

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Конструкторско-технологический институт вычислительной техники
Сибирского Отделения Российской Академии Наук
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»

На правах рукописи

Лисачев Павел Дмитриевич

Нейропластичность и экспрессия генов
(нейро-глиальное взаимодействие и формирование долговременной
потенциации синаптической передачи)

03.03.01 – Физиология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук,
профессор, академик РАН
Штарк Маркс Борисович

Новосибирск – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| Глава 1. ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| Глава 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 11 |
| 2.1. Кратковременная и долговременная память | 11 |
| 2.2. Роль глии в синаптической передаче и пластичности..... | 12 |
| 2.3. Долговременная потенция и пластические процессы в нейронных сетях | 15 |
| 2.4. Внутриклеточные сигнальные пути | 18 |
| 2.5. Регулируемые нейрональной активностью гены | 24 |
| 2.5.1. <i>Ранние гены</i> | <i>27</i> |
| 2.5.2. <i>Гены, экспрессирующиеся преимущественно в глие.....</i> | <i>31</i> |
| 2.6. Белки S100 | 35 |
| 2.6.1. <i>S100A1</i> | <i>35</i> |
| 2.6.2. <i>S100B</i> | <i>36</i> |
| 2.7. Вероятные пути регуляции транскрипционного фактора p53 при формировании долговременной потенции | 44 |
| 2.8. Проблемы и перспективы развития исследований молекулярно- генетических аспектов долговременной потенции | 50 |
| Глава 3. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 53 |
| 3.1. Животные | 53 |
| 3.2. Приготовление срезов гиппокампа | 53 |
| 3.3. Электрофизиологические эксперименты..... | 54 |
| 3.4. Ингибиторы сигнальных путей..... | 58 |
| 3.5. Хранение материала..... | 61 |
| 3.6. ПЦР в реальном времени..... | 62 |
| 3.7. Вестерн блот | 67 |
| 3.8. Хроматиновая иммунопреципитация | 68 |
| 3.9. Статистическая обработка | 70 |
| Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 71 |
| 4.1. Оценка эффективности протоколов стимуляции | 71 |

| | |
|--|-----|
| 4.2. Динамика уровня мРНК <i>S100B</i> и <i>S100A1</i> после тетанизации или низкочастотной стимуляции в поле CA1 гиппокампа крыс | 74 |
| 4.3. Динамика уровня мРНК ранних генов <i>Fos</i> , <i>Jun</i> , <i>JunB</i> и <i>Egr1</i> после индукции ДВП в поле CA1 гиппокампа крыс | 76 |
| 4.4. Экспрессия <i>S100B</i> во временном интервале 10-360 мин после тетанизации | 80 |
| 4.5. Участие p53 в регуляции гена <i>S100B</i> при формировании ДВП | 82 |
| 4.6. Регуляция экспрессии p53 при формировании ДВП | 88 |
| 4.7. Вклад глутаматных рецепторов NMDA-типа и протеинкиназ в регуляцию <i>S100B</i> при формировании ДВП | 91 |
| 4.8. Экспрессия генов-мишеней p53 в ранней фазе долговременной потенциации | 99 |
| 4.9. Развитие долговременной потенциации в условиях ингибирования p53-зависимой транскрипции | 120 |
| Глава 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ | 122 |
| 5.1. Зависимость экспрессии <i>S100B</i> и <i>S100A1</i> от нейронной активности в срезах гиппокампа | 122 |
| 5.2. Экспрессия ранних генов как характеристика экспериментальной модели | 125 |
| 5.3. Транскрипционный фактор p53 участвует в регуляции генов при формировании долговременной потенциации | 127 |
| 5.4. Молекулярная сеть, определяющая зависимость p53 и экспрессии <i>S100B</i> от нейронной активности | 129 |
| 5.5. На пороге расшифровки p53-зависимого компонента транскрипционной программы ДВП | 133 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 140 |
| ВЫВОДЫ | 145 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ | 147 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 149 |

Глава 1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Долговременные изменения эффективности синаптической передачи являются ключевым физиологическим механизмом обучения и памяти. Важную роль в сохранении синаптических модификаций играет экспрессия генов. Реорганизация синапсов сопровождается значительными изменениями в транскриптоме мозга, анализ которых представляется необходимым для выяснения механизмов нейропластичности.

Одним из наиболее исследованных проявлений нейрональной пластичности является долговременная потенция синаптической передачи (ДВП) – феномен, лежащий в основе обучения и памяти (Bliss and Lomo, 1973; Voronin, 1983; Скребицкий и Чепкова, 1999; Leslie and Nedivi, 2011; Скребицкий и Штарк, 2012). Самая распространенная модель ДВП – увеличение ответов постсинаптических нейронов на тестирующую стимуляцию пресинаптических волокон после их кратковременной высокочастотной стимуляции (тетанизации или тэта-стимуляции).

Временная структура ДВП представлена ранней фазой, зависящей от модификации предсуществующих синаптических белков, и поздней, требующей синтеза новых белков и экспрессии генов (Reymann and Frey, 2007; Abraham and Williams, 2008; Leslie and Nedivi, 2011). Динамика транскриптома при формировании ДВП интенсивно исследуется (Hevroni et al., 1998; Matsuo et al., 2000; French et al., 2001a; Lee et al., 2005; Leslie and Nedivi, 2011), в том числе с помощью ДНК-микрочипов (Park et al., 2006; Wibrand et al., 2006; Håvik et al., 2007; Ploski et al., 2010; Ryan et al., 2011, 2012), но круг нерешенных проблем остается далеко не исчерпанным.

Обычно анализ молекулярно-генетических аспектов нейропластичности ограничивают процессами, происходящими в

нейронах. Между тем, глия играет важную роль в регуляции синаптической передачи. Астроциты, основной подтип глии, отвечают на выделение нейромедиаторов увеличением внутриклеточной концентрации кальция и высвобождением в межклеточное пространство глиальных продуктов, модулирующих синаптическую эффективность (Perea and Araque, 2010). И среди этих продуктов – не только классические медиаторы, но и белки. Однако вклад генетического аппарата глиальных клеток в синаптическую пластичность практически неизвестен. Поэтому изучение связи нейрональной пластичности с экспрессией глиальных генов является актуальной задачей нейрофизиологии.

Одним из важнейших секретируемых глией регуляторных факторов является белок S100B. В физиологических концентрациях он проявляет трофические свойства и препятствует активации макрофагов мозга, в патологических условиях его уровень может повышаться, и он, напротив, становится токсичным (Donato et al., 2009).

S100B модулирует нейронную активность (Sakatani et al., 2008) и синаптическую пластичность (Nishiyama et al., 2002). Для S100B-нокаутных мышей характерна улучшенная пространственная память и память о страхе, а также повышенная ДВП в гиппокампе (Nishiyama et al., 2002). В то же время у таких животных быстрее развиваются судороги при киндлинге (Dyck et al., 2002), что могло бы отчасти являться следствием изменения динамики ДВП, поскольку ДВП считается одним из наиболее вероятных механизмов распространения судорожной активности при киндлинге (Годухин, 2005). По-видимому, нормальная экспрессия S100B необходима для стабильного функционирования мозга.

Обучение у крыс сопровождается увеличением количества белка S100B в мозге (Шерстнев и др., 2001). Таким образом, S100B – перспективный объект для изучения связи нейропластичности с экспрессией глиальных генов. Он удобен также с методической точки зрения, поскольку не экспрессируется в нейронах в большинстве отделов

мозга, включая гиппокамп – классический объект для изучения молекулярно-клеточных механизмов нейропластичности. Показанное в ранних работах (Hydén and Lange, 1970), с использованием антител к суммарной фракции белков S100, увеличение после обучения уровня S100 в нейронах гиппокампа может указывать на активацию другого гена семейства *S100* – *S100A1*, экспрессирующегося как в глиальных клетках, так и в нейронах гиппокампа (Ackermann et al., 2006).

Интерес к механизмам регуляции экспрессии S100B и S100A1 связан не только с их возможным участием в нейропластичности, но и с вовлечением этих белков в патологические процессы (Wright et al., 2009; Траилин и Левада, 2009; Sorci et al., 2010; Astrand et al., 2013). В частности, аллель *S100B*, характеризующийся повышенным уровнем экспрессии, является фактором риска развития биполярного расстройства (Dagdan et al., 2011).

Наиболее изучена связь с долговременной памятью и синаптической пластичностью семейств транскрипционных факторов CREB (cAMP-responsive element binding protein), C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein), AP-1 (activating protein-1), Egr (early growth response), Rel/NFκB (nuclear factor κB) (Анохин, 1996; Гринкевич и Васильев, 1999; Dyakonova et al., 1999; Alberini, 2009; Alberini and Kandel, 2014). В гене *S100A1* крысы идентифицирована потенциальная AP-1-связывающая последовательность (Zimmer et al., 1995), а в промоторе *S100B* крысы присутствуют потенциальные сайты связывания Egr1. Учитывая важную роль AP-1 и Egr1 в нейропластичности, было бы целесообразно оценить возможность их участия в регуляции экспрессии *S100* на модели долговременной потенциации.

