

МЕХАНИЗМЫ НЕРВНОЙ ПАМЯТИ. Сообщение 3. МЕХАНИЗМЫ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ

Военно-медицинский факультет в БГМУ

При многократном предъявлении стимула каскад реакций консолидации LTM развивается дальше. Наложение стимулов друг на друга приводит к нарастанию концентрации продуктов реакций, описанных во втором сообщении.

Нарастание активности СаМК II и PKA.

Например, существует ряд специфических механизмов поддержания высокого уровня активности СаМК II. Помимо возможности аутофосфорилирования, о которой упоминалось выше, СаМК II может сохранять активность даже при снижении уровня Ca^{2+} до исходных норм благодаря насыщению PP 1 большим количеством молекул активированной СаМК II [20]. Доказана возможность быстрого синтеза молекул голоэнзима СаМК II за счет локализованной в дендритах mRNA СаМК II [13]. За счет высокой активности СаМК II увеличивается число активных NMDA и AMPA рецепторов и, как следствие, обеспечивается существование поздней LTP и возможность быстрого проведения повторных импульсов [13, 19].

Доказана также корреляция уровня cAMP в гиппокампе при консолидации LTM с увеличением активности PKA [15]. При увеличении уровня PKA ее каталитическая субъединица, как уже отмечалось, может фосфорилировать регуляторную субъединицу, обуславливая таким образом свою более длительную активность. Кроме того, некоторые якорные белки, фиксируя регуляторную субъединицу PKA, так же могут увеличивать активность ее каталитической субъединицы [7]. Пролонгированная активность PKA достигается так же и обратным влиянием продуктов своей деятельности. Например, PKA-обусловленная активация CREB (cAMP-responsive element binding protein) (о котором будет сказано ниже) помимо всего прочего обуславливает и экспрессию гена убиквитин гидролазы, разрушающей регуляторную субъединицу PKA [19].

Следует отметить исследования Vianna M.R.M et al. (2000), которые показали, что активность PKA при поступлении новой информации отнюдь не равномерна. Авторы отметили два пика пиками деятельности PKA – на 5-й и 180 минуте после обучения. В другой серии экспериментов было установлено, что подавление активности PKA путем введения ингибитора регуляторной субъединицы PKA (inhibitor of the regulatory subunit of PKA – Rp-cAMPS) в различное время после опыта избирательно нарушает консолидацию STM или LTM.

Так, введении Rp-cAMPS непосредственно после обучения (0-я минута) блокировало STM, и LTM. При введении Rp-cAMPS на 170 минуте нарушалось формирование LTM, тогда как STM не затрагивалась. Напротив, инфузия Rp-cAMPS на 22-й, 45-й и 90-й минутах после опыта подавляют консолидацию STM, не влияя на LTM. Введение активатора регуляторной субъединицы PKA (activator of the regulatory subunit of PKA – Sp-cAMPS) оказывало противоположный эффект. Введение Sp-cAMPS на 0-й минуте активировало STM и LTM, на 170 минуте – только LTM, на 22-й, 45-й и 90-й минутах – только STM [12]. Аналогичные временные параметры блокировки STM и LTM были получены при внутригиппокампальном введении KT5720 (ингибитор каталитической субъединицы PKA) [17]. Vianna M.R.M et al. (2000) акцентируют внимание еще на двух моментах. Во-первых, первый пик деятельности PKA отмечается перед увеличением уровня cAMP и, таким образом, должен «основываться» на существовавших ранее клеточных уровнях cAMP, тогда как второй пик деятельности PKA коррелирует с увеличением cAMP после опытов. Во-вторых, введение Rp-cAMPS на 0-й минуте нивелирует оба пика активности PKA – на 5-й и 180-й минутах – то есть, возникновение второго пика требует наличия первого, так как ингибирующий эффект длится около 90 минут. На основании данных экспериментов авторы делают вывод, что для консолидации LTM необходим двукратный подъем активности PKA (соответственно на 5-й и на 180-й минутах после опыта), тогда как для формирования STM требуется длительная равномерная активность PKA (без пиков активности) в течение первых 90 минут после опыта [12].

