

На правах рукописи

Баль Наталья Вячеславовна

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

Специальность 03.03.01 – «Физиология»

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2017

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

Научный руководитель:

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

Балабан Павел Милославович

Официальные оппоненты:

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

Люпина Юлия Вячеславовна

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

Кичигина Валентина Федоровна

Ведущая организация:

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

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

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

Автореферат разослан ____ 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, 

д.б.н. Иерусалимский В.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

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

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

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

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

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

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

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

Цель работы и основные задачи исследования

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

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать взаимосвязь между синтезом оксида азота и убиквитин-зависимой деградацией белков в нейронах с помощью генетически-кодированного флуоресцентного сенсора Ub^{G76V}-GFP.

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

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

Научная новизна

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

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

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

Теоретическая ценность и практическая значимость.

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

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

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

Положения, выносимые на защиту:

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

Апробация работы

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

Личное участие автора

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

Объем и структура работы

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты с культурой нейронов

Получение культуры. Смешанная нейроглиальная культура получена из гиппокампа новорожденных крысят с помощью вырезания из мозга в холодном растворе ДМЕМ и последующего деления на клетки с помощью трипсина. Полученные клетки культивировались на стеклах в нейробазальной среде (Invitrogen) в CO₂-инкубаторе.

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

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

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

Иммуноцитохимия

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

Электрофорез и вестерн-блоттинг

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

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

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

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

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

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

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

Полупроводниковое секвенирование и биоинформатический анализ данных

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

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

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

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

Электрофизиологические эксперименты

Самцы крыс линии Вистар возрастом 6-8 недель были декапитированы с помощью гильотины, после чего мозг был быстро помещен в ледяной раствор для порезки (концентрации в мМ: 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 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 и D-глюкозы на концентрации 2,5; 1,3 и 25 мМ, соответственно). Срезы нагревались постепенно при комнатной температуре по крайней мере 1 час до переноса в камеру для электрофизиологической записи.

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

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

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

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

Поведенческие эксперименты

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

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

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

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

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Экспрессии нейрональной NO-синтазы и других белков в культуре нейронов

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

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

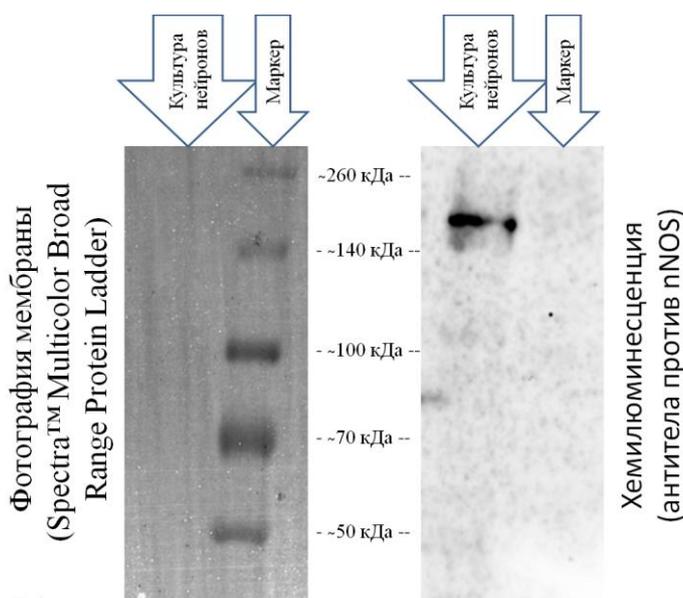


Рис.1. Иммунохимическое окрашивание мембраны после переноса с полиакриламидного геля. Показано окрашивание пробы с белками культуры нейронов гиппокампа первичными антителами кролика против pNOS и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, против кроличьих IgG. Проявление мембраны производилось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

