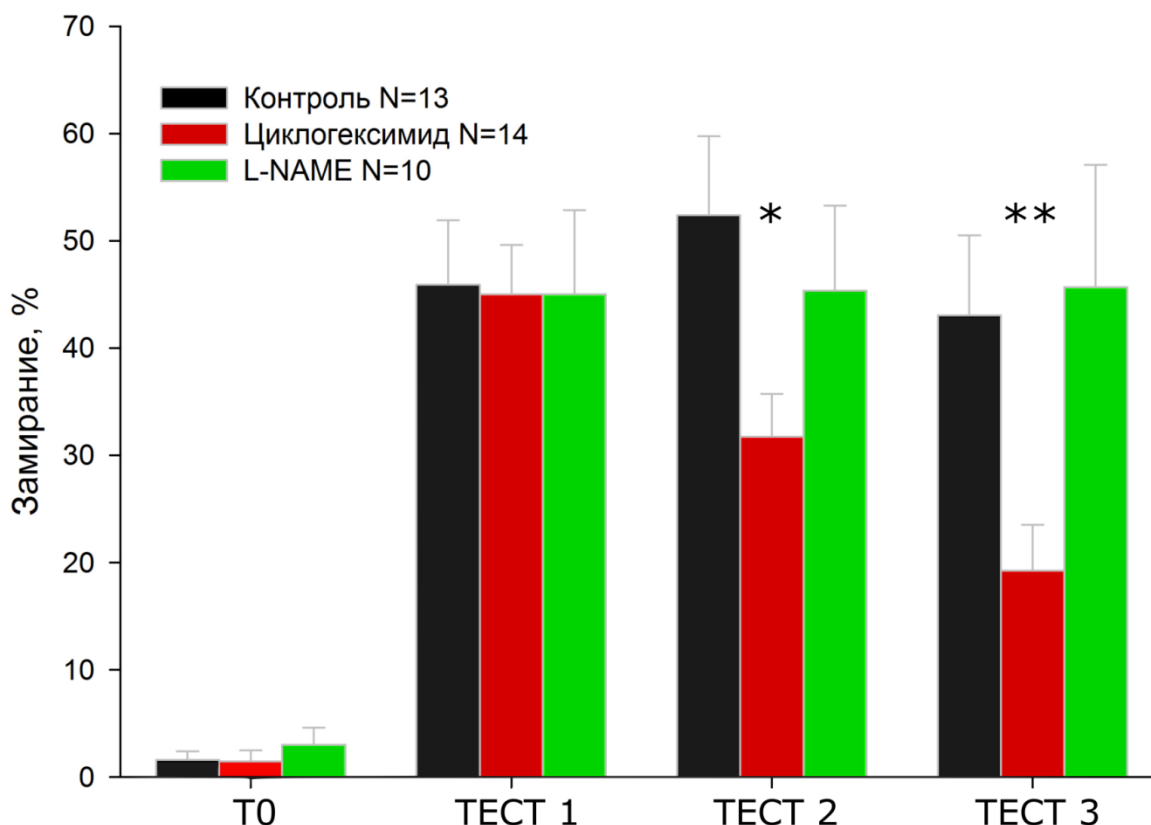


Рис.12. Исследование замирания крыс на предъявление звукового стимула в разных группах. Черным цветом показано замирание крыс на звук в группе, которым проводилась инъекция контрольного раствора сразу после напоминания (Теста1), красным – инъекция блокатора синтеза белка циклогексимида, зеленым – блокатора NO-синтазы L-NAME.

Неожиданно, в группе с одновременным введением блокаторов синтеза белка и синтеза оксида азота наблюдалась 100%-ная летальность, что не позволило нам определить влияние одновременного введения блокаторов (Табл. 2). Поскольку существуют данные о токсичном действии циклогексимида на печень (Hatori и др., 2014), мы предположили, что летальный исход может быть связан с инактивацией эндотелиальной NO-синтазы, которая в печени выполняет защитную роль (Tanai и др., 2004). Чтобы избежать летального исхода, в дальнейших поведенческих экспериментах использовали блокаторы, специфичные для нейрональной NO-синтазы.

Таблица 2. Влияние интервала между инъекциями и дозы введенных веществ на выживаемость крыс (в/бр – внутрибрюшинно, п/к – подкожное введение в холку)

Вещество 1	Временной интервал	Вещество 2	Летальная реакция/ Инъецированные	% летальности
L-NAME 30 мг/кг в/бр	1 мин	СХМ 2,8 мг/кг п/к	5/5	100
L-NAME 30 мг/кг в/бр	30 мин	СХМ 2,8 мг/кг п/к	5/5	100
СХМ 2,8 мг/кг п/к	30 мин	L-NAME 30 мг/кг в/бр	5/5	100
L-NAME 30 мг/кг в/бр	10 мин	СХМ 2,8 мг/кг п/к	5/5	100
L-NAME 10 мг/кг в/бр	10 мин	СХМ 2,8 мг/кг п/к	5/5	100
L-NAME 5 мг/кг в/бр	10 мин	СХМ 2,8 мг/кг п/к	1/5	20
СХМ 2,8 мг/кг п/к	-	-	2/31	6
L-NAME 30 мг/кг в/бр	-	-	0/10	0

В качестве блокаторов нейрональной NO-синтазы использовали 3-бromo-7-нитроиндазол (3-Br-7-NI) в концентрации 10 мг/кг (Komsuoglu-Celikyurt и др., 2011), а также ARL 17 477 дигидрохлорид (ARL) в концентрации 5 мг/кг (Du, Weiss, Harvey, 2000). Крысы также были обучены условно-рефлекторному замиранию на звук в сочетании 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 внутрибрюшинно и затем подкожно введены активные вещества (ДМСО/физ.раствор; ДМСО/циклогексимид; 3-Br-7-NI /циклогексимид; 3-Br-7-NI /физ.р-р; ARL/циклогексимид. Ранее в экспериментах (Komsuoglu-Celikyurt и др., 2011) было показано, что ДМСО не оказывает значимого влияния на консолидацию памяти.

Через два дня проводилось тестирование условно-рефлекторного замирания в камере С (Тест 2), и еще одно тестирование проводилось через 3 дополнительных дня (Тест 3). На рисунке представлен процент замирания на первый звук.

Статистический анализ с помощью Repeated Measures ANOVA показал, что во время напоминания (Тест 1) животные продемонстрировали сходный процент замирания во всех группах (Drug: $F(4.67)=0.31$, $p>0.05$), при этом во всех группах было показано достоверное увеличение процента замирания по сравнению с днем обучения (Session: $F(1.67)=528.77$, $p<0.001$). Таким образом, во всех группах наблюдалось обучение условно-рефлекторному замиранию.

Сравнения *post-hoc* с помощью теста Бонферрони (сравнение с контрольной группой и Тестом 1) показали, что уровень замирания в Тесте 2 в группе с введением циклогексимида 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 циклогексимида, в Тесте 2 ($p>0,05$) (рис.13).

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.

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 ($p=0.001$) и 3-Br 7-

NI/циклогексимид ($p=0,021$) (рис. 13). В группе животных только с блокадой нейрональной NO-синтазы (3-Br 7-NI/ физ.p-p) 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.