Ген *S100B* также может активироваться транскрипционным фактором p53 (Lin et al., 2004), ключевым регулятором системы апоптоза. Его роль в экспрессии генов, ассоциированной с долговременной потенциацией или обучением, ранее не исследовалась. Однако обучение у моллюсков

сопровождается ацетилизацией в мозге белка с молекулярной массой 53 кДа (Данилова и др., 2010). Возможно, этот белок является фактором p53, активность которого увеличивается при ацетилизации. Кроме того, элементы системы апоптоза (каспазы, белки семейства Bcl2) участвуют в синаптической пластичности (Гуляева, 2004; Кудряшова и др., 2005; Solá et al., 2012; Li and Sheng, 2012). p53 регулирует экспрессию генов некоторых белков семейства Bcl2, среди его мишеней – гены таких важных для синаптической пластичности факторов, как Egr1, каспаза-1 (Lu et al., 2006).

Таким образом, p53 может быть отнесен к вероятным посредникам, связывающим нейропластичность с экспрессией *S100B*. Изучение транскрипционной активности p53 при формировании ДВП представляет также самостоятельный интерес и может значительно расширить существующие представления о регуляции экспрессии генов при ДВП.

В связи с вышеизложенным, были определены следующие цели и задачи настоящей работы.

Цели и задачи исследования

Цель работы: Определить закономерности участия генетического аппарата глии в механизмах нейрональной пластичности и роль транскрипционного фактора p53 в регуляции генов при формировании долговременной потенциации синаптической передачи.

На основе поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать модель связанной с нейропластичностью экспрессии генов семейства *S100* (*S100B*, *S100A1*) в срезах гиппокампа крыс.
2. Оценить роль транскрипционных факторов комплекса AP-1 (Fos, Jun, JunB), Egr1 и p53 в индукции экспрессии *S100* при ДВП.
3. Идентифицировать факторы, ограничивающие активность p53 при ДВП.

4. Исследовать механизмы индукции экспрессии *S100B* при формировании ДВП на уровне внутриклеточных регуляторных каскадов.
5. Исследовать экспрессию мишеней p53 в ранней фазе ДВП и оценить вклад p53 в ее регуляцию с помощью активатора p53 нутлина-3.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Зависимые от нейронной активности нейропластические процессы могут сопровождаться изменением транскрипции генов не только в нейронах, но и в глиальных клетках (астроцитах). При формировании долговременной потенциации синаптической передачи через транскрипционный механизм реализуется увеличение экспрессии глиального фактора *S100B*, модулирующего синаптическую пластичность. Таким образом, генетический аппарат астроцитов вовлечен в механизм нейроглиального взаимодействия, обеспечивающего регуляцию синаптических связей.
2. На основании комплекса экспериментов и данных литературы предложена схема регуляции экспрессии *S100B* при формировании ДВП. В качестве ключевых посредников влияния тетанизации на экспрессию *S100B* выступают Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы (CaMK). Одним из транскрипционных факторов, контролирующих связанную с индукцией ДВП экспрессию *S100B*, оказался p53, что является первым свидетельством его участия в регуляции экспрессии генов при ДВП.
3. Максимальное увеличение связывания p53 с ДНК при ДВП совпадает по времени с уменьшением суммарного уровня белка p53. Таким образом, индукция ДВП сопровождается одновременной активацией позитивных и негативных регуляторов p53, скоординированная работа которых формирует кратковременный биохимический «потенциал действия».
4. Формирование ДВП сопровождается избирательным изменением экспрессии генов-мишеней p53, что объясняется их сложной регуляцией.

5. К вероятным функциям p53-зависимого компонента транскрипционной программы ДВП могут быть отнесены трофическая поддержка клеток мозга в условиях повышенной функциональной нагрузки и гомеостатическое ограничение эффективности возбуждающих синапсов, необходимое для стабильного функционирования мозга.

Научная новизна полученных результатов

Впервые продемонстрировано увеличение экспрессии гена, кодирующего специфичный для глиальных клеток белок S100B, после индукции долговременной потенциации в поле CA1 гиппокампа.

Исследовано влияние различных элементов внутриклеточных регуляторных каскадов на базальную и связанную с индукцией ДВП экспрессию *S100B*. Показано, что убиквитинлигаза Mdm2 (murine double minute 2) и деацетилаза Sirt1 существенно ограничивают базальный уровень мРНК *S100B*, а его увеличение, индуцированное высокочастотной стимуляцией афферентных волокон, зависит от глутаматных рецепторов NMDA-типа (NMDAR) и Ca²⁺/кальмодулин-зависимых протеинкиназ.

Впервые доказано участие транскрипционного фактора p53 в регуляции генов при формировании долговременной потенциации. Обнаружено, что индукция ДВП в гиппокампе сопровождается временным увеличением связывания p53 с промотором гена *S100B*, что и является одной из причин изменения его экспрессии.

Выявлено снижение количества белка p53 при формировании ДВП и показана ключевая роль Mdm2 и Sirt1 в этом феномене.

Идентифицирована группа генов, в регуляции которых при ДВП, возможно, принимает участие p53. Эта группа включает в себя некоторые мишени p53 из семейства *Bcl2*: впервые показано, что в ранней фазе ДВП увеличивается экспрессия *Bax* и уменьшается экспрессия *Bcl2*.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что при формировании долговременной потенциации синаптической передачи генетический аппарат астроцитов оказывается вовлеченным в механизм нейроглиального взаимодействия, отвечающего за тонкую настройку синаптических связей.

Практическая ценность работы

Полученные данные расширяют понимание клеточных механизмов пластичности. Идентификация регуляторной сети, контролирующей экспрессию S100B, может быть полезна для выяснения причин увеличения уровня этого белка в мозге при некоторых заболеваниях, а также для оценки перспектив использования регуляторных факторов в качестве мишеней фармакологического воздействия.

Результаты работы открывают также новое перспективное направление в исследовании молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности, связанное с изучением путей активации и роли p53 в нейропластичности, расширяют потенциальную информативность модели долговременной потенциации в срезах гиппокампа при анализе действия биологически активных веществ.

Глава 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Кратковременная и долговременная память

Пластичность, лежащая в основе обучения и памяти, является фундаментальным свойством нервной системы, обеспечивающим адекватное взаимодействие животного с постоянно меняющейся окружающей средой. Память, способность сохранять приобретенную информацию, разделяется по продолжительности на кратко- и долговременную (Соколов, 1969; Бериташвили, 1974). Кратковременная память – это сохранение информации в течение короткого времени, до десятков минут, не требующее устойчивых изменений нейронных сетей. При формировании долговременной памяти изменения нейронных путей обеспечивают воспроизведение информации в течение недель, месяцев и даже годы спустя. Важным отличием долговременной памяти от кратковременной является наличие в механизме ее формирования этапа, зависящего от синтеза РНК и белка. Если синтез РНК или белка блокируется до или непосредственно после обучения, формирование долговременной памяти нарушается (Davis and Squire, 1984). Обычно для изучения зависимости формирования памяти от белкового синтеза используют ингибиторы трансляции (Sutton and Schuman, 2006; Alberini, 2008; Gold, 2008; Helmstetter et al., 2008; Klann and Sweatt, 2008). Хотя ингибиторы транскрипции, такие как актиномицин D, применялись реже, из-за их токсичности и побочных эффектов (Wetzel et al., 1976; Rainbow, 1979), их использование показало, что транскрипция, как и трансляция, является существенным этапом формирования долговременной памяти (Agranoff, 1967; Squire and Barondes, 1970; Neale et al., 1973; Thut and Lindell, 1974; Wetzel et al., 1976; Pedreira et al., 1996).

Новая информация в течение некоторого периода существует в лабильном состоянии. Однако со временем она становится стабильной и нечувствительной к нарушению, этот процесс называется консолидацией

памяти (McGaugh, 2000). В начальной фазе консолидации формирование памяти может быть нарушено различными воздействиями, включая дополнительное обучение, судороги, травмы, охлаждение мозга, инактивация нейронов, ингибирование транскрипции или некоторых транскрипционных факторов и ингибирование трансляции или избирательная блокада определенных молекулярных путей. После стабилизации память становится нечувствительной к подобным факторам, но может вновь временно стать лабильной в случае реактивации, например, в результате напоминания. Во время этой новой фазы неустойчивости память снова может быть нарушена ингибиторами транскрипции или трансляции. Процесс стабилизации реактивированной памяти называется реконсолидацией (Sara, 2000; Nader et al., 2000; Dudai and Eisenberg, 2004; Alberini, 2005).

Таким образом, в основе пластичности взрослого мозга лежат сложные и недостаточно изученные молекулярные взаимодействия, приводящие к долгосрочным изменениям нейронных сетей и опирающиеся на регулируемую экспрессию генов. Идентификация транскрипционной программы, ассоциированной с формированием памяти, выяснение физиологической роли компонентов этой программы и путей управления ими относятся к важнейшим задачам нейробиологии, решение которых необходимо для целенаправленного поиска и разработки эффективных средств повышения адаптивных возможностей мозга, профилактики и лечения неврологических заболеваний.