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

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

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

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

Перекрывание изображений

Mouse MAP-2 + Anti-Mouse 546

Rat nNOS + Anti-Rat Alexa 488

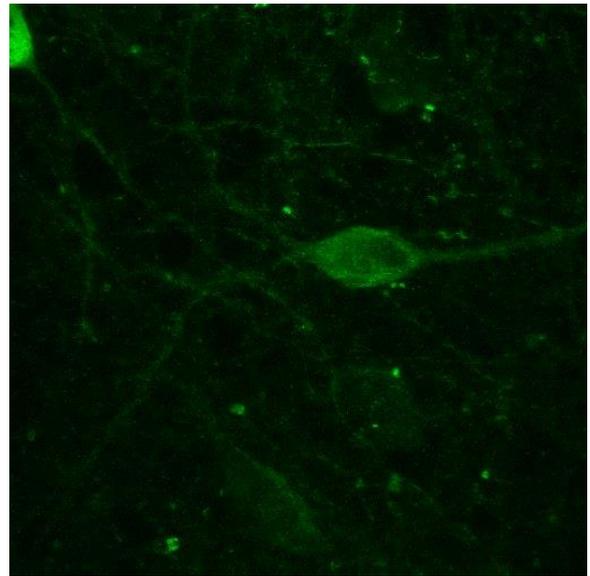
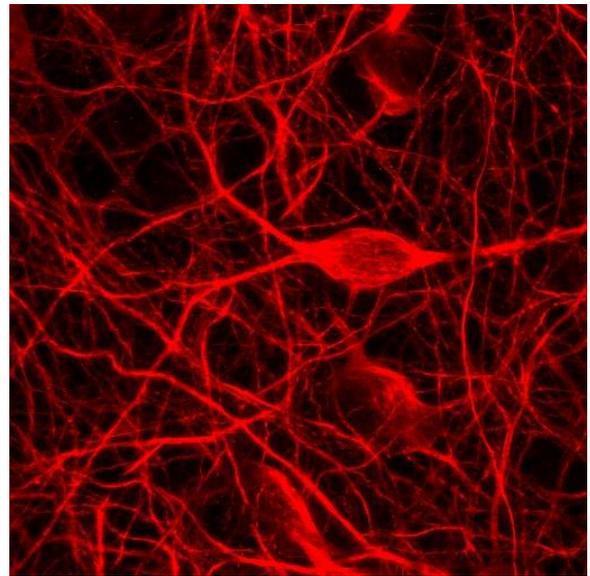
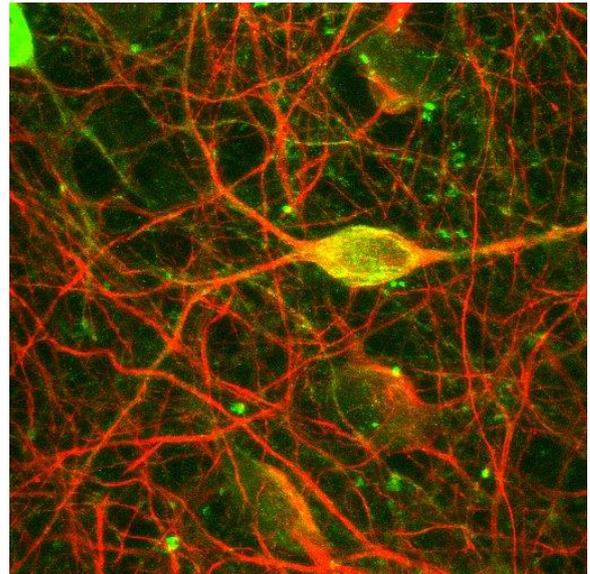
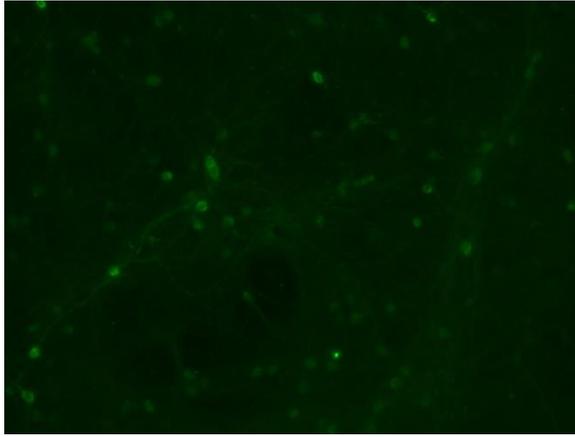
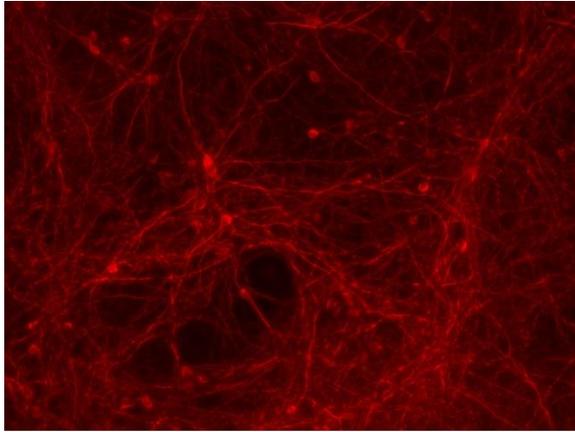
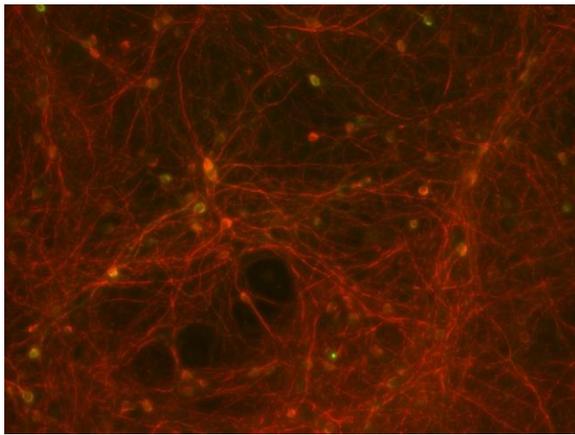