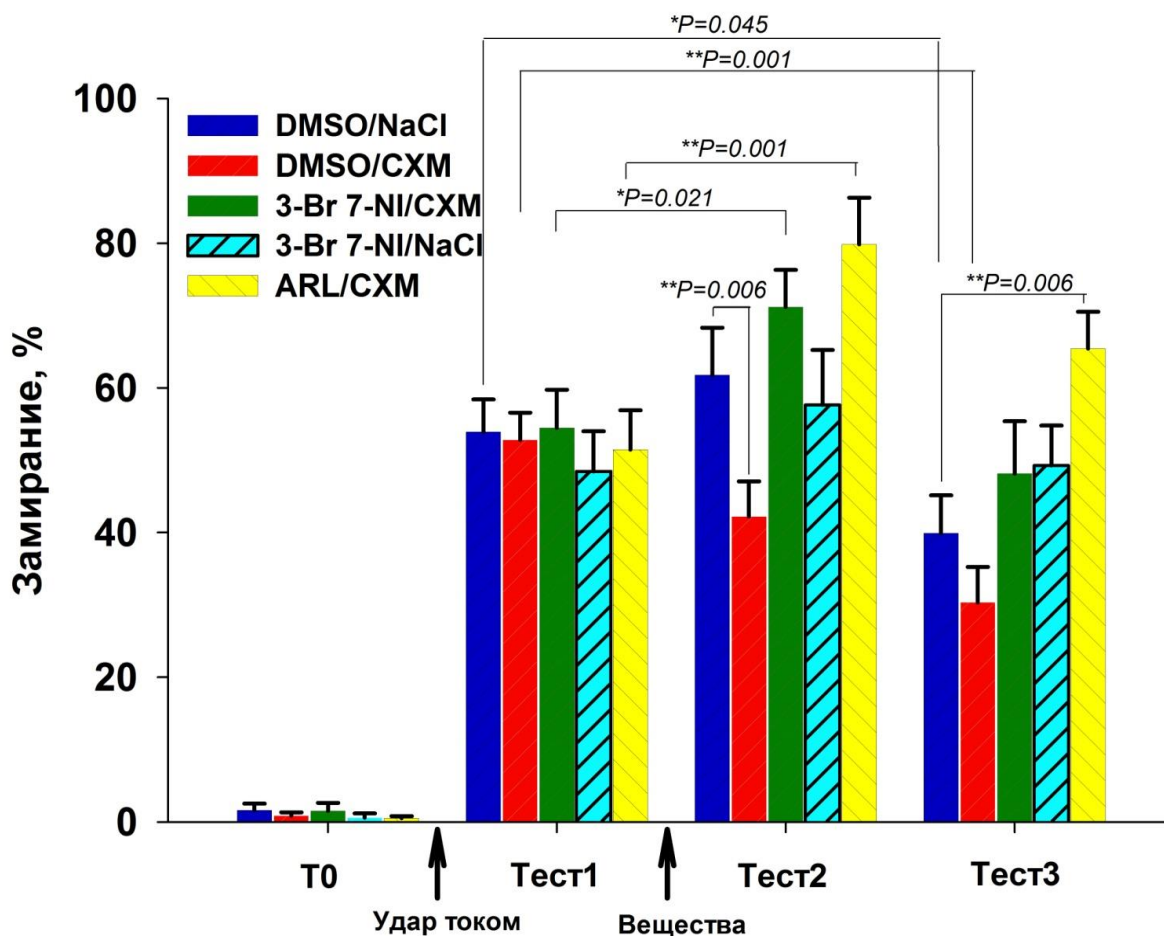


Рис. 13. Исследование замирания крыс на предъявление звукового стимула в разных группах. Синим цветом показано замирание крыс на звук в группе, которым проводилась инъекция контрольного раствора сразу после напоминания (Теста1), красным – инъекция блокатора синтеза белка циклогексимида, зеленым

– 3-Br-7-NI и циклогексида, голубым – 3-Br-7-NI, желтым – ARL и циклогексида.

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. Разброс индивидуальных изменений в уровне замирания между напоминанием (Тест1) и тестированием (Тест2) показан на рис.14.

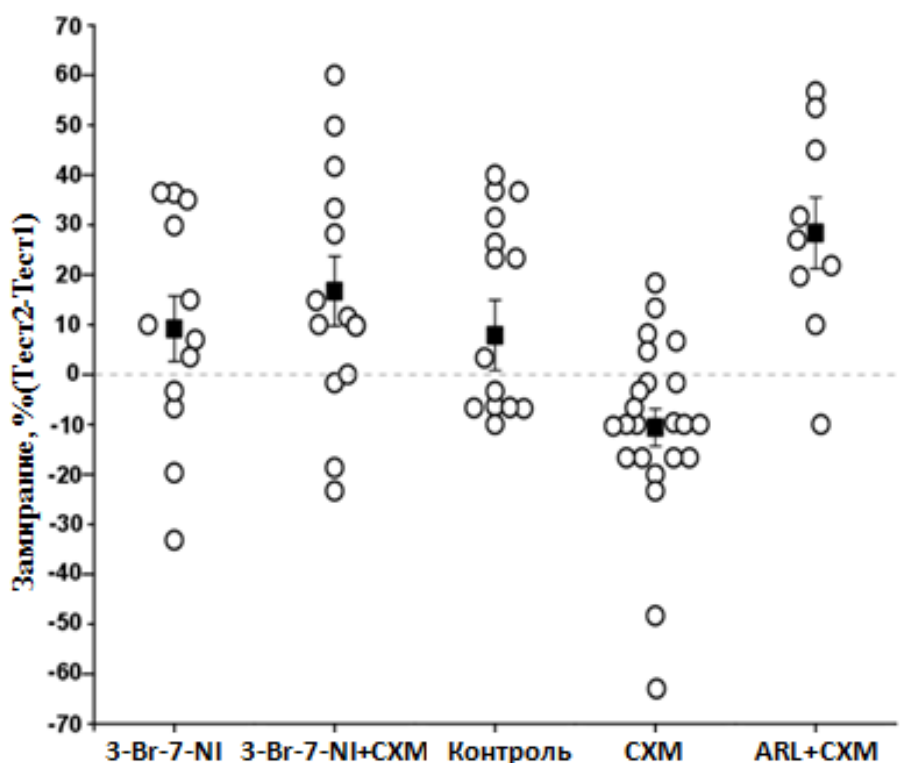


Рис. 14. Индивидуальные изменения уровня замирания в Тесте 2 по сравнению с Тестом 1 в исследуемых группах. Черными квадратами изображены медианы.

В контрольной группе видно, что у части животных уровень замирания повысился после напоминания, у другой – остался примерно на том же уровне либо немного ниже по сравнению с Тестом 1. В группе с введением циклогексимида у большей части животных наблюдается снижение уровня замирания в Тесте 1 по сравнению с Тестом 2.

Через 7 дней после обучения было проведено еще одно тестирование (Тест 3). Сравнение средних значений показало, что уровень замирания достоверно снижен в контрольной группе ($p=0,045$) и в группе с инъекцией циклогексимида ($p<0,001$) по сравнению с Тестом 1. Снижение уровня замирания даже в контрольной группе обусловлено, по-видимому, угашением памяти в ходе нескольких предъявлений условного стимула без подкрепления. Интересно, что снижения уровня замирания не обнаружено в группах 3-Br 7-NI/циклогексимид, 3-Br 7-NI/физ.раствор и ARL/циклогексимид. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что синтез оксида азота вовлечен также в процессы угашения памяти.

6. 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 блокада синтеза оксида азота снижает скорость деградации репортерного белка, конъюгированного с убиквитином (рис.5). Это свидетельствует о том, что синтез оксида азота регулирует 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 после присоединения к нему ионов 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 входящие в клетку ионы кальция могут 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.

Молекулярный состав синаптической области определяет не только форму синапса, но и его функционирование, в первую очередь, проведение ионов через рецепторы. Ионотропные рецепторы в постсинаптической мембране часто располагаются не сами по себе, а с помощью различных заякоривающих белков, а также белков, регулирующих экзо- и эндоцитоз рецепторов. В литературном обзоре настоящей работы показано, как протеасомы могут регулировать распад синаптических белков и регулировать синаптическую структуру. Поскольку мы показали, что активность убиквитин-зависимого распада белков регулируется, в том числе, с помощью оксида азота, то можно предположить, что оксид азота может регулировать структуру синапса и его функционирование.

В ряде исследований показано, что блокада активности протеасом приводит к нарушению одного из видов синаптической пластичности – долговременной потенциации (Dong и др., 2008; Fonseca и др., 2006). Долговременная потенциация заключается в длительном (от нескольких часов до нескольких дней и недель) увеличении проводимости синапса после определенного воздействия. Поздняя фаза (которая наступает через 1-3 часа), по многим данным, зависит от синтеза белка. Показано, что блокада активности протеасом нарушает поддержание поздней фазы долговременной потенциации (по поводу ранней фазы есть различные данные) (Dong и др., 2008; Fonseca и др., 2006; Karpova и др., 2006; Santos и др., 2015). При этом одновременная блокада синтеза и распада белков приводит к поддержанию поздней фазы долговременной потенциации, неотличимой от контрольных срезов (Dong и др., 2008; Fonseca и др., 2006). Можно предположить, что в данном случае наблюдается стабилизированная потенциация, в которой процессы перестройки синаптического комплекса «заморожены» ввиду блокады синтеза и распада белков, поэтому падения амплитуды после индукции долговременной потенциации не наблюдается.

Чтобы проверить, вовлечен ли оксид азота в подобную стабилизацию или дестабилизацию синаптической структуры, мы провели эксперименты с долговременной потенциацией в переживающих срезах гиппокампа крыс. По литературным данным, различные виды долговременной потенциации по-разному чувствительны к блокаде синтеза оксида азота (Padamsey, Emptage, 2013). В работе (Johnstone, Raymond, 2011) приведен протокол индукции долговременной потенциации на основе тета-пачечной стимуляции, которая чувствительна как к ингибиторам NO-синтазы, так и к блокаде синтеза белка.