2.2. Роль глии в синаптической передаче и пластичности

Традиционно, говоря об экспрессии генов, связанной с синаптической пластичностью, большинство авторов локализуют ее [экспрессию] и связанные с ней регуляторные события в нейронах. Однако функционирование синапсов находится в тесной зависимости от окружающих глиальных клеток. Роль глии в обеспечении структурной,

метаболической и трофической поддержки нейронов хорошо известна (Черноризов, 2008). Безусловно, жизнеобеспечение нейронов исключительно важно для их функционирования, в том числе и для формирования памяти. В частности, обучение у крыс сопровождается увеличением внеклеточной концентрации лактата, и нарушение экспорта лактата из астроцитов или его импорта в нейроны препятствует формированию долговременной памяти и долговременной потенциации в гиппокампе (Suzuki et al., 2011).

В то же время, глиальные клетки привлекают все большее внимание как активные элементы, непосредственно вовлеченные в процессы синаптической передачи и нейрональной пластичности (Виноградова, 2000; Perea and Araque, 2010; Ota et al., 2013). Астроциты, основной подтип глиальных клеток, отвечают на выделение нейромедиаторов увеличением внутриклеточной концентрации кальция и высвобождением в межклеточное пространство глиомедиаторов (глутамата, D-серина, АТФ, аденозина, гамма-аминомасляной кислоты {ГАМК}, фактора некроза опухолей α {TNF α , tumour necrosis factor α }, простагландинов, мозгового нейротрофического фактора {BDNF, brain-derived neurotrophic factor} и др.), которые регулируют нейронную активность и синаптическую пластичность. Растущее осознание реципрокных нейроглиальных взаимодействий как неотъемлемой части межклеточных сигнальных процессов, обеспечивающих функционирование мозга, послужило основой для развития концепции "тройственного синапса", состоящего из пресинаптической терминали, постсинапса и прилегающей к ним глии (Araque et al., 1999).

Источниками индуцированного нейронной активностью увеличения внутриклеточной концентрации кальция в глиальных клетках являются ионотропные рецепторы и потенциалзависимые кальциевые каналы внешней мембраны, зависимый от метаболитных рецепторов выброс кальция из внутриклеточных депо, а также натрий-кальциевые обменники (Parpura et al., 2011).

Вклад разных путей повышения уровня кальция отличается в разных типах глии и меняется в онтогенезе. Например, в глиальных клетках NG2-типа обнаружена кальций-проводящая форма рецепторов AMPA-типа, количество которой значительно снижается в период с первой по вторую неделю после рождения крыс (Ge et al., 2006). Метаботропные рецепторы глутамата mGluR5, эффекты которых опосредуются кальцием, экспрессируются в астроцитах мышей только до 3-ей недели постнатального развития и не обнаруживаются в астроцитах взрослых мышей и людей (Sun et al., 2013). Глутаматные рецепторы NMDA-типа, напротив, экспрессируются в астроцитах неокортекса (Lalo et al., 2006; Lalo et al., 2011) и гиппокампа взрослых грызунов (Zhang et al., 2009) и, по-видимому, отсутствуют в астроцитах ювенильных животных (Condorelli et al., 1993; Steinhäuser and Gallo, 1996), которых часто используют для исследований на культурах клеток. В астроцитах человека также обнаружены функциональные NMDAR (Lee et al., 2011).

В астроцитах экспрессируется субъединица NR3A. Содержащие ее NMDAR не блокируются ионами магния, поэтому для их активации не требуется деполяризация клеток (Palygin et al., 2011).

Возбуждающая передача, в частности, глутаматэргическая, находится под контролем основного тормозного медиатора ЦНС – ГАМК. Однако действие ГАМК на астроциты может быть аналогичным действию глутамата – активаторы рецепторов ГАМК_A или ГАМК_B увеличивают внутриклеточную концентрацию кальция в культивируемых астроцитах и секрецию глиомедиаторов (Lee et al., 2011). Влияние рецепторов ГАМК_A на уровень кальция опосредуется потенциалзависимыми кальциевыми каналами, которые экспрессируются в культивируемых астроцитах, однако в условиях *in situ* в астроцитах поля CA1 эти каналы обнаружить не удалось (Pappura et al., 2011). Следовательно, этот механизм может не работать в срезах гиппокампа.

Глутамат не только стимулирует выделение медиаторов, но и влияет на экспрессию генов в астроцитах. В ранних работах было показано, что инкубация культивируемых астроцитов новорожденных крысят с глутаматом индуцирует фосфорилирование транскрипционного фактора *C/EBP β* (Yano et al., 1996), увеличивает ДНК-связывающую активность комплекса AP-1 и содержание мРНК ранних генов *Fos*, *FosB*, *Jun*, *JunB*, *Egr1* (Condorelli et al., 1993) и *C/EBP β* и подавляет экспрессию *C/EBP δ* (Yano et al., 1996). Эти результаты указывали на то, что нейронная активность способна вызывать глубокие и продолжительные изменения функционального состояния астроцитов.

Влияние нейронной активности на экспрессию глиальных генов было в последующем подтверждено Nevroni et al. (1998), показавшими снижение уровня мРНК *S100B*, экспрессирующегося в основном в глии, в зубчатой извилине крыс через 6 ч после судорог, индуцированных агонистом глутаматных рецепторов каинатом. Снижение экспрессии *S100B* наблюдалось также после индукции долговременной посттетанической потенциации в зубчатой извилине гиппокампа мышей (Park et al., 2006), а тетанизация в поле CA1 гиппокампа крыс сопровождалась увеличением содержания мРНК интерлейкина-1 β (*IL-1 β*) (Schneider et al., 1998) и интерлейкина-6 (*IL-6*) (Jankowsky et al., 2000), которые также экспрессируются преимущественно в глиальных клетках, о чем подробнее пойдет речь в разделе "Регулируемые нейрональной активностью гены".

2.3. Долговременная потенция и пластические процессы в нейронных сетях

С момента открытия Блиссом и соавторами в 1973 г. (Bliss and Lomo, 1973; Bliss and Gardner-Medwin, 1973) долговременная потенция является наиболее исследуемой формой пластичности, связанной с изменением синаптической эффективности. Самая распространенная модель ДВП –

увеличение ответов постсинаптических нейронов на тестирующую стимуляцию пресинаптических волокон после их кратковременной высокочастотной стимуляции (тетанизации или тэта-стимуляции). Увеличение синаптической эффективности наступает через несколько секунд после стимуляции и может длиться несколько дней (месяцев). Важную роль в развитии ДВП играет активность модуляторных гетеросинаптических входов (Huang et al., 2004) и внесинаптические (гуморальные) факторы нейронного и глиального происхождения, такие как BDNF (Patterson et al., 2001), цитокины (McAfoose and Baune, 2009) или S100B (Nishiyama et al., 2002). Активация модуляторных входов способна менять параметры зависимости механизма индукции ДВП от частоты стимуляции, в результате чего ДВП может быть вызвана даже низкочастотной стимуляцией афферентов (Thomas et al., 1996).

Принято считать, что ДВП является нейронным механизмом обучения (Lynch, 2004; Скребицкий и Чепкова, 1999; Leslie and Nedivi, 2011). Хотя существует множество косвенных свидетельств в пользу этой концепции, которые сводятся к наличию корреляций между способностью к обучению и выраженностью ДВП (Скребицкий и Чепкова, 1999), прямых доказательств того, что обучение сопровождается формированием ДВП, пока немного (Whitlock et al., 2006), что связано с несколькими причинами. Во-первых, для устойчивого результата обучения необходимы постоянные повторы тренинга, причем из-за индивидуальных особенностей для разных животных – различное число повторов. Это приводит к неточностям в определении молекулярных и электрофизиологических маркеров формирования ДВП. Во-вторых, синаптические изменения, связанные с ДВП, могут быть достаточно разбросанными в объеме изучаемой нервной структуры, содержащей огромное количество немодифицированных синапсов, и поэтому труднодетектируемыми. В-третьих, одновременная индукция ДВП и долговременной депрессии при обучении в разных (соседних) синапсах может приводить к некорректности регистрации каких-либо

электрофизиологических изменений на уровне популяции нейронов (Whitlock et al., 2006).

По-видимому, наиболее распространенной в ЦНС и наиболее изученной является зависимая от глутаматных рецепторов NMDA-типа ДВП, классическими примерами которой являются ДВП синапсов перфорантных волокон на гранулярных клетках зубчатой извилины (Bliss and Lomo, 1973) и синапсов коллатералей Шаффера на пирамидных клетках поля CA1 (Alger and Teyler, 1976; Кичигина, 1979).

В 1984 г. Манфред Круг с соавторами (Krug et al., 1984) обнаружили зависимость длительности ДВП от белкового синтеза. Дальнейшие исследования показали, что критичным для формирования ДВП является белковый синтез в постсинаптическом нейроне (Otani and Abraham, 1989; Frey et al., 1989), хотя также отмечается зависимое от активации NMDA-рецептора увеличение синтеза белков пресинаптических везикул (Lynch et al., 1994). Однако ДВП активирует не только процессы синтеза белков, но и процессы их деградации, и ингибирование протеасом нарушает сохранение ДВП (Kargova et al., 2006) и облегчает формирование долговременной депрессии (Li et al., 2015).