Каскад MAPK

Следующей стадией молекулярных событий при консолидации LTM является вовлечение каскада MAPK (mitogen-activated protein kinase) – одной из основных внутриклеточных сигнальных систем, контролирующей экспрессию генов [4, 5, 24]. Весь каскад MAPK разделяется на три группы киназ – ERK (extracellular regulated kinase), p38 и JNK (c-Jun N-terminal kinase). В каждой из этих групп активация конечных продуктов (JNK, p38, ERK) осуществляется за счет последовательного фосфорилирования ряда субстратов, обозначаемых как киназы киназ MAP-киназ, киназы MAP-киназ и т.д. Изначально MAPK были идентифицированы как регуляторы деления и диф-

ференцировки клеток, однако в потенциально неделимых и дифференцированных нейронах были установлены высокие уровни двух изоформ ERK MAPK – p44 MAPK и p42 MAPK (упоминаемых как ERK1 и ERK2). Считается, что эти киназы являются датчиками и биохимическими интеграторами, объединяющими и координирующими ответы нейрона на внеклеточные сигналы [28].

Активация каскада MAPK начинается с вовлечения в процесс киназы Ras, которая стимулируется PKC, DAG, Ca²⁺, а также при активации тирозинкиназного рецептора фактора роста (например, brain-derived neurotrophic factor – BDNF) посредством адапторных белков Grb2 и Sos [28, 29]. Ras в свою очередь активирует первые ступени каждого из трех каскадов (ERK, p38 и JNK). Ингибируют активность Ras белки SynGAP и NF1 [29].

В каскаде ERK первой киназой является серин-треониновая MAPK kinase kinase (MAPKKK) – Raf-1 и B-Raf. Активность Raf-1 увеличивается не только под влиянием Ras, но и при действии PKC и DAG, а ингибируется – под влиянием PKA. Однако PKA, ингибируя Raf-1, активирует при этом другую изоформу MAPKKK – B-Raf – посредством белка Rap-1 (сАМР-зависимый путь) [8]. То есть, увеличение уровня как PKA, так и PKC приводит к активации каскада ERK, хотя и различными путями. В свою очередь Raf-1 и B-Raf фосфорилируют треонин-тирозиную MAPK kinase (MAPKK) – MEK – и уже эта киназа (MEK) регулирует активность конечного продукта каскада – ERK [28, 29].

Следует также упомянуть и о механизмах прерывания данного каскада. Таким эффектом обладает один из эффекторов Ras – белок Rin1. Обладая высоким сродством к Ras, Rin1 активно с ним взаимодействует и тем самым предотвращая фосфорилирование Raf-1. Таким образом Rin1 действует как отрицательный регулятор синаптической пластичности, что подтверждается улучшением показателей памяти у мышей с мутацией гена, кодирующего Rin1 [29].

Активация факторов транскрипции

В ядре эффектором ERK являются различные факторы транскрипции. Каждая из конечных киназ подгрупп MAPK имеет свои мишени-субстраты. Так, JNK фосфорилирует фактор транскрипции c-Jun и ATF-2 (activating transcription factor). Субстрат для p38 – фактор транскрипции ATF-2 и GADD153 – один из DNA связывающих белков. Кроме этого p38 фосфорилирует локализованные в ядре сериновые киназы MAPKAPK-2 (MAP kinase-activated protein kinase) и MSK1 (mitogen-and stress-activated protein kinase), которые в свою очередь активируют фактор транскрипции CREB. ERK посредством MAPKAPK-1 также контролирует активность CREB. При этом киназы семейства MAPK регулируют активность факторов транскрипции не только за счет их фосфорилирования и увеличения способности связываться с другими компонентами транскрипционных комплексов, но так же за счет повышения уровня экспрессии их генов и изменения стабильности mRNA (в частности – p38).