В настоящей работе были проведены эксперименты с такой стимуляцией коллатералей Шаффера и регистрацией возбуждающих постсинаптических потенциалов в поле CA1 гиппокампа. Действительно, полученная потенция чувствительна к ингибиторам NO-синтазы, и уже на интервале 31-60 минут после индукции потенциации наблюдается снижение скорости нарастания амплитуды постсинаптического потенциала по сравнению с контрольными срезами, которое сохраняется до конца эксперимента (рис 9, 10). Однако одновременная блокада синтеза оксида азота и трансляции белка привела к тому, что скорость нарастания амплитуды возбуждающего постсинаптического потенциала оставалась не отличимой от контрольных срезов до конца эксперимента (1,5 часа после индукции долговременной потенциации). Как и в случае с ингибитором протеасом, можно предположить, что одновременная блокада синтеза белка и синтеза оксида азота приводит к формированию стабилизированной потенциации, которая по своим электрофизиологическим характеристикам сходна с поздней фазой долговременной потенциации.

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. По мнению ученых, при обучении происходит переход памятных следов из нестабильной формы, которая чувствительна к ингибиторам синтеза белка, в стабильную форму, которая сохраняется при введении блокаторов синтеза белка

(Anokhin, Tiunova, Rose, 2002; Artinian и др., 2008; Guzowski и др., 2000; Igaz и др., 2002; Izquierdo и др., 2006; Lin и др., 2003). Такой переход памяти из лабильной в стабильную форму называется консолидацией памяти. Однако во время реактивации памяти, которая происходит при напоминании (например, предъявлении условного стимула, обучающей обстановки и др.), память вновь становится «лабильной», то есть 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). Через некоторое время память вновь стабилизируется, и этот процесс называется реконсолидацией памяти (Anokhin, Tiunova, Rose, 2002; Artinian и др., 2008; Debiec, LeDoux, Nader, 2002; Fukushima и др., 2014; Lee и др., 2008; Murav'eva, Anokhin, 2007). В ряде исследований 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). На основании полученных данных была высказана гипотеза о том, что реактивация памяти приводит к ее дестабилизации.

Что же вызывает дестабилизацию памяти? В одном исследовании показано, что нарушение памяти можно предотвратить блокаторами GluN2B, но не GluN2A-субъединицы NMDA-рецепторов (Milton и др., 2013). Это приводит к заключению, что реактивация памяти сопровождается нейрональным возбуждением и входом ионов кальция через GluN2B-содержащие NMDA-рецепторы, которые запускают каскад внутриклеточных реакций, ведущих к дестабилизации. Также показано, что нарушение памяти под действием блокаторов синтеза белка можно предотвратить введением ингибиторов CaMKII и протеасом (Jarome и др., 2011; Jarome и др., 2016; Lee и др., 2008). Учитывая данные, что CaMKII может фосфорилировать Rpt6 субъединицу протеасом (Jarome и др., 2013), что ведет к увеличению активности последних, казалось, складывается картина дестабилизации памяти во время реактивации по схеме вход ионов кальция → активация кальций-чувствительной CaMKII-киназы → фосфорилирование протеасом → увеличение активности убиквитин-зависимого

распада протеасом→ дестабилизация синаптической структуры→ дестабилизация памяти.

Однако в нашей лаборатории ранее на брюхоногих наземных моллюсках было показано, что одновременная блокада синтеза оксида азота и синтеза белка при напоминании также приводит к сохранению памяти, которая нарушается под действием только амнестического агента - ингибитора синтеза белка (Balaban и др., 2014; Балабан, Рощин, Коршунова, 2011). Эти данные, а также результаты электрофизиологических экспериментов, полученные в настоящей работе, привели к предположению, что оксид азота также может элементом биохимической системы, активация которой приводит к дестабилизации памяти при реактивации во время напоминания и у млекопитающих животных.

Мы провели эксперименты на крысах в модели условно-рефлекторного замирания на звук и показали, что два разных специфичных ингибитора нейрональной NO-синтазы предотвращают нарушение памяти, вызванное блокадой синтеза белка во время напоминания (рис.13). Таким образом, оксид азота, синтезируемый нейрональной NO-синтазой, также является агентом, вызывающим дестабилизацию памяти. Поскольку есть данные, что NO-синтаза через PDZ домен связывается с GluN2B-субъединицей NMDA-рецепторов, а также с учетом наших данных о влиянии оксида азота на убиквитин-зависимый распад белков, то можно предположить картину событий во время реактивации памяти, изображенных на рис.15.

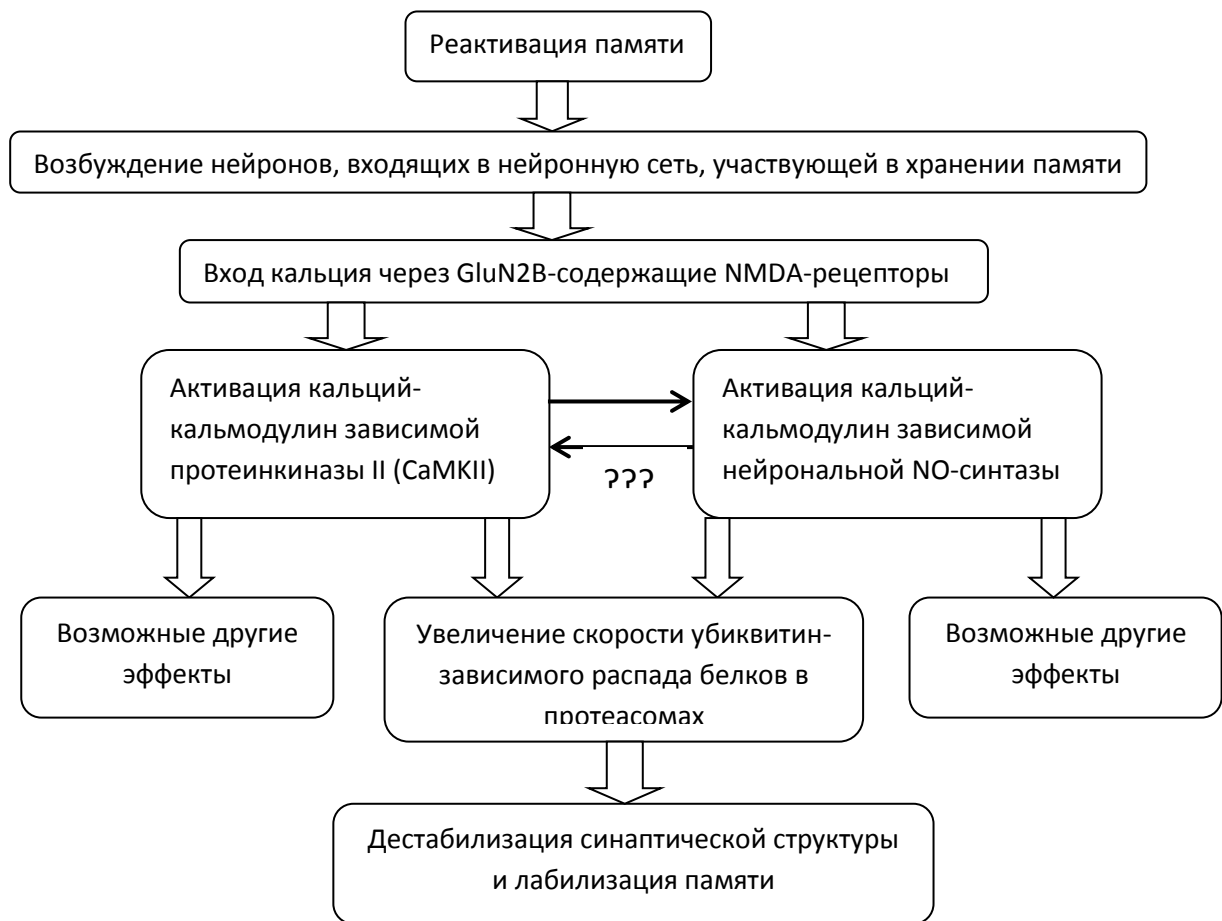


Рис.15. Предполагаемая схема молекулярных событий, вызывающих дестабилизацию памяти во время реактивации.

Из текущих данных неясно, как взаимодействуют CaMKII и NO-синтаза, зависит ли их действие друг от друга, или они активируются и действуют независимо. Однако ряд экспериментальных данных показывает, что есть вероятность их взаимного влияния. Так, в работе (Moosavi и др., 2014) показано, что блокада NO-синтазы во время обучения и напоминания в модели пространственного обучения в водном бассейне приводит к снижению фосфорилирования CaMKII. Прямое это действие или опосредованное (например, через ингибирование фосфатаз под действием оксида азота), неизвестно. Также есть данные *in vitro* о том, что оксид азота может прямо нитрозировать кальций-кальмодулин зависимую протеинкиназу II по остаткам цистеина и увеличивать кальций-независимую активность CaMKII (Coultrap, Bayer, 2014). Эта активность ниже, чем при полной активации под действием кальция, однако сохраняется более длительное время даже при отсутствии кальция. Таким

образом, можно предположить, что оксид азота может действовать на CaMKII, однако данных для полной «иерархической» картины недостаточно.