Различают две основные стадии ДВП: раннюю – фазу индукции, длящуюся обычно менее часа, и позднюю – продолжающуюся несколько часов и больше (до года). Ранняя ДВП обуславливается модификациями уже существующих синаптических белков (в основном, процессами фосфорилирования/дефосфорилирования), поздняя же требует белкового синтеза и генетической экспрессии (Reymann and Frey, 2007; Abraham and Williams, 2008; Leslie and Nedivi, 2011).

Наибольший интерес вызывает поздняя стадия ДВП и переход от ранней стадии к поздней. На клеточном уровне поддержание поздней ДВП связано с такими структурными перестройками синапсов, которые могут фиксировать изменения синаптической силы (Yuste and Bonhoeffer, 2001; Abraham and Williams, 2003; Malenka and Bear, 2004). Синаптическое

усиление связано с ростом размеров синапсов за счет образования новых дендритных шипиков, увеличением существующих и разрастанием ассоциированного с шипиком постсинаптического уплотнения (postsynaptic density, PSD) (Bonhoeffer and Yuste, 2002; Matsuzaki et al., 2004). Морфологические изменения синапса происходят в результате интенсификации процессов дендритного синтеза белков и реорганизации цитоскелета (Hering and Sheng, 2001; Lisman and Zhabotinsky, 2001; Steward and Schuman, 2001; Ju et al., 2004; Schwechter and Tolia, 2013).

По разным оценкам, в первые 4-8 часов ДВП поддерживается за счет синтеза белка на матрице преисшествующих мРНК, а генетическая экспрессия требуется для более поздних стадий (Sajikumar et al., 2005; Vickers et al., 2005; Huang and Kandel, 2005). С другой стороны, нарушение CREB-зависимой генной экспрессии приводит к нарушению сохранения ДВП, которое становится статистически достоверным уже через 75 мин после тетанизации (Kovács et al., 2007). Подобные противоречия могут отражать как разную степень вовлечения в ДВП генетической экспрессии в разных экспериментальных моделях, так и сложность учёта всех побочных (в т.ч. компенсаторных) эффектов вмешательства в работу биохимического аппарата клетки.

2.4. Внутриклеточные сигнальные пути

Критическим событием, приводящим к индукции ДВП, является увеличение концентрации ионов кальция в постсинаптической клетке (West et al., 2001; West et al., 2002; Greer and Greenberg, 2008; Mellström et al., 2008; West and Greenberg, 2011). Это достигается через активацию: 1) потенциалзависимых кальциевых каналов L-, N-, P/Q-, R-типов; 2) лигандзависимых ионных каналов, включая глутаматные NMDA- и AMPA-рецепторы; 3) нейротрансмиттерных рецепторов, сопряженных с G-белками, активирующими фосфолипазу C, которая, в свою очередь, стимулирует

высвобождение кальция из внутриклеточных депо. Хотя каждый из этих путей приводит к значительному увеличению концентрации внутриклеточного кальция, наблюдаются различные эффекты в зависимости от конкретного способа попадания последнего в клетку.

Активация протеинкиназ PKC, PKA, Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых киназ II и IV и митогенактивируемых протеинкиназ (MAPK, mitogen-activated protein kinase) – основных сигнальных молекул, связывающих активированный синапс с ядром – важна как для ранней, так и для поздней ДВП, т.к. с одной стороны, индукция этих посредников приводит к активации факторов транскрипции, например, CREB и Elk1, что можно наблюдать при поздней ДВП, а с другой – временно модифицирует синаптические белки-мишени, например, субъединицы рецепторов глутамата (Carafoli et al., 2001; West et al., 2001; Wood et al., 2006). Последнее приводит к увеличению их проводимости и дополнительному входу кальция в клетку. Кроме того, взаимодействие этих протеинкиназ с белками матрикса (scaffold) (Schaeffer et al., 1998; Morrison, 2001) обеспечивает локальное активирование сигнального пути, что выражается в накоплении в зоне связывания фосфорилированных мишеней. Активность киназ модулируется соответствующими фосфатазами – PP2A, МКР и PP1. Предполагается, что для перехода от ранней к поздней ДВП необходим переход некоторых киназ в постоянно активное состояние (Osten et al., 1996; Bhala et al., 2002; Miller et al., 2005; Smolen et al., 2008).

Возможные пути переноса сигнала от синапса к ядру включают в себя распространение мембранной деполяризации от дендритов к телу клетки (и, соответственно, активацию соматических потенциалзависимых кальциевых каналов), кальций-индуцированное высвобождение кальция из внутренних депо, прямую транслокацию кальций-связывающего белка кальмодулина от периферийных каналов в ядро и локальную Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую активацию сигнальных путей рядом с кальциевыми каналами, за которой следует транслокация киназ в ядро. При активации Ras/MAPK-пути ERK (extracellular signal-regulated kinase) фосфорилирует и активирует киназу

CREB – RSK2 (90 kDa ribosomal S6 kinase 2), димерная ERK и RSK2 попадают в ядро, возможно, при участии протеинкиназы А (PKA), и RSK2 фосфорилирует CREB, и/или ERK в мономерной форме пассивно проникает в ядро и активирует транскрипционный фактор Elk1 (Adachi et al., 1999; Casar et al., 2008).

Кроме активации сигнальных молекул, на ранней стадии ДВП может происходить увеличение их количества за счет процессов трансляции и ингибирования деградации (Miyamoto, 2006).

Предполагается, что для установления поздней фазы ДВП требуется параллельная активация различных нейротрансмиттерных систем (Sajikumar et al., 2005). Тетанизация, включающая одновременную стимуляцию тысяч волокон, активирует более чем один вид нейротрансмиттерных входов, именно их кооперативная работа индуцирует позднюю ДВП.

Факторы транскрипции. Наиболее изучена связь с долговременной памятью и синаптической пластичностью семейств транскрипционных факторов CREB, С/ЕВР, AP-1, Egr и Rel/NFκB (Alberini, 2009). CREB и NFκB экспрессируются постоянно и регулируются, в первую очередь, за счет посттрансляционных модификаций (фосфорилирование/дефосфорилирование) и белок-белковых взаимодействий. Регуляция транскрипционных факторов семейства Egr, С/ЕВР и многих факторов комплекса AP-1 (таких как Fos, Jun, JunB), кодируемых ранними генами, основана преимущественно на изменении их содержания в клетках, хотя для активации Jun необходимо также его фосфорилирование киназой JNK (Турпаев, 2006), а С/ЕВР регулируется, например, MAP-киназами (Yamamoto et al., 1999).

Фосфорилирование CREB по серину 133 приводит к присоединению коактиватора транскрипции СВР (CREB-binding protein) к CREB, связыванию комплекса CREB-СВР с регуляторным элементом CRE (cAMP-responsive element) и последующему началу транскрипции (Kwok et al., 1994). CREB

также может быть фосфорилирован по серинам 129, 142 и 143 (Lonze and Ginty, 2002; Kornhauser et al., 2002).

Гены с CRE в промоторной области исчисляются сотнями (Mayr and Montminy, 2001; Impey et al., 2004) и относятся к самым разнообразным функциональным группам: ростовые факторы BDNF и TNF α , тирозингидроксилаза (фермент, лимитирующий скорость биосинтеза катехоламинов), Bcl-2 (антиапоптозный белок), синапсин I (пресинаптический белок), транскрипционные факторы Fos и Egr1 (Mayr and Montminy, 2001; West et al., 2002).

Усиление CREB-зависимой экспрессии генов способствует формированию и поддержанию ДВП синапсов CA3-CA1 (Barco et al., 2002, 2005; Marie et al., 2005), тогда как ее (экспрессии) ингибирование приводит к дефициту некоторых форм ДВП (Pittenger et al., 2002; Huang et al., 2004). С другой стороны, нокаут специфичных изоформ CREB может приводить к сверхэкспрессии других CRE-связывающих белков (Hummler et al., 1994; Blendy et al., 1996), которые компенсируют дефицит активности CREB (Gass et al., 1998; Balschun et al., 2003). CREB-зависимая экспрессия генов не только регулирует синаптическую пластичность, но и увеличивает возбудимость пирамидных нейронов в CA1, причем длительная активация CREB приводит к развитию судорожных состояний и гибели пирамидных и гранулярных нейронов в гиппокампе (Lopez de Armentia et al., 2007).

Фосфорилированию CREB препятствует кальций-зависимая активация фосфатаз. С другой стороны, для CREB-зависимой экспрессии генов (по крайней мере, индуцированной деполяризацией) необходима кальций-зависимая щелочная фосфатаза – кальцинейрин (Kingsbury et al., 2007).

Зависимая от нейронной активности экспрессия генов может также регулироваться нейрон-специфичным фактором CaRF (calcium-response factor), который связывается с кальций-респонсивным элементом (CaRE) и инициирует транскрипцию в ответ на деполяризацию и связанную с ней активацию кальциевых L-каналов, но не на увеличение уровня цАМФ (Tao et

al., 2002). Регуляция CaRF осуществляется CaMKII-, PI3K- и MEK-зависимым путем (Zheng et al., 2011).