Рис.2. Иммуноцитохимическая окраска культуры нейронов гиппокампа.

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

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). Регистрация флуоресцентного сигнала производилась 1 раз в 5 минут в течение 40 минут (рис.3А).

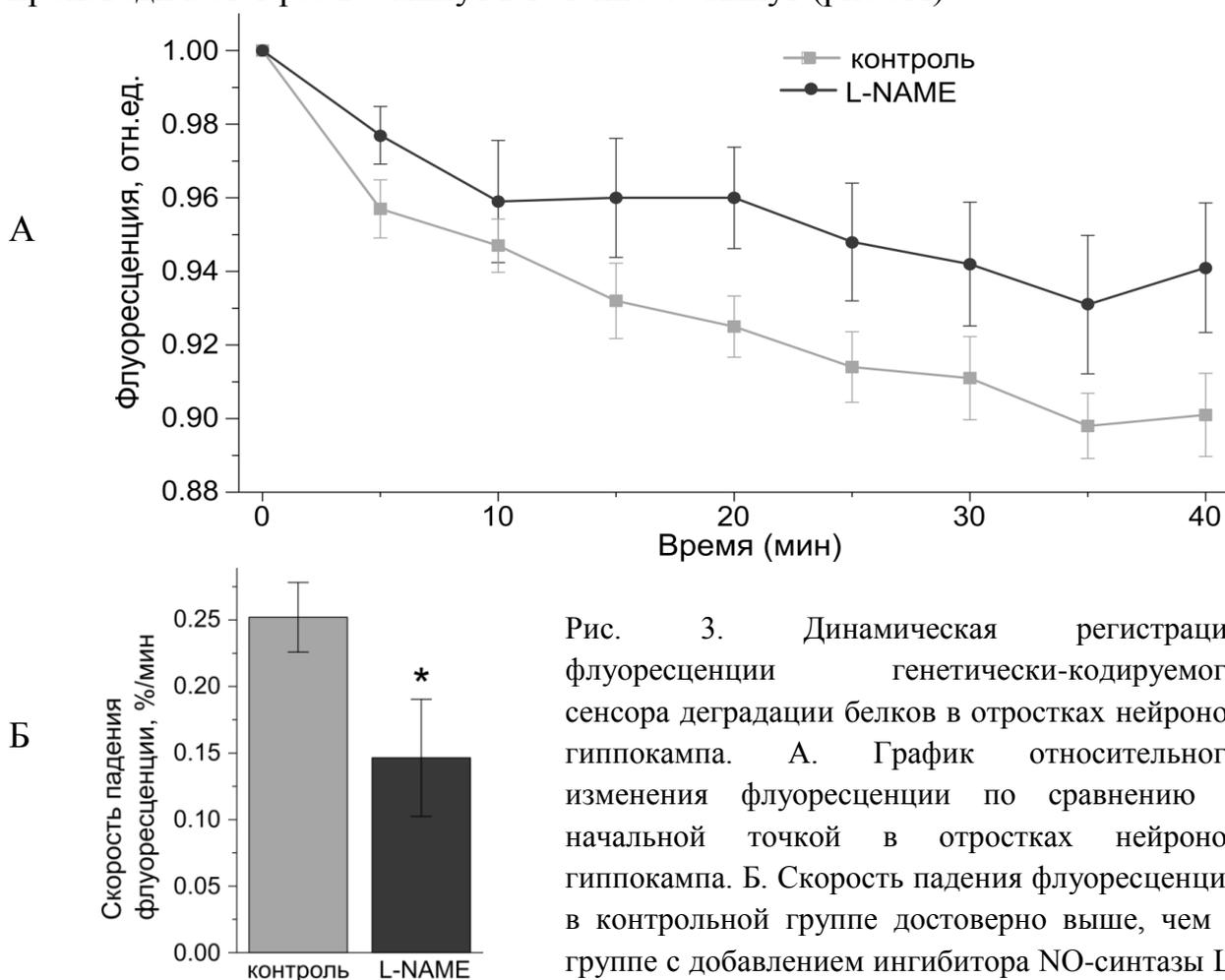


Рис. 3. Динамическая регистрация флуоресценции генетически-кодируемого сенсора деградации белков в отростках нейронов гиппокампа. А. График относительного изменения флуоресценции по сравнению с начальной точкой в отростках нейронов гиппокампа. Б. Скорость падения флуоресценции в контрольной группе достоверно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