В итоге киназы JNK, p38 и ERK «совместными» усилиями регулируют активность составных частей фактора транскрипции AP-1, который состоит из двух субъединиц. Одна из них (или обе) относится к семейству ДНК-связывающих белков Jun и Fos (c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2), а другой могут быть белки из семейства ATF, куда входит и фактор CREB. Помимо конечных продуктов MAPK активировать CREB и инактивировать CREB-2 (ингибитор CREB) могут PKA, CaMK II и PKG [18]. Все эти киназы независимо друг от друга фосфорилируют CREB по остатку Ser133, что увеличивает его способ-

ность к трансактивации РНК-полимеразы [4]. Поэтому белки CREB (и другие белки семейства ATF) играют одну из основных ролей в процессе активации нейронного генома при консолидации LTM и тем самым являются как бы «молекулярными переключателями» перехода от STM к LTM [18].

Таким образом, состав факторов транскрипции в данном нейроне будет зависеть от соотношения степени активации различных сигнальных каскадов – PKA, PKC, различные пути MAPK. В свою очередь уникальный субъединичный состав факторов транскрипции (например, входящих в состав AP-1) определяет их взаимное сродство и взаимодействие, а также их сходство к определенным последовательностям DNA (и, соответственно, спектр экспрессируемых генов) [4].

Ранние гены

Согласно современным представлениям о дальнейших внутриядерных реакциях, имеющих непосредственное отношение к консолидации LTM, активированные конечными продуктами MAPK факторы транскрипции (в частности – CREB) в свою очередь активизируют целый ряд генов, которые получили название непосредственных ранних генов (immediate early genes – IEG). Продукты IEG, так же являясь факторами транскрипции, регулируют активность поздних генов, продукты которых уже имеют непосредственное отношение к росту нервной терминали и закреплению новых синапсов.

Какие же гены относятся к IEG?

C.P. Donahue et al. (2002) был изучен профиль транскрибируемых IEG при предъявлении задач на консолидацию памяти – по 200 испытаний в день в течение 4 дней [30]. Авторами очищено 1186 генов. Активность 7 генов была отчетливо выше. После проведения полимеразной цепной реакции были определены продукты этих генов: 1) growth hormone (GH), 2) c-kit receptor tyrosine kinase (c-kit), 3) glutamate receptor, 4) metabotropic 5 (mGluR5), 5) nerve growth factor-beta (NGF-beta), 6) Jun oncogene (c-Jun), 7) transmembrane receptor Unc5H1 (UNC5H1), and transmembrane receptor Unc5H2 (UNC5H2). При этом авторы отмечают, что наиболее выраженная экспрессия этих генов отмечалась через 24 часа после эксперимента.

Наиболее известными IEG являются гены *c-fos* и *c-jun*, для которых экспериментально доказано увеличение экспрессии при избирательной активации практически всех компонентов каскада консолидации LTM – глутаматная активация NMDA рецепторов, PKA, CaMK II, PKC и CREB [18, 21]. Время активации этих генов нелинейно и характеризуется двухфазностью (также как и охарактеризованная выше активность PKA). Уже через 15 мин после однократного 10 секундного нового для животного воздействия отмечена экспрессия *c-fos* и *c-jun*, продолжающаяся до 60 мин. Второй пик их активности приходится на период 2 – 6 часов после поступления новой информации. При этом введение ингибиторов синтеза белка во время первого и второго пиков активности *c-fos* и *c-jun* нарушало консолидацию LTM, в то время как введение ингибиторов между пиками активности влияния на LTM не оказывало [1, 27].

Помимо *c-fos* и *c-jun* к IEG отнесены *zif268*, имеющий несколько отличные от *c-fos* и *c-jun* пики активности [8], а также ген *asf*, продукт которого регулирует цитоскелет белковое связывание [26].

Одним из генов, активизированный CREB, является ген уже упоминавшейся убиквитин-гидролазы, а также C/EBP enhancer-binding protein – C/EBP [23]. Увеличение концентрации mRNA C/EBP отмечалось даже при наличии ингибиторов белкового синтеза.