Каким образом оксид азота еще может оказывать действие на синаптическую структуру во время реактивации памяти? В настоящее время описано два основных механизма действия, с помощью которых оксид азота может оказывать влияние на внутриклеточные и межклеточные процессы. Первый, относительно хорошо изученный процесс – активация NO-зависимой гуанилатциклазы с последующим синтезом цГМФ. Синтезированный таким образом циклический гуанозинмонофосфат связывается с протеинкиназой G, что приводит к активации последней. Показано, что каскад NO-синтаза-NO-гуанилатциклаза-цГМФ-протеинкиназа G вовлечен как в формирование памяти, так и в поддержание поздней фазы долговременной потенциации (Monfort и др., 2002; Schuman, Madison, 1991; Zhuo и др., 1994; Zinn и др., 2009). При этом исследования показывают, что роль протеинкиназы G в регуляции памяти и поддержании долговременной потенциации связана, в первую очередь, с регуляцией синтеза белка (Gallo, Iadecola, 2011; Lu, Kandel, Hawkins, 1999; Ota и др., 2010b). Поскольку в наших экспериментах синтез белка был заблокирован, то мы предполагаем, что влияние оксида азота на дестабилизацию памяти не связано с активацией гуанилатциклазы. Кроме того, недавно проведенные А.Мальцевым эксперименты на другой модели долговременной потенциации (с помощью высокочастотной, а не тета-пачечной стимуляции) показывают, что блокада гуанилатциклазы не предотвращает падение амплитуды ВПСР, вызванное действием блокаторов синтеза белка, в то время как одновременная блокада NO-синтазы и синтеза белка приводят, как и в настоящей работе, к поддержанию стабилизированной потенциации (данные не опубликованы на момент написания диссертации). Таким образом, данные литературы и результаты экспериментов, полученные в недавних экспериментах в нашей лаборатории, показывают, что дестабилизация памяти и потенцированной синаптической передачи под действием оксида азота, судя по всему, не связана с каскадом гуанилатциклаза-цГМФ-протеинкиназа G.

Другим механизмом, с помощью которого оксид азота оказывает влияние на клеточные процессы, является нитрозилирование белков, в первую очередь по цистеиновым, реже – по тирозиновым остаткам. Такое нитрозилирование может приводить к изменению конформации белков с последующим изменением их ферментативной активности/структурных свойств. Выше были приведены данные о том, что нитрозилирование CaMKII может приводить к увеличению кальций-независимой, автономной активности фермента (Coultrap, Bayer, 2014). Также нитрозилирование регулирует функцию белков, ответственных за транспорт глутаматных рецепторов (Matsushita и др., 2003; Sossa, Beattie, Carroll, 2007). Кроме того, показано, что нитрозилирование может регулировать процессы пластичности в нейронах (Tooker и др., 2013). Таким образом, мы предполагаем, что оксид азота участвует в дестабилизации памяти путем нитрозилирования белков-мишеней, однако, конкретные белки, которые нитрозилируются во время реактивации, в настоящее время неизвестны, и являются предметом будущих исследований.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа была посвящена изучению роли оксида азота в синаптической пластичности и деградации белков в нейронах. Синаптическая пластичность – это один из процессов, который обеспечивает изменчивость реакций живых организмов, обладающих нервной системой, на внешние сигналы. В свою очередь, синаптическая пластичность зависит от перестроек внутри нейронов и синапсов на молекулярном уровне. Эти процессы являются мишенью для регуляции с помощью сигнальных систем.

Одним из участников сигнальных каскадов внутри и между клетками является оксид азота. В настоящей работе продемонстрировано, что оксид азота принимает участие в регуляции деградации белков. Ранее было показано, что оксид азота регулирует синтез белков в нейронах. Таким образом, маленькая газообразная молекула оказывает влияние на различные внутриклеточные процессы, обеспечивая локальные молекулярные перестройки внутри клеток.

Такое разнонаправленное действие на молекулярном уровне оказывает свой эффект на более высоких уровнях организации. В настоящей работе показано, что одновременная блокада синтеза оксида азота и синтеза белка приводит к стабилизации долговременной потенциации. Более того, эффект блокады синтеза оксида азота проявляется даже на поведенческом уровне. В частности, мы показали, что оксид азота является фактором, запускающим реконсолидацию памяти во время напоминания.

Таким образом, в настоящей работе мы исследовали роль оксида азота в различных процессах в нервной системе на разных уровнях организации. Как и многие исследования, настоящая работа, с одной стороны, помогает понять некоторые противоречия, обнаруженные ранее в предшествующих работах, и с другой – открывает пути для дальнейшего исследования роли оксида азота в физиологических и патофизиологических условиях.

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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает сердечную благодарность за неоценимый вклад и поддержку в ходе выполнения настоящей работы руководителя диссертационной работы Павла Милославовича Балабана, а также соавторов опубликованных по теме диссертации статей Рощина Матвея, Саложина Сергея Владимировича, Винарскую Алию Халиловну, Рысакову Марию Павловну, Зюзину Алену Борисовну, Иванову Виолетту Игоревну. Также благодарю коллектив сотрудников лаборатории клеточной нейробиологии обучения, молекулярной нейробиологии и функциональной биохимии нервной системы за критические замечания в ходе выполнения настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабан П.М., Рошин М., Коршунова Т.А. Двуликий оксид азота необходим и для стирания памяти и для формирования памяти // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова. 2011. Т. 61. № 3. С. 274–280.
2. Баль Н.В., Балабан П.М. Убиквитин-зависимый распад белков необходим для долговременной пластичности и памяти // Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 4. С. 275–284.
3. Бунеева О.А., Медведев А.Е. Убиквитин-протеинлигаза паркин: роль в развитии болезни паркинсона // Биохимия. 2006. Т. 71. № 8. С. 1050–1061.
4. Кудряшова И.В. Молекулярные механизмы кратковременной пластичности как основа частотного кодирования: участие протеолитических систем // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 1. С. 5–15.
5. Недоспасов А.А., Беда Н.В. Биогенные оксиды азота // Природа. 2005. № 7. С. 35–43.
6. Орлова А.Ш. и др. Особенности экспрессии иммунных протеасом в развитии центральной нервной системы у крыс // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 6. С. 703–711.
7. Радченко А.Ш. Протеасомы головного мозга грызунов в раннем развитии и при функциональных нарушениях нервной системы: дисс. ... канд. биол. наук.: 03.03.01, 03.03.05 - М., // 2015.
8. Саложин С.В., Большаков А.П. Трансфекция клеток нервной системы. // Журн. высш. нерв. деят. 2008. Т. 58. № 6. С. 658–669.
9. Сорокин А.В., Ким Е.Р., Овчинников Л.П. Протеасомная система деградации и процессинга белков // Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 3–76.
10. Судоргина П.В. Участие нитергической системы прилежащего ядра и медиальной префронтальной коры в регуляции последствий формирования условнорефлекторной реакции страха: дисс. ... канд. биол. наук.: 03.03.01. - СПб., // 2016. С. 140.
11. Цимоха А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах // Цитология. 2010. Т. 52. № 4. С. 277–300.

12. Achterberg K.G. и др. Temporal and Region-Specific Requirements of α CaMKII in Spatial and Contextual Learning. // *J. Neurosci.* 2014. Т. 34. № 34. С. 11180–7.
13. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. // *Biochem. J.* 2001. Т. 357. № 3. С. 593–615.
14. Ang X.L. и др. Regulation of postsynaptic RapGAP SPAR by polo-like kinase 2 and the SCF^{??}-TRCP ubiquitin ligase in hippocampal neurons // *J. Biol. Chem.* 2008. Т. 283. № 43. С. 29424–29432.
15. Anokhin K. V, Tiunova A.A., Rose S.P.R. Reminder effects - reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. // *Eur. J. Neurosci.* 2002. Т. 15. № 11. С. 1759–65.
16. Artinian J. и др. Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation // *Eur. J. Neurosci.* 2008. Т. 27. № 11. С. 3009–3019.
17. Balaban P.M. и др. Nitric oxide is necessary for labilization of a consolidated context memory during reconsolidation in terrestrial snails // *Eur. J. Neurosci.* 2014. Т. 40. № 6. С. 2963–2970.
18. Banerjee S., Neveu P., Kosik K.S. A Coordinated Local Translational Control Point at the Synapse Involving Relief from Silencing and MOV10 Degradation // *Neuron.* 2009. Т. 64. № 6. С. 871–884.
19. Baratti C.M. и др. Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2008. Т. 89. № 4. С. 426–440.
20. Baratti C.M., Kopf S.R. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 1996. Т. 65. № 3. С. 197–201.
21. Bingol B. и др. Autophosphorylated CaMKII α Acts as a Scaffold to Recruit Proteasomes to Dendritic Spines // *Cell.* 2010. Т. 140. № 4. С. 567–578.
22. Bingol B., Schuman E.M. A proteasome-sensitive connection between PSD-95 and GluR1 endocytosis // *Neuropharmacology.* 2004. Т. 47. № 5. С. 755–763.
23. Bingol B., Schuman E.M. Activity-dependent dynamics and sequestration of

proteasomes in dendritic spines. // *Nature*. 2006. T. 441. № 7097. C. 1144–1148.
doi:10.1038/nature04769.