Транскрипционные факторы могут регулироваться поступающим в ядро кальцием напрямую, минуя посредничество киназных/фосфатазных каскадов. К таким факторам относится DREAM (downstream regulatory element (DRE) antagonist modulator), также известный как кальсенилин или KChIP3 (K-channel-interacting protein 3). DREAM является первым известным фактором транскрипции, точнее – репрессором, который прямо регулируется связыванием с кальцием (Carrion et al., 1999; Osawa et al., 2001). Мишенью DREAM является, в частности, ген *Fos* (Carrion et al., 1999). Именно через DRE опосредуется трансактивация *Fos* глутаматом в культурах глиальных клеток (Edling et al., 2007).

Факторы транскрипции могут находиться в латентном состоянии в цитоплазме, а при активации перемещаться в ядро, как, например, представители семейств C/EBP (Metz and Ziff, 1991), NF-ATc (nuclear factor of activated T-cells) (Graef et al., 1999) и NFκB (Hayden and Ghosh, 2008). В нейронах гиппокампа при активации потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа NF-ATc4 активируется (дефосфорилируется) Ca²⁺-зависимой фосфатазой кальцинейрином и транслоцируется в ядро (Graef et al., 1999). Неактивное состояние в цитоплазме членов семейства NFκB поддерживается их взаимодействием со специфичным ингибитором IκB. Фосфорилирование IκB ведет к ее убиквитинилированию и последующей деградации, в результате NFκB транслоцируется в ядро и регулирует транскрипцию (Hayden and Ghosh, 2008). Мембранная деполяризация с помощью KCl, синаптическая активность или фармакологическая стимуляция рецепторов глутамата активируют NFκB в нейронах (Guerrini et al., 1995; Kaltschmidt et al., 1995; Meberg et al., 1996), но не в астроцитах, где он может активироваться цитокинами, такими как интерлейкин-1α или TNFα (Guerrini et al., 1995). NFκB вовлечен как в формирование ДВП, так и в индукцию TNFα-зависимой долговременной депрессии, вызываемой в синапсах CA3-

CA1 низкочастотной (1 Гц) стимуляцией коллатералей Шаффера (Albensi and Mattson, 2000).

Коактиваторы/корепрессоры транскрипции. Активированные факторы транскрипции тесно взаимодействуют и корегулируются с молекулами, контролирующими хроматиновую структуру и, тем самым, доступность генов для комплексов ДНК-зависимых РНК-полимераз II (Меркулова и др., 2013). К таким молекулам относятся ацетилтрансферазы и деацетилазы гистонов, которые играют роль общих активаторов/репрессоров, способствующих или препятствующих началу транскрипции. Однако традиционное упоминание в названиях этих ферментов гистонов не означает их полную субстратную избирательность, они вовлечены во внутриклеточные сигнальные процессы на самых разных уровнях (Spange et al., 2009).

СВР является коактиватором для многих факторов транскрипции, относится к классу гистоновых ацетилтрансфераз и содержит множественные функциональные домены. Домен KIX обеспечивает селективность связывания СВР с разными фосфорилированными формами CREB (Parker et al., 1998). Фосфорилирование CREB по S142 и S143 блокирует взаимодействие СВР с CREB, фосфорилированным по S133, хотя при стимуляции, вызывающей сильную CREB-зависимую экспрессию генов, наблюдается фосфорилирование всех трех серинов (Kornhauser et al., 2002). Возможность взаимодействия между СВР и CREB по разным сайтам или связывание CREB с другими коактиваторами транскрипции приводит к образованию альтернативных белковых комплексов с CREB (West et al., 2001). Было показано, что СВР критичен для гиппокамп-зависимой долговременной памяти и синаптической пластичности гиппокампа (Wood et al., 2006). Для активации зависимой от нейронной активности СВР-зависимой транскрипции необходимо фосфорилирование СВР киназой CaMKIV (Impey et al., 2002).

Коактиваторы CREB TORC (transducer of regulated CREB activity) увеличивают транскрипционную активность CREB независимо от фосфорилирования S133 (Conkright et al., 2003) и играют важную роль в формировании ДВП (Kovács et al., 2007).

Интересно, что сам CREB может выступать в качестве коактиватора других транскрипционных факторов. В культурах клеток было показано, что CREB, фосфорилированный киназой CaMKIV в положении S133, может напрямую взаимодействовать с p53, увеличивая при этом его транскрипционную активность (Arnould et al., 2002).

2.5. Регулируемые нейрональной активностью гены

Идентификации генов, экспрессия которых изменяется под влиянием нейронной активности (в том числе – связанной с нейропластичностью), посвящено большое количество работ. Существенный прогресс в этой области был достигнут с развитием технологии ДНК-микрочипов. Масштабные скрининговые исследования выявили сотни регулируемых активностью генов (РАГ) со сложной динамикой экспрессии после разных видов стимуляции: электрошока (French et al., 2001b; Altar et al., 2004), деполяризации мембраны, вызванной KCl (Li et al., 2004b), стимуляции рецепторов глутамата (Hevroni et al., 1998; Hong et al., 2004) или BDNF (Wibrand et al., 2006), обучения (Cavallaro et al., 2002; Leil et al., 2004; Levenson et al., 2004; Ploski et al., 2010) и индукции ДВП (Hevroni et al., 1998; Matsuo et al., 2000; Lee et al., 2005; Park et al., 2006; Wibrand et al., 2006; Håvik et al., 2007; Ploski et al., 2010; Ryan et al., 2011, 2012).

Получаемые с помощью ДНК-микрочипов результаты недостаточно надежны и требуют дополнительной верификации, в ранних работах для этого использовалась гибридизация *in situ*, в настоящее время обычно используют ПЦР в реальном времени. Кроме того, для снижения вероятности ложного зачисления гена в категорию РАГ используются статистические

поправки на множественные сравнения, а также произвольно выбираемые пороги изменения экспрессии, в пределах которых изменения игнорируются. В результате, авторы упомянутых выше исследований иногда сообщают только об ограниченном числе верифицированных РАГ.

Масштабные исследования динамики транскриптома при формировании ДВП проводились исключительно на зубчатой извилине гиппокампа и преимущественно с индукцией ДВП *in vivo*. Та же тенденция наблюдается в работах, посвященных более детальной характеристике отдельных РАГ. Эксперименты *in vivo* дают более физиологически релевантные результаты, кроме того, в этих условиях индукция ДВП вызывает большее увеличение экспрессии генов, по сравнению с экспериментами на срезах гиппокампа (Jankowsky et al., 2000; French et al., 2001a). Однако стимуляция коллатералей Шаффера *in vivo* часто вызывает у животных судороги, что заставляет экспериментаторов снижать интенсивность стимуляции (French et al., 2001a) или применять анестетики (Jankowsky et al., 2000) и, тем самым, ограничивает возможности использования этой модели.

Возможно, это является одной из причин преобладания модели ДВП в зубчатой извилине *in vivo* в исследованиях экспрессии генов, связанной с нейропластичностью. Однако поле CA1 широко используется как при исследовании синаптической пластичности, так и при изучении действия биологически активных препаратов (Чепкова и др., 2001; Maher et al., 2006; Jing et al., 2009; Капай и др., 2010) и механизмов эпилептогенеза (Годухин, 2005), и недостаток сведений о влиянии нейронной активности на состояние генетического аппарата клеток ограничивает возможности интерпретации получаемых результатов. В то же время переносить закономерности, выявленные в зубчатой извилине, на другие области гиппокампа затруднительно. Даже обладающие одинаковой эргичностью нейроны, как, например, глутаматэргические гранулярные клетки зубчатой извилины и пирамидные нейроны полей CA1-CA4 гиппокампа, имеют различающиеся

транскриптомы (Lein et al., 2004), которые могут по-разному регулироваться при формировании ДВП (French et al., 2001a).

Обращает на себя внимание также сравнительно небольшая степень перекрытия представляемых разными авторами списков РАГ. Одной из причин этого, помимо очевидного разнообразия экспериментальных протоколов, является высокая степень лабильности индуцированных высокочастотной стимуляцией изменений генной экспрессии. В экспериментах Ryan et al. (2011, 2012), из 226 и 190 генов, экспрессия которых менялась, соответственно, через 20 мин и 5 ч после тетанизации, общими были только 8. Park et al. (2006) также показали быстрые изменения транскрипционных профилей в диапазоне 30-120 мин после тетанизации с интервалом 30 мин.

В связи с этим, особое значение приобретает такой параметр экспериментальной процедуры, как общая продолжительность стимуляции, особенно, когда речь идет об исследовании ранней фазы индукции транскрипции. Очевидно, что эффекты распределенных во времени (до 45 мин, Matsuo et al., 2000) стимулов будут формировать сложную интерференционную картину, анализ которой, хотя и интересен, так как в реальной жизни животные действительно имеют дело с непрерывным потоком информации, но может оказаться крайне трудной задачей. С этой точки зрения наиболее оптимальным выглядит протокол тетанизации, использованный Park et al. (2006), продолжительность которого составляет всего 1,5 мин (4 разряда (100 Гц, 1 с) с интервалом 30 с). Сходный протокол использовали Schneider et al. (1998) в поле CA1 гиппокампа крыс – 3 разряда (100 Гц, 1 с) с интервалом 1 мин.