Поздние гены, транспорт mRNA и синтез белка

Как уже упоминалось выше, продукты ранних генов *c-Fos*, *JunB*, *c-Jun* и *JunD* являются ядерными белками, которые связываются с DNA и регулируют транскрипцию других генов, называемых «поздними» [1, 4]. К продуктам поздних генов относятся, например, белок S-100, нейрофиламенты, рецепторы нейротрофинов (*TrkA*, *TrkB* и *TrkC*), синапсина, тирозингидроксилаза, фактор удлинения 1 α (*elongation factor 1 α* – *EF1 α*) (ген *EF1 α* контролируется *C/EBP*), который обеспечивает рост нервных терминалей, а также нейральные молекулы клеточной адгезии (*neural cell adhesion molecules* – *nCAM*) [1, 6, 14, 18]. В частности, уровень *nCAM* в активированных нейронах коррелирует с уровнем *CaMK II* и отчетливо увеличивается в период 12-48 часов после опытов [18, 22]. В то же время Sandi S. et al. (2003) отмечают, что при создании фоновой стрессовой обстановки содержание *nCAM* в *dentate gyrus* гиппокампа не увеличивается и при этом нарушается консолидация LTM [22].

Продукты поздних генов доставляются к месту своего «функционального предназначения» чаще всего в виде mRNA (большая часть) и лишь частично – в виде собранного белка. Возможно это обусловлено тем, что транспорт и локализация одной mRNA энергетически более выгодны, чем перемещение множества синтезированных на ней белковых молекул. Транспорт как mRNA, так и белка осуществляется строго направленно. Еще в ядре вновь транскрибированная mRNA не диффундирует свободно, а образует треки благодаря связям с нерастворимыми структурами ядерного матрикса. В пределах этого трека происходит процессинг mRNA [2]. При переходе mRNA из ядра в цитоплазму происходит полная смена ассоциированных с ней белков, состав которых определяет ход дальнейшей трансляции mRNA. Ельская А.В. (1999) в своем обзоре отмечает, что для транслируемых mRNA спектр ассоциированных с ними белков и факторов общий для всех типов mRNA, тогда как для нетранслируемых этот спектр значительно более широк и специфичен. На этом основании делается вывод о том, что дифференциальный контроль трансляции mRNA базируется на системе негативного контроля путем ее стабилизации [3].

Наиболее распространенным механизмом перемещения mRNA в цитоплазме нейрона является ее активный транспорт по цитоскелету [4, 25, 26]. Скорость такого перемещения составляет примерно 0,1 мкм/с, причем на этот процесс негативное влияние оказывают ингибиторы цитоскелетной системы микротрубочек. Пассивный транспорт mRNA в цитоплазме не исключается, однако этот механизм менее вероятен [3]. Как и в ядре, в цитоплазме молекулы mRNA перемещаются строго направленно. Их фиксация и последующая трансляция, как правило, происходит в местах скопления филаментозных структур цитоскелета (например – PSD), где так же отмечается и концентрация компонентов аппарата трансляции. Все это обеспечивает синтез белка в строго определенных компартментах нейрона – в местах образования синапсов, в точках роста отростков и т.д. [3, 10, 26].

Однако остается открытым вопрос: каким образом осуществляется выбор локуса иммобилизации mRNA? Ведь, например, mRNA *nCAM* фиксируется именно в том месте нейрита, где осуществляется образование синапса, минуя множество других уже существующих PSD. В опытах на изолированных нейронах (один чувствительный и два моторных) Kandel E.R. (2001) показал, что образование синаптических контактов с соседними нейронами происходит только в том локусе чувствительного нейрона, вблизи которого осуществлялась пятикратная инфузия микродоз серотонина, то есть в «меченых»

участках [19]. Данные о важности серотонинэргической системы для «маркировки» участков внешнего воздействия на нейрон были отмечены и в других исследованиях [11]. Полученные данные о том, что при локальном воздействии гистамина, глутамата, избирательной активации NMDA рецепторов также образуются «метки» для фиксации mRNA и облегчается формирование синапсов в определенных компартментах нейрона [16, 18, 26]. Возможный механизм такой маркировки заключается в конформационной перестройке околомембранных образований цитоскелета, что изменяет их сродство к транспортируемым комплексам mRNA-белок и приводит к их заякориванию [10, 18, 19, 26].