24. Blackshaw S. и др. Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity // *Neuroscience*. 2003. T. 119. № 4. C. 979–990.

25. Böhme G.A. и др. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. T. 90. № 19. C. 9191–4.

26. Bon C.L.M., Garthwaite J. Nitric oxide-induced potentiation of CA1 hippocampal synaptic transmission during baseline stimulation is strictly frequency-dependent // *Neuropharmacology*. 2001. T. 40. № 4. C. 501–507.

27. Bon C.L.M., Garthwaite J. Exogenous nitric oxide causes potentiation of hippocampal synaptic transmission during low-frequency stimulation via the endogenous nitric oxide-cGMP pathway // *Eur. J. Neurosci*. 2002. T. 14. № 4. C. 585–594.

28. Boultsadakis A., Georgiadou G., Pitsikas N. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on different memory components as assessed in the object recognition task in the rat // *Behav. Brain Res*. 2010. T. 207. № 1. C. 208–214.

29. Boultsadakis A., Pitsikas N. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on recognition and spatial memory deficits produced by different NMDA receptor antagonists in the rat. // *Neuropsychopharmacology*. 2010. T. 35. № 12. C. 2357–2366.

30. Bradley S.A., Steinert J.R. Nitric Oxide-Mediated Posttranslational Modifications: Impacts at the Synapse // *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2016. T. 2016.

31. Brenman J.E. и др. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains // *Cell*. 1996. T. 84. № 5. C. 757–767.

32. Burette A. и др. Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. // *J. Neurosci*. 2002. T. 22. № 20. C. 8961–70.

33. Calabrese V. и др. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. // *Antioxid. Redox Signal*. 2009. T. 11. № 11. C. 2717–39.

34. Chakroborty S. и др. Nitric Oxide Signaling Is Recruited As a Compensatory Mechanism for Sustaining Synaptic Plasticity in Alzheimer's Disease Mice // *J. Neurosci.* 2015. Т. 35. № 17. С. 6893–6902.
35. Chen W. и др. Effects of 7-nitroindazole, a selective neural nitric oxide synthase inhibitor, on context-shock associative learning in a two-process contextual fear conditioning paradigm // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2016.
36. Chen Y. и др. Hippocampal LTP triggers proteasome-mediated SPAR degradation in CA1 neurons // *Synapse.* 2012. Т. 66. № 2. С. 142–150.
37. Chetkovich D.M., Klann E., Sweatt J.D. Nitric oxide synthase-independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. , 1993.
38. Cheung Z.H., Fu A.K.Y., Ip N.Y. Synaptic roles of Cdk5: implications in higher cognitive functions and neurodegenerative diseases. // *Neuron.* 2006. Т. 50. № 1. С. 13–8.
39. Cheung Z.H., Ip N.Y. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. // *Trends Cell Biol. Biol.* 2012. Т. 22. № 3. С. 169–175.
40. Christopherson K.S. и др. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain // *J. Biol. Chem.* 1999a. Т. 274. № 39. С. 27467–27473.
41. Christopherson K.S. и др. PSD-95 Assembles a Ternary Complex with the N-Methyl-D-aspartic Acid Receptor and a Bivalent Neuronal NO Synthase PDZ Domain // *J. Biol. Chem.* 1999b. Т. 274. № 39. С. 27467–27473.
42. Chuang S.-M. и др. Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. Т. 25. № 1. С. 403–13.
43. Chung K.K.K. и др. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. // *Science.* 2004. Т. 304. № 5675. С. 1328–31. doi:10.1126/science.1093891.
44. Citri A. и др. NMDAR- and mGluR-dependent long term depression are differentially regulated by the ubiquitin-proteasome system *Ami* // *Eur J Neurosci.* 2010. Т. 48. № Suppl 2. С. 1–6.

45. Colledge M. и др. Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression // *Neuron*. 2003. Т. 40. № 3. С. 595-607-6273–1.
46. Coultrap S.J., Bayer K.U. Nitric Oxide Induces Ca²⁺-independent Activity of the Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) // *J. Biol. Chem.* 2014. Т. 289. № 28. С. 19458–19465.
47. Dantuma N.P. и др. Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. // *Nat. Biotechnol.* 2000. Т. 18. № 5. С. 538–543. doi:10.1038/75406.
48. Davis K.L. и др. Novel effects of nitric oxide // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. Т. 41. С. 203–236.
49. Dawson V.L. и др. Mechanisms of Nitric Oxide-mediated Neurotoxicity in Primary Brain Cultures // *J. Neurosci.* 1993. Т. 13. № 6. С. 2651–2661.
50. Debiec J., LeDoux J.E., Nader K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus // *Neuron*. 2002. Т. 36. № 3. С. 527–538.
51. Díaz-Trujillo A. и др. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2009. Т. 91. № 3. С. 310–314.
52. Djakovic S.N. и др. Regulation of the proteasome by neuronal activity and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II // *J. Biol. Chem.* 2009. Т. 284. № 39. С. 26655–26665. doi:10.1074/jbc.M109.021956.
53. Djakovic S.N. и др. Phosphorylation of Rpt6 regulates synaptic strength in hippocampal neurons // *J Neurosci.* 2012. Т. 32. № 15. С. 5126–5131.
54. Dobryakova Y. V., Gurskaya O.Y., Markevich V.A. Administration of nicotinic receptor antagonists during the period of memory consolidation affects passive avoidance learning and modulates synaptic efficiency in the CA1 region in vivo // *Neuroscience*. 2015. Т. 284. № August 2015. С. 865–871.
55. Dong C. и др. Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. // *Learn. Mem.* 2008. Т. 15. № 5. С. 335–347. doi:10.1101/lm.984508.
56. Dong C. и др. Proteasome Modulates Positive and Negative Translational

- Regulators in Long-Term Synaptic Plasticity // *J. Neurosci.* 2014. T. 34. № 9. C. 3171–3182.
57. Doyle C. и др. The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitro-indazole blocks both long-term potentiation and depotentiation of field EPSPs in rat hippocampal CA1 in vivo. // *J. Neurosci.* 1996. T. 16. № 1. C. 418–424.
58. Du W., Weiss H., Harvey J. a. Associative learning is enhanced by selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors and retarded by a nitric oxide donor in the rabbit. // *Psychopharmacology (Berl)*. 2000. T. 150. № JULY 2000. C. 264–271.
59. Ehlers M.D. Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. // *Nat. Neurosci.* 2003. T. 6. № 3. C. 231–242.
60. Eliasson M.J.L. и др. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: Prominent functional localizations in the brain // *Neurobiology*. 1997. T. 94. C. 3396–3401.
61. Fabri D.R.S. и др. The expression of contextual fear conditioning involves activation of a NMDA receptor-nitric oxide-cGMP pathway in the dorsal hippocampus of rats // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2014. T. 24. № 10. C. 1676–1686.
62. Feng Y., Longo D.L., Ferris D.K. Polo-like kinase interacts with proteasomes and regulates their activity. // *Cell Growth Differ.* 2001. T. 12. № 1. C. 29–37.
63. Finnie P.S.B., Nader K. The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2012. T. 36. № 7. C. 1667–1707.
64. Fioravante D., Liu R., Byrne J.. The ubiquitin-proteasome system is necessary for long-term synaptic depression in *Aplysia* // *J Neurosci.* 2008. T. 28. № 41. C. 10245–1256.
65. Fonseca R. и др. A Balance of Protein Synthesis and Proteasome-Dependent Degradation Determines the Maintenance of LTP // *Neuron*. 2006. T. 52. № 2. C. 239–245.[doi:10.1016/j.neuron.2006.08.015](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.015).
66. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: Regulation and function // *Eur. Heart J.* 2012. T. 33. № 7. C. 829–837.
67. Fukushima H. и др. Enhancement of fear memory by retrieval through