Другим важным фактором, влияющим на динамику экспрессии генов в экспериментах на срезах гиппокампа, по-видимому, является температура. В экспериментах на срезах гиппокампа, проводившихся при комнатной температуре (24-26°C), не удалось обнаружить изменений экспрессии *Egr1* ни в CA1 (French et al., 2001a), ни в зубчатой извилине (French et al., 2001a;

Park et al., 2006). Однако при температуре 30°C и выше индукция ДВП в поле CA1 срезов гиппокампа сопровождается увеличением количества мРНК *Egr1* (Mackler et al., 1992; Roberts et al., 1996).

В свете этих данных, аргументация авторов, изучающих экспрессию генов на срезах гиппокампа при комнатной температуре (Park et al., 2006), которые указывают на снижение скорости деградации РНК при уменьшении температуры, представляется неубедительной, так как нарушение динамики синтеза РНК в данном случае, по-видимому, производит больший эффект.

В целом, динамика транскриптома после тетанизации выглядит как уникальная характеристика конкретной модели, своего рода "отпечатки пальцев". Помимо методических разногласий, эта уникальность усугубляется разнообразием анализируемых временных точек, особенно в тех случаях, когда такая точка только одна, что ограничивает возможность интер/экстраполяции данных. Тем не менее, увеличение экспрессии некоторых генов воспроизводится довольно часто. В первую очередь, это относится к так называемым ранним генам.

2.5.1. Ранние гены

Ранние гены – это гены, быстро экспрессирующиеся после различных воздействий на клетки (Анохин, 1996; Гринкевич и Васильев, 1999; Dyakonova et al., 1999; Vann et al., 2000; Guzowski et al., 2001; Hall et al., 2001a, 2001b). Они подразделяются на 2 класса: 1) эффекторные, кодирующие факторы, непосредственно связанные с выполнением какой-либо клеточной функции; 2) регуляторные, кодирующие факторы транскрипции, контролирующие экспрессию «поздних» генов (Lanahan and Worley, 1998; Kandel, 2001; Анохин, 2001; Lonze and Ginty, 2002; Loebrich and Nedivi, 2009). В силу своей способности регулировать транскрипцию, продукты регуляторных ранних генов могут глобально контролировать клеточные функции и индуцировать пластические процессы в клетке

(Clayton, 2000; Guzowski, 2002). Среди транскрипционных факторов лучше всего исследованы в контексте синаптической пластичности и обучения CREB, CREM (cAMP-responsive element modulator), Egr1 и входящие в комплекс AP-1 Fos и Jun (Анохин, 2003; Alberini, 2009). Продукты эффекторных ранних генов выполняют ряд клеточных функций, связанных с клеточным ростом (BDNF, Narp), передачей сигнала (Rheb, RGS-2, Homer1a), синаптической модификацией или другими структурными изменениями (Arc [activity-regulated cytoskeleton-associated protein, Arg 3.1], Homer1a, Narp, tPA, BDNF), метаболизмом (COX-2) (Lanahan and Worley, 1998; Guzowski, 2002; Loebrich and Nedivi, 2009; Leslie and Nedivi, 2011).

Ген *Fos* транскрибируется в культурах клеток в ответ на синаптическую активность или аппликацию нейротрансмиттеров, приводящих к увеличению концентрации Ca^{2+} в клетке (Murphy et al., 1991; Bading et al., 1993), и *in vivo* в ответ на разнообразные стимулы: судороги, визуальную и социальную новизну, циркадные изменения, обучение страху, воздействие наркотиков (Dragunow and Robertson, 1987; Morgan et al., 1987; Rusak et al., 1990; Anokhin et al., 1991; Hope et al., 1992; Hall et al., 2001b). Белок Fos образует с членами транскрипционных факторов семейства Jun гетеродимеры – фактор транскрипции AP-1. Функцией этого комплекса является активация транскрипции различных генов в ответ на стимуляцию рецепторов клеточной поверхности, связанных с различными сигнальными путями (Angel and Karin, 1991; Турпаев, 2006). Продукты этих генов-мишеней определяют многообразие ответов, включая дифференцировку и нейрональную пластичность. У мышей с нокаутом *Fos* в пределах центральной нервной системы наблюдается нарушение ДВП (Fleischmann et al., 2003).

Транскрипция генов семейств *Fos* и *Jun* регулируется многими транскрипционными факторами, включая CREB, SRF, Elk-1 (Impey et al., 2004; Турпаев, 2006). ДВП может сопровождаться активацией экспрессии *Fos* (Dragunow et al., 1989) и *Jun* (Worley et al., 1993), однако некоторые

протоколы стимуляции, вызывающие ДВП, не приводят к их индукции (Dragunow et al., 1989; Wisden et al., 1990).

Семейство ранних генов *Egr* объединяет четыре фактора транскрипции, относящихся к «цинковым пальцам»: *Egr1* (zif268, NGFI-A, Krox24, Tis8, ZENK), *Egr2* (Krox20), *Egr3* (Pilot) и *Egr4* (NGFI-C, PAT 133). Они имеют почти идентичные ДНК-связывающие домены в районе С-конца, часто совместно регулируются различными стимулами и в различных типах клеток, включая нейроны (Jamieson et al., 2003). Консенсусный мотив *Egr*-связывающего элемента – 5'-GNGBGGGRG-3' (Yu et al., 2007; Pfenning et al., 2007). Как и гены факторов комплекса AP-1, *Egr1* регулируется синаптической активностью (Murphy et al., 1991), и его количество увеличивается после индукции ДВП, а также во многих других ситуациях, включая судороги, травмы мозга, нейродегенерацию, апоптоз и стресс (Davis et al., 2003; Knapska and Kaczmarek, 2004; Yu et al., 2007). Экспрессия других членов семейства *Egr* также увеличивается после индукции ДВП (Yamagata et al., 1994; Williams et al., 1995; Park et al., 2006; Ploski et al., 2010; Ryan et al., 2011). В ранних работах была установлена корреляция между экспрессией *Egr1* и длительностью сохранения долговременной потенциации (Abraham et al., 1991; Worley et al., 1993). Последующие исследования подтвердили критическую роль *Egr1* в формировании поздней фазы ДВП, гиппокамп-зависимой долговременной памяти и реконсолидации памяти (Bozon et al., 2003; Jones et al., 2001; Davis et al., 2003; Lee et al., 2004; Knapska and Kaczmarek, 2004). Транскрипционные факторы, отвечающие за увеличение экспрессии *Egr1*, связанное с нейропластичностью, пока не идентифицированы.

В стрессовых условиях *Egr1* проявляет значительное функциональное сходство с регулятором апоптоза, пролиферации и дифференцировки p53 и его гомологом p73 (De Belle et al., 1999; Quinones et al., 2003; Pignatelli et al., 2003). Многие гены, регулируемые фактором *Egr1*, являются также мишенями p53. Каждый из факторов *Egr1*, p73 и p53 активирует

транскрипцию всех трех генов (*Egr1*, *Tp73* и *Tp53*), эта сеть с положительными обратными связями отвечает на стресс продолжительной экспрессией генов семейства *p53*, что приводит к апоптозу (Yu et al., 2007).

Продукт эффекторного раннего гена *Arc* является цитоплазматическим белком, контролирующим эндоцитоз глутаматных рецепторов AMPA через взаимодействие с динеином и специфическими изоформами эндофилина (Chowdhury et al., 2006). Его экспрессия значительно увеличивается при синаптической активности (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995), зависит от протеинкиназы A и MAPK/ERK (Waltereit et al., 2001) и необходима для поддержания ДВП и консолидации памяти (Guzowski et al., 2000; Plath et al., 2006). При этом ДВП в зубчатой извилине крыс сопровождается увеличением Arc-иммунореактивности не только в дендритах и дендритных шипиках, но и в глиальных клетках (Rodriguez et al., 2005).

Ген *Bdnf* также относится к эффекторным ранним генам. Его продукт является нейротрофином, играющим важную роль в регуляции выживаемости нейронов и дифференцировке, а также в формировании ДВП и обучении, хотя не все формы ДВП и не все виды обучения зависят от BDNF (Lu et al., 2008). Самые высокие уровни мРНК и белка *Bdnf* наблюдаются в нейронах гиппокампа (Wetmore et al., 1990; Conner et al., 1997; Yan et al., 1997). При этом количество белка BDNF в пирамидном слое поля CA1 и гранулярном слое зубчатой извилины в норме невысоко, но значительно возрастает при повышении нейронной активности (Yan et al., 1997). Ген *Bdnf* имеет сложную структуру и может генерировать, по меньшей мере, 11 различных транскриптов у крыс и мышей (Aid et al., 2007). Регуляция экспрессии транскриптов различна: транскрипты с экзонами IV и VI (до 2007 г. упоминаемые как III и IV соответственно) обладают свойствами ранних генов, транскрипция экзонов I и II зависит от белкового синтеза (Lauterborn et al., 1996).

BDNF секретируется, преимущественно в виде pro-BDNF, как из пресинаптических терминалей, так и из постсинаптических шипиков. Этот

процесс также регулируется нейронной активностью и зависит от кальциевых токов через потенциалзависимые кальциевые каналы и рецепторы NMDA-типа, а также от выхода кальция из внутриклеточных депо (Hartmann et al., 2001; Lever et al., 2001; Balkowiec and Katz, 2002; Gartner and Staiger, 2002; Aicardi et al., 2004). Часть выделяющегося из нейронов при индукции ДВП нейротрофина поглощается астроцитами и впоследствии может вновь секретироваться при воздействии глутамата на астроциты (Bergami et al., 2008).