Таким образом, весь процесс консолидации долговременных воспоминаний условно можно представить в виде следующих последовательных процессов:

1. Взаимодействие нейротрансмиттера с рецепторами постсинаптической мембраны, изменение ее проницаемости для Ca^{2+} и активация первичных сигнальных систем – *AC*, *CaMK II*.
2. Активация первичных и вторичных сигнальных посредников – *cAMP*, *PKA*.
3. Вовлечение в процесс активации каскада *MAPK* и его конечных эффекторных киназ – *JNK*, *p38* и *ERK*.
4. Активация факторов транскрипции (*AP-1*, *CREB* и др.).
5. Экспрессия ранних генов (*c-fos*, *c-jun*, *zif268*, ген *C/EBP* и др.) и образование продуктов ранних генов, так же являющихся факторами транскрипции (*c-Jun*, *JunB*, *JunD*, *c-Fos*, *FosB*, *Fra1*, *Fra2* и др.).
6. Экспрессия поздних (эффекторных) генов, транспорт mRNA по нейрону, синтез эффекторных белков в маркированных нейромедиатором локуса нейрона, что приводит к росту нервных терминалей или закреплению новых синаптических контактов.

Литература

1. Анохин, К. В. Экспрессия ранних генов в механизмах памяти // Вестник РАМН. 1998. № 12. С. 58 – 61.
2. Белякова, Н. С., Садофьев, Л. А., Подгорная, О. И. Теория интеграции клеточных напряжений и следствия из нее // Цитология. 1999. Т. 41. № 11. С. 923 – 926.
3. Ельская, А. В. Регуляция белкового синтеза у высших организмов: факты и гипотезы // Молекул. биол. 1999. Т. 33. № 6. С. 1043 – 1053.
4. Турпаев, К. Т., Литвинов, Д. Ю. Редокс-зависимая регуляция экспрессии генов, индуцируемых окисью азота // Молекул. биол. 2004. Т. 38. № 1. С. 56 – 68.
5. A *mitogen-activated protein kinase cascade* in the CA1 / CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory / S. Blum, A.N. Moore, F. Adams, P.K. Dash // J. Neurosci. 1999. Vol. 19. № 9. P. 3535 – 3544.
6. A *synthetic neural cell adhesion molecule mimetic peptide* promotes synaptogenesis, enhances presynaptic function, and facilitates memory consolidation / K. Cambon, S.M. Hansen, C. Venero et al. // J. Neurosci. 2004. Vol. 24. № 17. P. 4197 – 4204.
7. A-kinase anchoring proteins in amygdala are involved in auditory fear memory / M.A. Moita, R. Lamprecht, K. Nader, J.E. Le Doux // Nat. Neurosci. 2002. Vol. 5. № 9. P. 837 – 838.
8. Bozon, B., Davis, S., Laroche, S. A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval // Neuron. 2003. Vol. 40. № 4. P. 695 – 701.
9. *cAMP* activates *MAP kinase* and *Elk-1* through a *B-Raf*- and *Rap1*-dependent pathway / M.R. Vossler, H. Yao, R.D. York et al. // Cell. 1997. Vol. 89. P. 73 – 82.
10. Crow, T., Xue-Bian, J.J. One-trial in vitro conditioning regulates

a cytoskeletal-related protein (CSP24) in the conditioned stimulus pathway of *Hermisenda* // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. № 24. P. 10514 – 10518.

11. *Curragh, E.F.* A proposed mechanism for memory and learning based upon very high frequency signals in the serotonergic neuronal system // *J. Physiol. Paris.* 1997. Vol. 91. № 2. P. 63 – 67.