- reconsolidation // *Elife*. 2014. T. 2014. № 3. C. 1–19.
68. Gallo E.F., Iadecola C. Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G, and extracellular signal-regulated kinase. // *J. Neurosci*. 2011. T. 31. № 19. C. 6947–55.
69. Geetha T., Wooten M.W. TrkA receptor endolysosomal degradation is both ubiquitin and proteasome dependent // *Traffic*. 2008. T. 9. № 7. C. 1146–1156.
70. Gribkoff V.K., Lum-Ragan J.T. Evidence for nitric oxide synthase inhibitor-sensitive and insensitive hippocampal synaptic potentiation // *J Neurophysiol*. 1992. T. 68. C. 639–42.
71. Guix F.X. и др. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain // *Prog. Neurobiol*. 2005. T. 76. № 2. C. 126–152.
72. Guo L., Wang Y. Glutamate stimulates glutamate receptor interacting protein 1 degradation by ubiquitin-proteasome system to regulate surface expression of GluR2 // *Neuroscience*. 2007. T. 145. № 1. C. 100–109. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.11.042.
73. Guzowski J.F. и др. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. // *J. Neurosci*. 2000. T. 20. № 11. C. 3993–4001.
74. Haley J.E., Malen P.L., Paul F.C. Nitric oxide synthase inhibitors block long-term potentiation induced by weak but not strong tetanic stimulation at physiological brain temperatures in rat hippocampal slices // *Neurosci Lett*. 1993. T. 160. C. 85–88.
75. Hamilton A.M. и др. Activity-Dependent Growth of New Dendritic Spines Is Regulated by the Proteasome // 2012. T. 74. № 6. C. 1023–1030.
76. Hardingham N., Dachtler J., Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. // *Front. Cell. Neurosci*. 2013. T. 7. № October. C. 190.
77. Harooni H.E. и др. The role of hippocampal nitric oxide (NO) on learning and immediate, short- and long-term memory retrieval in inhibitory avoidance task in male adult rats // *Behav. Brain Res*. 2009. T. 201. № 1. C. 166–172.
78. Hatori A. и др. Visualization of acute liver damage induced by cycloheximide in rats using PET with [18F]FEDAC, a radiotracer for translocator protein (18 kDa) // *PLoS One*. 2014. T. 9. № 1. C. 1–9.

79. Hegde A.N. The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. // *Learn. Mem.* 2010. T. 17. № 7. С. 314–327.
80. Hell J.W. CaMKII: Claiming center stage in postsynaptic function and organization // *Neuron*. 2014. T. 81. № 2. С. 249–265.
81. Ho G.P.H. и др. S-nitrosylation and S-palmitoylation reciprocally regulate synaptic targeting of PSD-95. // *Neuron*. 2011. T. 71. № 1. С. 131–41.
82. Hong I. и др. Fear conditioning occludes late-phase long-term potentiation at thalamic input synapses onto the lateral amygdala in rat brain slices // *Neurosci. Lett.* 2012. T. 506. № 1. С. 121–125.
83. Hu R.-G. и др. The N-end rule pathway as a nitric oxide sensor controlling the levels of multiple regulators. // *Nature*. 2005. T. 437. № October. С. 981–986.
84. Huang J. и др. A Cdh1-APC/FMRP Ubiquitin Signaling Link Drives mGluR-Dependent Synaptic Plasticity in the Mammalian Brain // *Neuron*. 2015. T. 86. № 3. С. 726–740.
85. Huang Y. и др. S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors // *Neuron*. 2005. T. 46. № 4. С. 533–540.
86. Hung A.Y. и др. Degradation of postsynaptic scaffold GKAP and regulation of dendritic spine morphology by the TRIM3 ubiquitin ligase in rat hippocampal neurons // *PLoS One*. 2010. T. 5. № 3.
87. Igaz L.M. и др. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. // *J. Neurosci.* 2002. T. 22. № 15. С. 6781–6789.
88. Ill-Raga G. и др. Consolidation of object recognition memory requires HRI kinase-dependent phosphorylation of eIF2 α in the hippocampus // *Hippocampus*. 2013. T. 23. № 6. С. 431–436.
89. Ill-raga G., Tajés M., Busquets-garcí A. Physiological Control of Nitric Oxide on neuronal BACE1 Translation by Heme-Regulated Eif2 α Kinase HRI Induces Synaptogenesis // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. T. 22. № 15. С. 1295–1307.
90. Itzhak Y. и др. Histone acetylation rescues contextual fear conditioning in nNOS KO mice and accelerates extinction of cued fear conditioning in wild type mice //

Neurobiol. Learn. Mem. 2012. Т. 97. № 4. С. 409–417.

91. Iwase K. и др. The secretogranin II gene is a signal integrator of glutamate and dopamine inputs // J. Neurochem. 2014. Т. 128. № 2. С. 233–245.

92. Izquierdo I. и др. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation // Trends Neurosci. 2006. Т. 29. № 9. С. 496–505.

93. Izumi Y., Clifford D.B., Zorumski C.F. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. // Science. 1992. Т. 257. № 5074. С. 1273–6.

94. Izumi Y., Tokuda K., Zorumski C.F. Long-term potentiation inhibition by low-level N-methyl-D-aspartate receptor activation involves calcineurin, nitric oxide, and p38 mitogen-activated protein kinase // Hippocampus. 2008. Т. 18. № 3. С. 258–265.

95. Jarome T.J. и др. Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala // PLoS One. 2011. Т. 6. № 9.

96. Jarome T.J. и др. CaMKII, but not protein kinase A, regulates Rpt6 phosphorylation and proteasome activity during the formation of long-term memories. // Front. Behav. Neurosci. 2013. Т. 7. № August. С. 115.

97. Jarome T.J. и др. CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval // Neurobiol. Learn. Mem. 2016. Т. 128. С. 103–109.

98. Jarome T.J., Helmstetter F.J. The ubiquitin-proteasome system as a critical regulator of synaptic plasticity and long-term memory formation // Neurobiol. Learn. Mem. 2013. Т. 105. С. 107–116.

99. Johnstone V.P.A., Raymond C.R. A protein synthesis and nitric oxide-dependent presynaptic enhancement in persistent forms of long-term potentiation // Learn. Mem. 2011. Т. 18. № 10. С. 625–633. doi:10.1101/lm.2245911.

100. Johnstone V.P.A., Raymond C.R. Postsynaptic protein synthesis is required for presynaptic enhancement in persistent forms of long-term potentiation // Front. Synaptic Neurosci. 2013. Т. 5. № FEB. С. 1–10.

101. Kapadia M.R. и др. Nitric oxide regulates the 26S proteasome in vascular smooth muscle cells. // Nitric Oxide. 2009. Т. 20. № 4. С. 279–88.

102. Karpova A. и др. Involvement of Protein Synthesis and Degradation in Long-

- Term Potentiation of Schaffer Collateral CA1 Synapses // *J. Neurosci.* 2006. T. 26. № 18. С. 4949–4955. doi:10.1523/JNEUROSCI.4573–05.2006.
103. Kelley J.B. и др. Impairments in fear conditioning in mice lacking the nNOS gene. // *Learn. Mem.* 2009. T. 16. № 6. С. 371–8.
104. Kelley J.B. и др. Long-term memory of visually cued fear conditioning: roles of the neuronal nitric oxide synthase gene and cyclic AMP response element-binding protein. // *Neuroscience.* 2011. T. 174. С. 91–103.
105. Kim R., Moki R., Kida S. Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze. // *Mol. Brain.* 2011. T. 4. № 1. С. 9.
106. Klein M.E., Castillo P.E., Jordan B.A. Coordination between translation and degradation regulates inducibility of mGluR-LTD // *Cell Rep.* 2015. T. 10. № 9. С. 1459–1466.
107. Knepper B.R., Kurylo D.D. Effects of nitric oxide synthase inhibitor N(G)-nitro-L-arginine methyl ester on spatial and cued leaning // *Neuroscience.* 1998. T. 83. № 3. С. 837–841.
108. Ko G.Y., Kelly P.T. Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. // *J. Neurosci.* 1999. T. 19. № 16. С. 6784–6794.
109. Komsuoglu-Celikyurt I. и др. Evidence for the involvement of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase on cognitive functions in rats // *Life Sci.* 2011. T. 89. № 23–24. С. 905–910.
110. Korshunova TA, Balaban PM. Nitric oxide is necessary for long-term facilitation of synaptic responses and for development of context memory in terrestrial snails // *Neuroscience.* 2014. T. 266. С. 127–135.
111. Kubota Y. и др. Selective coexpression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical gabaergic neurons // *Cereb. Cortex.* 2011. T. 21. № 8. С. 1803–1817.
112. Kuczera T. и др. The anaphase promoting complex is required for memory function in mice. // *Learn. Mem.* 2011. T. 18. № 1. С. 49–57.