2.5.2. Гены, экспрессирующиеся преимущественно в глии

Наряду с BDNF, ряд других трофических и морфогенетических факторов модулируют синаптическую пластичность взрослого мозга (Terlau and Seifert, 1989, 1990; Tancredi et al., 1990, 1992, 1993; Bellinger et al., 1993; Kang and Schuman, 1995; Li et al., 1997). Некоторые из них, в частности, IL-1 β , IL-6 и TNF α , экспрессируются в мозге преимущественно глиальными клетками – астроцитами и микроглией (резидентными макрофагами мозга). В ранних работах было показано, что в гиппокампе взрослых крыс аппликация этих цитокинов ингибирует ДВП (Tancredi et al., 1992; Bellinger et al., 1993; Li et al., 1997), однако эти результаты были получены с использованием патологически высоких концентраций цитокинов, моделирующих воспалительные процессы, и последующие исследования продемонстрировали гораздо более сложный характер вовлечения IL-1 β и TNF α в регуляцию синаптической функции (McAfoose and Baune, 2009).

Постоянно секретируемый глиальными клетками TNF α может участвовать в гомеостатическом синаптическом шкалировании, увеличивая синаптическую эффективность при продолжительном снижении нейронной активности в гиппокампе (Stellwagen and Malenka, 2006). При этом интенсивность секреции TNF α находится в обратной зависимости от уровня

нейронной активности и внеклеточной концентрации глутамата, однако механизм такой зависимости не установлен.

Индукция ДВП в поле CA1 гиппокампа крыс *in vitro* и *in vivo* сопровождается NMDAR-зависимым увеличением содержания мРНК *IL-1 β* , при этом аппликация IL-1ra (IL-1 receptor antagonist) в период максимальной экспрессии *IL-1 β* подавляла ДВП и не оказывала эффекта в других отрезках времени (Schneider et al., 1998). Таким образом, физиологические концентрации *IL-1 β* необходимы для развития ДВП. К сожалению, метод гибридизации *in situ* оказался недостаточно чувствителен для локализации источника повышенной экспрессии *IL-1 β* (Schneider et al., 1998). В зубчатой извилине гиппокампа крыс и мышей IL-1ra также нарушает сохранение потенциации (Coogan et al., 1999; Ross et al., 2003).

Ингибирующее влияние эндогенного IL-6 на синаптическую пластичность было подтверждено с помощью анти-IL-6 антител, аппликация которых усиливала ДВП *in vitro* и *in vivo* и улучшала долговременную память (Balschun et al., 2004). При этом индукция ДВП сопровождается NMDAR-зависимым увеличением экспрессии *IL-6* в астроцитах и клетках сосудистого русла вблизи места стимуляции (Jankowsky et al., 2000; Balschun et al., 2004). Однако результаты поведенческих экспериментов на *IL-6*-нокаутных мышах оказались неоднозначными. С одной стороны, такие животные быстрее и эффективнее обучаются в радиальном лабиринте (Braidia et al., 2004), с другой стороны, хуже оценивают новизну объектов (Hryniewicz et al., 2007), по сравнению с мышами «дикого» генотипа.

Гиппокамп-зависимое обучение, как и ДВП, сопровождается увеличением экспрессии *IL-1 β* и *IL-6* в гиппокампе (del Rey et al., 2013).

Таким образом, ДВП является результатом работы многокомпонентной регуляторной сети, включающей в себя систему «сдержек и противовесов», вероятно, необходимую для обеспечения пространственной специфичности и тонкой подстройки пластических процессов, и синтезируемые глией факторы, в частности, цитокины, вносят существенный вклад в эти процессы.

Еще одним потенциальным компонентом этой сети, по-видимому, является полифункциональный белок S100B, в мозге синтезирующийся преимущественно в астроцитах. Секретируемый пул этого белка обладает свойствами цитокина, оказывая нейропротекторное и нейротрофическое действие в физиологических (наномолярных) и токсическое – в патологически высоких (микромолярных) концентрациях (Donato et al., 2013). S100B и IL-1 β взаимно стимулируют экспрессию один другого, и оба они стимулируют экспрессию IL-6, что способствует эскалации воспалительных процессов в патологических условиях (Траилин и Левада, 2009; Sorci et al., 2010). S100B модулирует нейронную активность (Barger and Van Eldik, 1992; Sakatani et al., 2008) и синаптическую пластичность (Nishiyama et al., 2002), однако зависимость экспрессии S100B от нейронной активности изучена недостаточно, что проявляется в противоречивости имеющихся данных.

Еще в 1970 г. было показано, что у крыс, вынужденных обучаться доставать пищу из кормушки "непривычной" для них лапой, увеличивается количество белков семейства S100 в гиппокампе, по сравнению с контрольными животными, достававшими корм предпочитаемой лапой (Hydén and Lange, 1970). Аналогично, Л.А. Громов и соавторы (1991) наблюдали увеличение количества S100 в мозге крыс после формирования условного пищевого рефлекса. Однако выработка условного рефлекса пассивного избегания не приводила к изменению количества (Громов и др., 1991) или скорости обмена (Клементьев и др., 1975) белков S100, что, как предположили Л.А. Громов и соавторы (1991), могло быть связано с гораздо меньшей продолжительностью обучения пассивному избеганию, по сравнению с формированием пищедобывательных рефлексов. В то же время аналогичное кратковременное формирование условного страха приводило к значительному увеличению уровня белка S100B в различных отделах мозга, включая гиппокамп, по сравнению с животными активного контроля, в мозге которых также наблюдался значительный рост содержания S100B, по

сравнению с пассивным контролем (Шерстнев и др., 2001). Однако, как отмечают авторы, наблюдавшееся в их опытах возрастание S100B, определявшееся с помощью иммуноферментного анализа, могло быть обусловлено не только синтезом белка *de novo*, но и его высвобождением из связанного состояния, а также конформационными изменениями молекул S100B, что делало их более доступными для антител.

Низкая специфичность использовавшихся в ранних работах анти-S100-антител не позволяет с уверенностью судить о том, к какому именно белку относились наблюдаемые изменения, хотя некоторые авторы (Rebaudo et al., 2000) склонны связывать их с S100B, поскольку в мозге крыс уровень его экспрессии намного выше, чем других членов семейства (Baudier et al., 1985; Kuwano et al., 1987). Однако этот аргумент не позволяет исключить того, что и другие белки S100 могли вносить вклад в наблюдавшиеся изменения. Более того, противоречивые результаты были получены в работе по идентификации регулируемых нейронной активностью генов, в которой было обнаружено снижение уровня мРНК *S100B* в зубчатой извилине крыс через 6 ч после индуцированных каинатом судорог (Neuroni et al., 1998), а также в экспериментах Park et al. (2006), наблюдавших уменьшение количества мРНК *S100B* в зубчатой извилине мышей через 30-120 мин после индукции ДВП. Purov et al. (1988) показали разнонаправленные изменения S100-иммунореактивности в водорастворимой и мембраносвязанной фракциях после индукции ДВП в поле СА3 гиппокампа крыс, что не позволяет судить об общей динамике количества белков.

В следующем разделе приведены сведения о функциях основных белков семейства S100 в мозге – S100A1 и S100B, – прямо или косвенно свидетельствующие об их вовлечении в регуляцию синаптической передачи, пластичности и когнитивных способностей животных и человека, а также анализ имеющихся данных о регуляции экспрессии их генов, позволяющий оценить возможную зависимость их транскрипции от нейронной активности.

2.6. Белки S100

Семейство S100 включает в себя 24 небольших кальцийсвязывающих белка типа EF-hand, участвующих в регуляции широкого набора клеточных функций (Donato et al., 2013). Важнейшим свойством белков S100 является способность к связыванию ионов кальция (Calissano et al., 1974; Старостина и Свиридов, 1978; Starostina et al., 1981; Штарк, 1985). Имеющиеся данные позволяют предположить, что представители семейства исполняют роль внутриклеточных кальциевых сенсоров: связывание ионов кальция приводит к изменению конформации молекул S100 и регулирует их взаимодействие с молекулами-мишенями. Определены многочисленные внутриклеточные мишени S100, к которым относятся ферменты, элементы цитоскелета, рецепторы, транскрипционные факторы и нуклеиновые кислоты. Множественность мишеней обуславливает многообразие функций S100B, включающих в себя регуляцию энергетического метаболизма, кальциевого гомеостаза, дифференцировки, апоптоза, воспаления, клеточной пролиферации и миграции (Donato et al., 2013). Основными представителями семейства в мозге являются S100B и S100A1 (Zimmer et al., 1995, 2005).

2.6.1. S100A1

S100A1 в значительных количествах экспрессируется в скелетных мышечных волокнах, кардиомиоцитах (Donato, 2001; Wright et al., 2009) и встречается также в некоторых нейронных популяциях гиппокампа, коры полушарий и амигдалы (Ackermann et al., 2006). Отмечается также его присутствие в отростках астроцитов в гранулярном слое коры мозжечка (Benfenati et al., 2004) и частичная колокализация с маркером астроцитов глиальным фибриллярным кислым белком в радиальном слое гиппокампа (Ackermann et al., 2006). S100A1 обнаружен в аксонных терминалях и, как свидетельствуют эксперименты *in vitro*, может связываться с мономерным

синапсином I, препятствуя его димеризации, что позволяет предполагать участие S100A1 в Ca^{2+} -зависимой регуляции транспорта синаптических везикул (Benfenati et al., 2004).