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

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

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

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

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

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

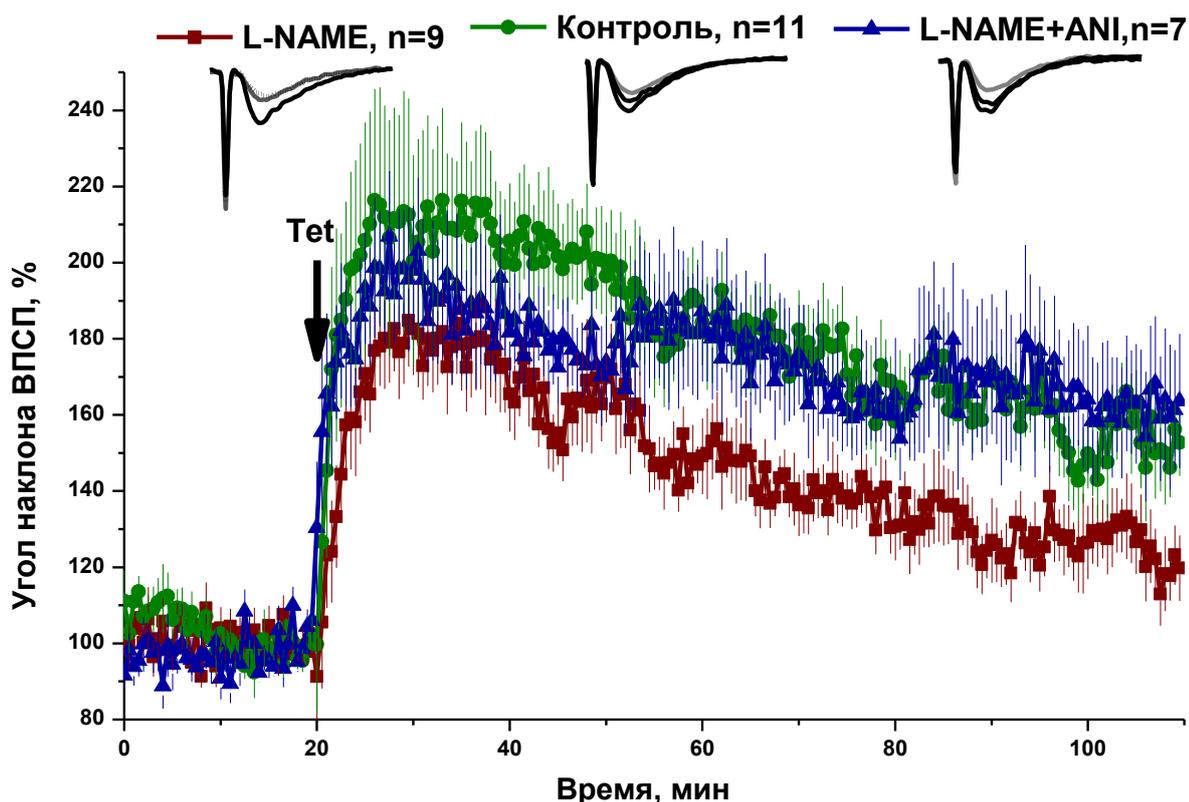


Рис.4. Долговременная потенция в срезах гиппокампа. На графике показан угол наклона ВПСП во временной развертке в контрольной группе (зеленые кружки), в группе с блокадой NO-синтазы с помощью L-NAME (красные квадраты) и одновременной блокадой синтеза оксида азота и синтеза белка (синие треугольники).

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

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

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

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

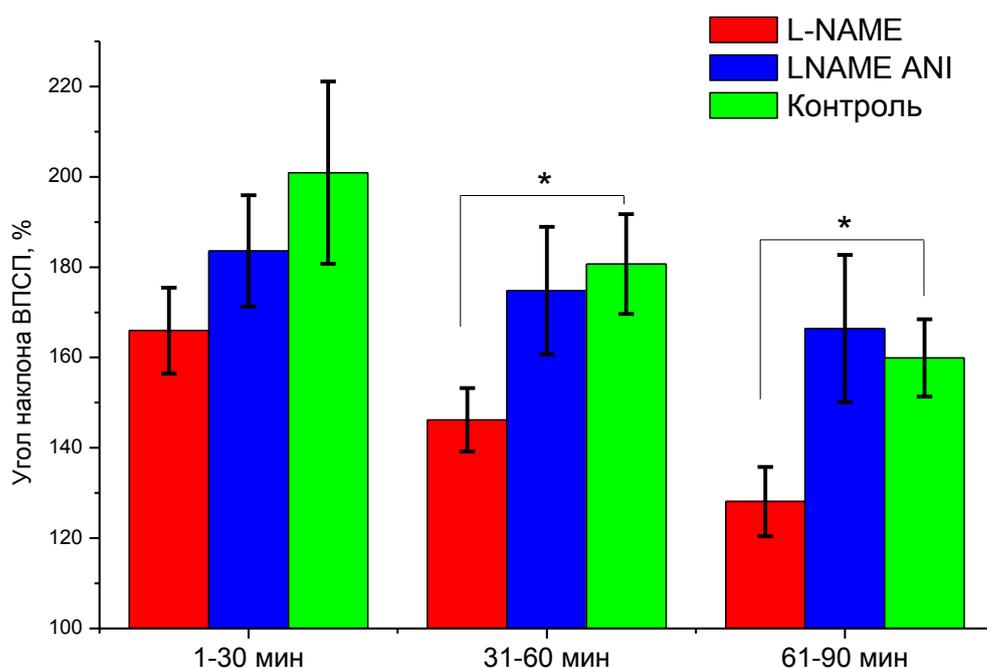


Рис.5. Анализ угла наклона ВПСП на разных временных промежутках после индукции ВПСП (1-30 мин, 31-60 и 61-90 мин). Зеленым цветом показан средний угол наклона ВПСП в контрольной группе, красным – в группе с L-NAME, синим – в группе с аннизомицином и L-NAME.