113. Kwak Y.-D. и др. NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN inhibition in neurodegeneration. // *Mol. Neurodegener.* 2010. Т. 5. № 1. С. 49. doi:10.1186/1750-1326-5-49.
114. Lee K.J. и др. Requirement for Plk2 in orchestrated ras and rap signaling, homeostatic structural plasticity, and memory // *Neuron.* 2011. Т. 69. № 5. С. 957–973.
115. Lee S.-H. и др. Synaptic Protein Degradation Underlies Destabilization of Retrieved Fear Memory // *Science* (80-.). 2008. Т. 319. № 5867. С. 1253–1256.
116. Lee S.H. и др. A cellular model of memory reconsolidation involves reactivation-induced destabilization and restabilization at the sensorimotor synapse in *Aplysia* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. Т. 109. № 35. С. 14200–14205. doi:10.1073/pnas.1211997109.
117. Li G., Wieraszko A. Dual effect of sodium nitroprusside on potentials recorded from mouse hippocampal slices // *Brain Res.* 1994. Т. 667. № 1. С. 33–38.
118. Li M. и др. The adaptor protein of the anaphase promoting complex Cdh1 is essential in maintaining replicative lifespan and in learning and memory // *Nat. Cell Biol.* 2008. Т. 10. № 9. С. 1083–1089.
119. Lin C. и др. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. // *J. Neurosci.* 2003. Т. 23. № 23. С. 8310–7.
120. Lin L.H., Taktakishvili O., Talman W.T. Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii // *Brain Res.* 2007. Т. 1171. С. 42–51.
121. Lipton S.A. и др. Comment on "S-Nitrosylation of Parkin regulates ubiquitination and compromises Parkin's protective function // *Science* (80-.). 2005. Т. 308. № May. С. 1110135–1110135. doi:10.1126/science.1110135.
122. Lu Y.F., Kandel E.R., Hawkins R.D. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. // *J. Neurosci.* 1999. Т. 19. № 23. С. 10250–10261.
123. Luo H., Han L., Tian S. Effect of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on fear extinction in rats: A task-dependent effect // *Neurosci. Lett.* 2014. Т. 572. С. 13–18.

124. Mahairaki V. и др. Targeted knock-down of neuronal nitric oxide synthase expression in basal forebrain with RNA interference // *J Neurosci Methods*. 2009. Т. 179. № 2. С. 292–299.
125. Maletic-Savatic M., Malinow R., Svoboda K. Rapid Dendritic Morphogenesis in CA1 Hippocampal Dendrites Induced by Synaptic Activity // *Science* (80-.). 1999. Т. 283. № 5409.
126. Maltsev A. V. и др. Alpha-2 adrenoceptors and imidazoline receptors in cardiomyocytes mediate counterbalancing effect of agmatine on NO synthesis and intracellular calcium handling // *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2014. Т. 68. С. 66–74.
127. Mao S.-C., Lin H.-C., Gean P.-W. Augmentation of fear extinction by D-cycloserine is blocked by proteasome inhibitors. // *Neuropsychopharmacology*. 2008. Т. 33. № 13. С. 3085–3095.
128. Matsushita K. и др. Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor // *Cell*. 2003. Т. 115. № 2. С. 139–150.
129. Micheva K.D. и др. Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. // *Nat. Neurosci*. 2003. Т. 6. № 9. С. 925–932.
130. Milton A.L. и др. Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. // *J. Neurosci*. 2013. Т. 33. № 3. С. 1109–1115.
doi:10.1523/JNEUROSCI.3273–12.2013.
131. Monfort P. и др. Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. // *J. Neurosci*. 2002. Т. 22. № 23. С. 10116–10122.
132. Moon I.S. и др. Upregulation by KCl treatment of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) mRNA in the dendrites of cultured rat hippocampal neurons // *Mol Cells*. 2008. Т. 25. № 4. С. 538–544.
133. Moosavi M. и др. The role of nitric oxide in spatial memory stages, hippocampal ERK and CaMKII phosphorylation // *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2014. Т. 122. С. 164–172.
134. Muddashetty R.S. и др. Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by

miR-125a, FMRP phosphorylation and mGluR signaling // *Mol. Cell.* 2011. T. 42. № 5. C. 673–688.

135. Murav'eva E. V., Anokhin K. V. Involvement of protein synthesis in the reconsolidation of memory at different time points after formation of conditioned reflex freezing in mice // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2007. T. 37. № 4. C. 411–417.

136. Musleh W.Y., Shahi K., Baudry M. Further studies concerning the role of nitric oxide in LTP induction and maintenance // *Synapse.* 1993. T. 13. C. 370–375.
doi:10.1002/syn.890130409.

137. Nader K., Schafe G.E., Doux J.E. Le. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. // *Nature.* 2000. T. 406. № 6797. C. 722–726.

138. Naskar S., Wan H., Kemenes G. pT305-CaMKII stabilizes a learning-induced increase in AMPA receptors for ongoing memory consolidation after classical conditioning. // *Nat. Commun.* 2014. T. 5. C. 3967. doi:10.1038/ncomms4967.

139. Ota K.T. и др. The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK / MAP kinase // *Learn. Mem.* 2008. C. 792–805.

140. Ota K.T. и др. Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling regulate pre- and postsynaptic alterations at rat lateral amygdala synapses following fear conditioning // *PLoS One.* 2010a. T. 5. № 6. C. e11236.

141. Ota K.T. и др. Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling coordinately regulate ERK-driven gene expression in the lateral amygdala and in the auditory thalamus following Pavlovian fear conditioning. // *Learn. Mem.* 2010b. T. 17. № 4. C. 221–35.

142. Otmakhov N. Persistent Accumulation of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Dendritic Spines after Induction of NMDA Receptor-Dependent Chemical Long-Term Potentiation // *J. Neurosci.* 2004. T. 24. № 42. C. 9324–9331.

143. Overeem K.A. и др. A role for nitric oxide-driven retrograde signaling in the consolidation of a fear memory. // *Front. Behav. Neurosci.* 2010. T. 4. № February. C. 2.

144. Overeem K.A., Kokkinidis L. Nitric oxide synthesis in the basolateral complex of the amygdala is required for the consolidation and expression of fear potentiated startle but not shock sensitization of the acoustic startle // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2012. T. 97. № 1. С. 97–104.
145. Padamsey Z., Emptage N. Two sides to long-term potentiation: a view towards reconciliation // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2013. T. 369. № 1633. С. 20130154.
146. Pak D.T.S., Sheng M. Targeted protein degradation and synapse remodeling by an inducible protein kinase. // *Science*. 2003. T. 302. № 5649. С. 1368–1373.
147. Palumbo A. и др. NMDA receptor stimulation induces temporary alpha-tubulin degradation signaled by nitric oxide-mediated tyrosine nitration in the nervous system of *Sepia officinalis*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. T. 293. № 5. С. 1536-1543-291–3.
148. Patrick G.N. и др. Ubiquitin-Mediated Proteasome Activity Is Required for Agonist-Induced Endocytosis of GluRs // *Curr. Biol.* 2003. T. 13. № 23. С. 2073–2081.
149. Peunova N., G Enikolopov. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells // *Nature*. 1993. T. 364. С. 450–453.
150. Phillips K.G., Hardingham N.R., Fox K. Postsynaptic Action Potentials Are Required for Nitric- Oxide-Dependent Long-Term Potentiation in CA1 Neurons of Adult GluR1 Knock-Out and Wild-Type Mice // *J Neurosci.* 2008. T. 28. № 52. С. 14031–14041. doi:10.1523/JNEUROSCI.3984–08.2008.
151. Pick J.E., Malumbres M., Klann E. The E3 ligase APC/C-Cdh1 is required for associative fear memory and long-term potentiation in the amygdala of adult mice. // *Learn. Mem.* 2013. T. 20. № 1. С. 11–20.
152. Pines J., Lindon C. Proteolysis: anytime, any place, anywhere? // *Nat. Cell Biol.* 2005. T. 7. № 8. С. 731–735.
153. Puram S. V и др. A Unique CaMKII β Signaling Pathway at the Centrosome Regulates Dendrite Patterning in the Brain // 2012. T. 14. № 8. С. 973–983.
154. Puram S. V. и др. The Ubiquitin Receptor S5a/Rpn10 Links Centrosomal Proteasomes with Dendrite Development in the Mammalian Brain // *Cell Rep.* 2013. T. 4. № 1. С. 19–30.