12. *Differential* role of hippocampal cAMP-dependent protein kinase in short- and long-term memory / M.R. Vianna, L.A. Izquierdo, D.M. Barros et al. // *Neurochem. Res.* 2000. Vol. 25. № 5. P. 621 – 626.

13. *Disruption* of dendritic translation of CaMKII α impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation / S. Miller, M. Yasuda, J.K. Coats et al. // *Neuron.* 2002. Vol. 36. № 3. P. 507 – 519.

14. *Gomez-Pinilla, F., So, V., Kesslak, J.P.* Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus // *Brain Res.* 2001. Vol. 904. № 1. P. 13 – 19.

15. *Hippocampal* cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of an inhibitory avoidance learning / R. Bernabeu, P. Schmitz, M. P. Fallace et al. // *NeuroReport.* 1996. Vol. 7. P. 585 – 588.

16. *Improvement* in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells / M.G. Giovannini, M. Efoudebe, M.B. Passani et al. // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23. № 27. P. 9016 – 9023.

17. *Intra-hippocampal* infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory / M.R.M. Vianna, L.A. Izquierdo, D.M. Barros et al. // *Behav. Pharmacol.* 1999. Vol. 10. P. 223 – 227.

18. *Jodar, L., Kaneto, H.* Synaptic plasticity: stairway to memory / *Jpn. J. Pharmacol.* 1995. Vol. 68. № 4. P. 359 – 387.

19. *Kandel, E.R.* The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses // *Science.* 2001. Vol. 294. № 5544. P. 1030 – 1038.

20. *Lisman, J.E., Zhabotinsky, A.M.* A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly // *Neuron.* 2001. Vol. 31.

P. 191 – 201.

21. *Localized* neuronal activation in the zebra finch brain is related to the strength of song learning / J.J. Bolhuis, G.G. Zijlstra, A.M. den Boer-Visser, E.A. Van Der Zee // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. № 5. P. 2282 – 2285.

22. *Modulation* of hippocampal NCAM polysialylation and spatial memory consolidation by fear conditioning / C. Sandi, J.J. Merino, M.I. Cordero et al. // *Biol. Psychiatry.* 2003. Vol. 54. № 6. P. 599 – 607.

23. *Overexpression* of and RNA interference with the CCAAT enhancer-binding protein on long-term facilitation of Aplysia sensory to motor synapses / J.A. Lee, H.K. Kim, K.H. Kim et al. // *Learn Mem.* 2001. Vol. 8. № 4. P. 220 – 226.

24. *Resveratrol*, map kinases and neuronal cells: might wine be a neuroprotectant? / Tredici G., Miloso M., Nicolini G. et al. // *Drugs. Exp. Clin. Res.* 1999. Vol. 25. № 2-3. P. 99 – 103.

25. *Steward, O.* mRNA at synapses, synaptic plasticity, and memory consolidation // *Neuron.* 2002. Vol. 36. № 3. P. 338 – 340.

26. *Steward, O., Worley, P.* Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? // *Neurobiol. Learn Mem.* 2002. Vol. 78. № 3. P. 508 – 527.

27. *Suge, R., McCabe, B.J.* Early stages of memory formation in filial imprinting: Fos-like immunoreactivity and behavior in the domestic chick // *Neuroscience.* 2004. Vol. 123. № 4. P. 847 – 856.

28. *Sweatt, J.D.* The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory // *J. Neurochem.* 2001. Vol. 76. № 1. P. 1 – 10.

29. *The RAS* effector RIN1 modulates the formation of aversive memories / A. Dhaka, R.M. Costa, H. Hu et al. // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23. № 3. P. 748 – 757.

30. *Transcriptional* profiling reveals regulated genes in the hippocampus during memory formation / C.P. Donahue, R.V. Jensen, T. Ochiishi et al. // *Hippocampus.* 2002. Vol. 12. № 6. P. 821 – 833.

РЕПОЗИТОРИЙ