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

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

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

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

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

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

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

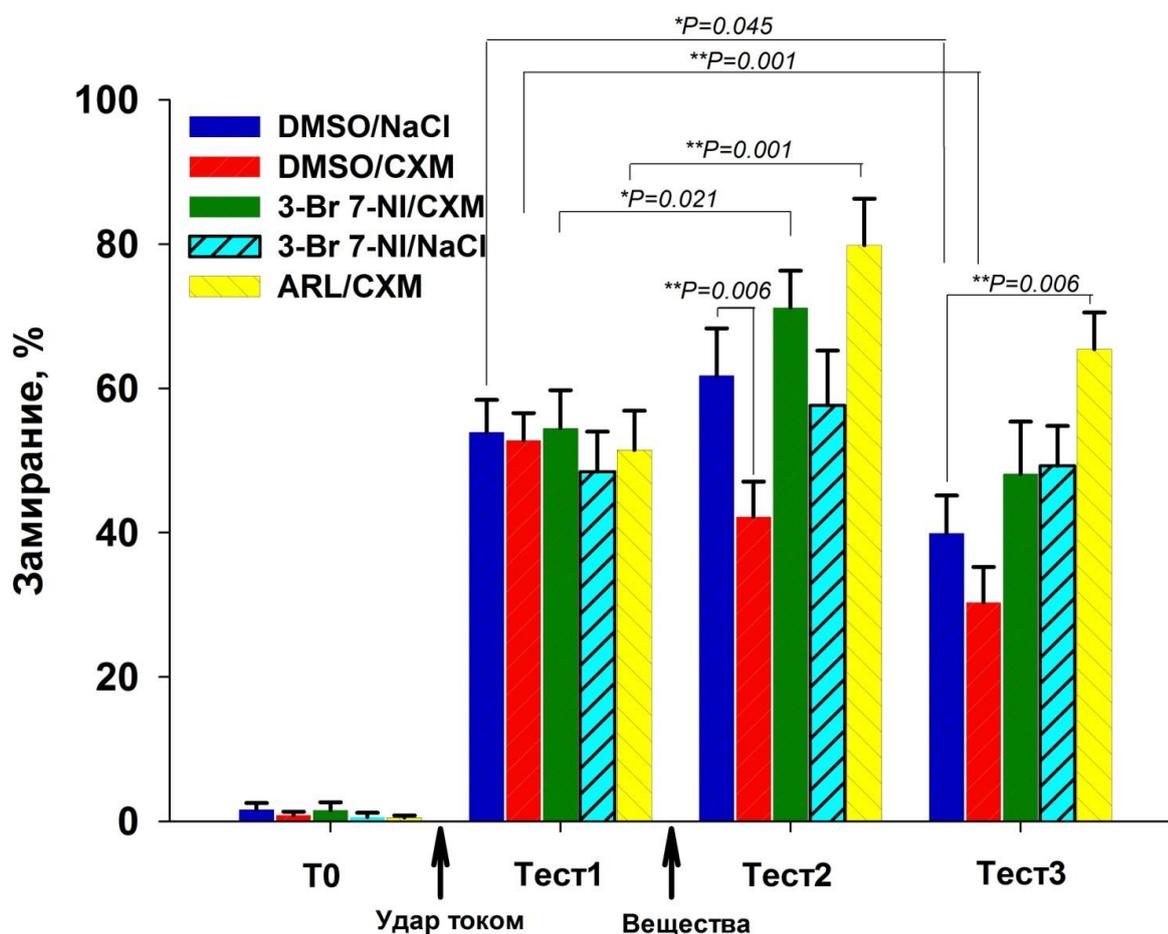


Рис. 6. Исследование замирания крыс на предъявление звукового стимула в разных группах. Синим цветом показано замирание крыс на звук в группе, которым проводилась инъекция контрольного раствора сразу после напоминания (Теста1), красным – инъекция блокатора синтеза белка циклогексимида, зеленым – 3-Br-7-NI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

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

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

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

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

ОБСУЖДЕНИЕ

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

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

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

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

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

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

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

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



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

ВЫВОДЫ

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

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

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА

Статьи по теме диссертации

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

Статьи

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

Тезисы конференций

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

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