155. Rameau G.A., Chiu L.Y., Ziff E.B. Bidirectional Regulation of Neuronal Nitric-oxide Synthase Phosphorylation at Serine 847 by the N-Methyl-D-aspartate Receptor // *J. Biol. Chem.* 2004. Т. 279. № 14. С. 14307–14314.
156. Rameau G. а и др. Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. // *J. Neurosci.* 2007. Т. 27. № 13. С. 3445–3455.
157. Ramirez S. и др. Creating a false memory in the hippocampus. // *Sci. (New York, NY).* 2013. Т. 341. № 6144. С. 387–391.
158. Ramos-fernández E. и др. Glutamatergic stimulation induces GluN2B translation by the nitric oxide-Heme-Regulated eIF2 α kinase in cortical neurons // *Oncotarget.* 2016. Т. 7. № 37. С. 58876–58892.
159. Ren Z.-Y. и др. A critical role for protein degradation in the nucleus accumbens core in cocaine reward memory. // *Neuropsychopharmacology.* 2013. Т. 38. № 5. С. 778–90.
160. Rose J., Jin S.-X., Craig A.M. Heterosynaptic molecular dynamics: locally induced propagating synaptic accumulation of CaM kinase II // *Neuron.* 2009. Т. 61. № 3. С. 351–358.
161. Rovozzo R. и др. CGG Repeats in the 5' UTR of FMR1 RNA Regulate Translation of Other RNAs Localized in the Same RNA Granules // *PLoS One.* 2016. Т. 11. № 12. С. 1–23.
162. Ryu K.-Y. и др. The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance. // *EMBO J.* 2007. Т. 26. № 11. С. 2693–2706.
163. Santos a. R. и др. Differential Role of the Proteasome in the Early and Late Phases of BDNF-Induced Facilitation of LTP // *J. Neurosci.* 2015. Т. 35. № 8. С. 3319–3329.
164. Schafe G.E. и др. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala // *Eur. J. Neurosci.* 2005. Т. 22. № 1. С. 201–211.
165. Schmidt M. и др. Proteasome-associated proteins: Regulation of a proteolytic

machine // *Biol. Chem.* 2005. T. 386. № 8. C. 725–737.

166. Schuman E.M., Madison D. V. A Requirement for the Intracellular Messenger Nitric Oxide in Long-Term Potentiation // *Science* (80-.). 1991. T. 254. C. 1503–1506.

167. Seeburg D.P., Pak D., Sheng M. Polo-like kinases in the nervous system // *Oncogene*. 2005. T. 24. C. 292–298.

168. Selvakumar B. и др. S-nitrosylation of AMPA receptor GluA1 regulates phosphorylation, single-channel conductance, and endocytosis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. T. 110. № 3. C. 1077–82.

169. Selvakumar B., Huganir R.L., Snyder S.H. S-nitrosylation of stargazin regulates surface expression of AMPA-glutamate neurotransmitter receptors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. T. 106. № 38. C. 16440–16445.

170. Serulle Y. и др. A GluR1-cGKII interaction regulates AMPA receptor trafficking. // *Neuron*. 2007. T. 56. № 4. C. 670–88.

171. Serulle Y., Arancio O., Ziff E.B. A role for cGMP-dependent protein kinase II in AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. // *Channels (Austin)*. 2008. T. 2. № 4. C. 230–2.

172. Shang T. и др. Sepiapterin attenuates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in neuroblastoma cells transfected with neuronal NOS: Role of tetrahydrobiopterin, nitric oxide, and proteasome activation // *Free Radic. Biol. Med.* 2005. T. 39. № 8. C. 1059–1074. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.022.

173. Shin S.M. и др. GKAP orchestrates activity-dependent postsynaptic protein remodeling and homeostatic scaling. // *Nat. Neurosci.* 2012. T. 15. № 12. C. 1655–66.

174. Silva W.C. Da и др. Memory reconsolidation and its maintenance depend on L-voltage-dependent calcium channels and CaMKII functions regulating protein turnover in the hippocampus // *Pnas*. 2013. C. 1–5.

175. Sol Fustiñana M. и др. Protein degradation by ubiquitin-proteasome system in formation and labilization of contextual conditioning memory. // *Learn. Mem.* 2014. T. 21. № 9. C. 478–87.

176. Sossa K.G., Beattie J.B., Carroll R.C. AMPAR exocytosis through NO modulation of PICK1 // *Neuropharmacology*. 2007. T. 53. № 1. C. 92–100.

177. Tai H.-C., Schuman E.M. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2008. Т. 9. № 11. С. 826–838. doi:10.1038/nrn2499.
178. Tan S.-E. Activation of hippocampal nitric oxide and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in response to Morris water maze learning in rats. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009. Т. 92. № 2. С. 260–266.
179. Taniai H. и др. Susceptibility of murine periportal hepatocytes to hypoxia-reoxygenation: Role for NO and Kupffer cell-derived oxidants // *Hepatology.* 2004. Т. 39. № 6. С. 1544–1552.
180. Taqatqeh F. и др. More than a Retrograde Messenger: Nitric Oxide Needs Two cGMP Pathways to Induce Hippocampal Long-Term Potentiation // *J. Neurosci.* 2009. Т. 29. № 29. С. 9344–9350.
181. Terpolilli N.A., Moskowitz M.A., Plesnila N. Nitric oxide : considerations for the treatment of ischemic stroke // *J Cereb. Blood Flow Metab.* 2012. Т. 32. № 7. С. 1332–1346.
182. Tobin J.R. и др. Nitric oxide synthase inhibition does not impair visual or spatial discrimination learning // *Brain Res.* 1995. Т. 694. № 1–2. С. 177–182.
183. Tooker R.E. и др. Nitric Oxide Mediates Activity-Dependent Plasticity of Retinal Bipolar Cell Output via S-Nitrosylation // *J. Neurosci.* 2013. Т. 33. № 49. С. 19176–19193.
184. Tsai N.P. Ubiquitin proteasome system-mediated degradation of synaptic proteins: An update from the postsynaptic side // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2014. Т. 1843. № 12. С. 2838–2842.
185. Tsikas D. и др. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. // *FEBS Lett.* 2000. Т. 478. № 1–2. С. 1–3.
186. Tsokas P. и др. Local Protein Synthesis Mediates a Rapid Increase in Dendritic Elongation Factor 1A after Induction of Late Long-Term Potentiation // *J. Neurosci.* 2005. Т. 25. № 24. С. 5833–5843.
187. Upadhyya S.C. и др. Differential regulation of proteasome activity in the nucleus and the synaptic terminals // *Neurochem. Int.* 2006. Т. 48. № 4. С. 296–305.

188. Valtschanoff J.G., Weinberg R.J. Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. // *J. Neurosci.* 2001. T. 21. № 4. С. 1211–7.
189. Verpelli C. и др. Synaptic Activity Controls Dendritic Spine Morphology by Modulating eEF2-Dependent BDNF Synthesis // *J. Neurosci.* 2010. T. 30. № 17. С. 5830–5842.
190. Vigneron N., Eynde B. Van den. Proteasome Subtypes and Regulators in the Processing of Antigenic Peptides Presented by Class I Molecules of the Major Histocompatibility Complex // *Biomolecules.* 2014. T. 4. № 4. С. 994–1025.
191. Wang H.G. и др. Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins // *Neuron.* 2005. T. 45. № 3. С. 389–403.
192. Wass C. и др. Phencyclidine affects memory in a nitric oxide-dependent manner: working and reference memory // *Behav Brain Res.* 2006. T. 174. № 1. С. 49–55.
193. Wei F.-Y.Y. и др. Control of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activity by glutamatergic regulation of p35 stability // *J. Neurochem.* 2005. T. 93. № 2. С. 502–512.
194. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system // *Prog. Neurobiol.* 2001. T. 64. № 4. С. 365–391.
195. Williams J.H. и др. The suppression of long-term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent // *Neuron.* 1993. T. 11. № 5. С. 877–884. doi:10.1016/0896–6273(93)90117–A.
196. Wiseman S.L. и др. Proteasomal degradation of eukaryotic elongation factor-2 kinase (EF2K) is regulated by cAMP-PKA signaling and the SCF^{TRCP} ubiquitin E3 ligase // *J. Biol. Chem.* 2013. T. 288. № 24. С. 17803–17811.
197. Wojcik C., Napoli M. Di. Ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibition: New strategies in stroke therapy // *Stroke.* 2004. T. 35. № 6. С. 1506–1518.
198. Yao I. и др. SCRAPER-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release // *Cell.* 2007. T. 130. № 5. С. 943–957.
199. Yi J. и др. L-Arginine and Alzheimer’s disease // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2009. T. 2. № 3. С. 211–238.

200. Yildirim M., Marangoz C. Effects of Nitric Oxide on Passive Avoidance Learning in Rats // *Int. J. Neurosci.* 2004. T. 114. № 5. С. 597–606.
201. Yu Y. и др. Involvement of protein phosphatases in the destabilization of methamphetamine-associated contextual memory // *Learn. Mem.* 2016. T. 23. № 9. С. 486–494.
202. Zhang P. и др. S-nitrosylation-dependent proteasomal degradation restrains Cdk5 activity to regulate hippocampal synaptic strength. // *Nat. Commun.* 2015. T. 6. С. 8665.
203. Zhuo M. и др. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. // *Nature.* 1994. T. 368. № 6472. С. 635–639.
204. Zinn C.G. и др. On the requirement of nitric oxide signaling in the amygdala for consolidation of inhibitory avoidance memory // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2009. T. 91. № 3. С. 266–272.
205. Zorumski C., Izumi Y. Nitric oxide and hippocampal synaptic plasticity. // *Biochem. Pharmacol.* 1993. T. 46. № 5. С. 777–785.