Может ли S100A1 в норме секретироваться в мозге, неизвестно, однако он выделяется поврежденными кардиомиоцитами после ишемии (Rohde et al., 2014). Экзогенный S100A1 увеличивает поглощение кальция культивируемыми кардиомиоцитами (Reppel et al., 2005), а также удлиняет потенциалы действия и усиливает индуцированные ими кальциевые токи в нейронах (Hernandez-Ochoa et al., 2009).

Сообщалось, что инъекция моноклональных анти-S100A1-антител в желудочки мозга нарушает память у цыплят (O'Dowd et al., 1997), однако у *S100A1*-нокаутных мышей не отмечается нарушений пространственного обучения и памяти (Ackermann et al., 2006). В то же время у этих мышей снижен уровень страха и повышена исследовательская активность.

В промоторе гена *S100A1* мыши идентифицированы потенциальные сайты связывания CREB, NFκB и C/EBPα (Kiewitz et al., 2000). Потенциальные CRE и AP-1-связывающие последовательности идентифицированы в промоторе *S100A1* крысы (Zimmer et al., 1995; Song and Zimmer, 1996). Экспериментально доказано участие в регуляции генов *S100A1* мыши и человека транскрипционного фактора SOX9 и его кофакторов SOX5 и SOX6 (SOX trio) (Saito et al., 2007).

2.6.2. *S100B*

S100B экспрессируется в астроцитах, олигодендроцитах, нейронных стволовых клетках, некоторых нейронных популяциях, шванновских клетках, меланоцитах, хондроцитах, адипоцитах, некоторых популяциях дендритных клеток и лимфоцитов и других типах клеток (Sorci et al., 2013). В мозге количество S100B намного выше, чем других членов семейства, особенно у крыс, в мозге которых экспрессия *S100A1* находится на низком уровне

(Baudier et al., 1985; Kuwano et al., 1987; Zimmer and Van Eldik, 1987). Абсолютное количество белка S100B в мозге составляет, по разным оценкам, от 0,1 до 0,5 % общего количества белка. Основная его часть находится внутри клеток, однако он также активно секретируется астроцитами (Shashoua et al., 1984; Van Eldik and Zimmer, 1987) и олигодендроцитами (Steiner et al., 2008).

Внутри клеток белок связывается, тем самым регулируя активность, с большим набором мишеней, включая ферменты и их субстраты, цитоскелет, белки скаффолда, транскрипционные факторы (p53), ионные каналы и убиквитинлигазы (Mdm2). Благодаря этому, S100B вовлечен в регуляцию энергетического метаболизма, транскрипции, фосфорилирования белков, клеточной пролиферации, выживания, дифференцировки, миграции и кальциевого гомеостаза (Donato et al., 2013; Sorci et al., 2013).

Секретируемый S100B, в зависимости от концентрации, оказывает разное (трофическое или токсичное) действие на нейроны, астроциты и микроглию (Van Eldik and Wainwright, 2003; Donato et al., 2009; Sorci et al., 2010). В физиологических (наномолярных) количествах S100B проявляет свойства нейротрофина, защищая нервные клетки от нейротоксичных воздействий, стимулируя экспрессию антиапоптозного белка Bcl2 ERK1/2- и NFκB-зависимыми путями, а в микромолярных концентрациях он убивает нейроны, вызывая чрезмерную активацию ERK1/2 и генерацию перекисных радикалов и/или потенцируя токсичные эффекты β-амилоида, причем в обоих случаях действие S100B может опосредоваться одними и теми же рецепторами конечных продуктов гликозилирования (RAGE, receptor for advanced glycation endproducts) (Donato et al., 2013).

В низких дозах S100B препятствует активации микроглии через STAT3-зависимый путь (Reali et al., 2005; Zhang et al., 2011), а в высоких дозах, наоборот, активирует микроглию, стимулируя экспрессию и секрецию цитокинов и экспрессию циклооксигеназы-2 NFκB- и AP-1-зависимым путем (Petrova et al., 2000; Adami et al., 2001, 2004; Van Eldik and Wainwright, 2003;

Bianchi et al., 2007, 2010; Donato et al., 2009; Sorci et al., 2010), а также стимулирует миграцию микроглии, активируя экспрессию и секрецию хемокинов и экспрессию хемокиновых рецепторов (Bianchi et al., 2011), и пролиферацию и провоспалительную активность астроцитов (Donato et al., 2013). Таким образом, значительный объем данных свидетельствует о том, что увеличение количества S100B во внеклеточном пространстве может вносить существенный вклад в воспалительные процессы в мозге.

В то же время, внутрижелудочковое введение S100B индуцирует нейрогенез в гиппокампе и ускоряет восстановление когнитивных функций после экспериментальной травмы мозга (Kleindienst et al., 2005, 2007), а добавление в культуры клеток наномолярных количеств S100B снижает отсроченное повреждение нейронов после травмы *in vitro*, тогда как подавление активности эндогенного S100B анти-S100B-антителами, напротив, усиливает повреждение нейронов (Willoughby et al., 2004; Ellis et al., 2007). Кроме того, четкая граница между трофическими и токсичными концентрациями отсутствует, в некоторых случаях высокие дозы (5 мкМ) S100B стимулируют выживание нейронов (Leclerc et al., 2007), а в других условиях более низкие дозы – 250 нМ (Vincent et al., 2007) или даже 50 нМ (Iuvone et al., 2007) – вызывают апоптоз. Разные эффекты низких и высоких доз S100B на нервные клетки могут зависеть от уровня экспрессии RAGE, разной интенсивности и продолжительности их стимуляции и разной степени S100B-индуцированного увеличения экспрессии RAGE в нейронах, астроцитах и микроглии (Donato et al., 2013).

S100B в пиколярных концентрациях индуцирует увеличение внутриклеточной концентрации кальция в культурах нейронных и глиальных клеток за счет кратковременного выброса кальция из внутриклеточных депо и постоянного повышения проницаемости Ni^{2+} -чувствительных кальциевых каналов клеточной мембраны (Barger and Van Eldik, 1992), что может иметь физиологическое значение, поскольку базальный уровень S100B в цереброспинальной жидкости грызунов составляет, в пересчете на димерную

форму белка, порядка 80-150 (от 15 до 300) пМ (Yasuda et al., 2004; Oses et al., 2004; Sakatani et al., 2008). Имеющееся в работе Nishiyama et al. (2002), со ссылкой на (Shashoua et al., 1984), указание на гораздо более высокую концентрацию (1 мкг/мл, или 50 нМ), видимо, связано с некорректным прочтением авторами единиц измерения в цитируемой статье.

S100B модулирует обучение и синаптическую пластичность. *S100B*-нокаутные мыши демонстрировали улучшенную гиппокамп-зависимую память (водный лабиринт Морриса и условный контекстный страх) и повышенную ДВП в поле СА1 гиппокампа, причем добавление в среду экзогенного S100B возвращало параметры ДВП у нокаутных мышей к норме и не влияло на ДВП у мышей "дикого" генотипа, что позволяет связать влияние S100B на синаптическую пластичность с его экстраклеточным пулом (Nishiyama et al., 2002), однако молекулярный механизм его действия неизвестен.

Результаты экспериментов с анти-S100- и анти-S100B-антителами противоречивы. Инъекция моноклональных анти-S100B-антител в желудочки мозга за 5 мин до или сразу после (но не через 5 мин или позже) обучения нарушает память у цыплят при тестировании через 20-180 мин после обучения (O'Dowd et al., 1997), а инъекция анти-S100B-антител в гиппокамп нарушает память в тесте контекстного страха у крыс (Шерстнев и др., 2001), что согласуется с результатами более ранних исследований, показавших негативное влияние неспецифичных анти-S100-антител на процессы обучения и памяти (Hydén and Lange, 1970; Karpiak et al., 1976; Громов и др., 1991), однако противоречит упоминавшимся выше данным, полученным на *S100B*-нокаутах. В экспериментах на срезах гиппокампа крыс анти-S100B-антитела в концентрации, при которой они вызывали обратимое снижение базальных ответов нейронов поля СА1 на стимуляцию коллатералей Шаффера, не влияли на длительное сохранение ДВП (Мотин и др., 2002), что ставит под сомнение связь выраженных подавляющих эффектов неспецифичных анти-S100-антител на формирование ДВП, о которых

сообщалось ранее (Lewis and Teyler, 1986; Rebaudo et al., 2000), с их влиянием на S100B.

Таким образом, в настоящее время наиболее достоверными выглядят результаты Nishiyama et al. (2002), свидетельствующие о том, что в физиологических концентрациях S100B оказывает на память и ДВП умеренное ослабляющее воздействие. Возможно, это влияние S100B важно для обеспечения стабильности работы нервной системы, потому что у *S100B*-нокаутов быстрее развиваются судороги в модели киндлинга (Dyck et al., 2002), что могло бы отчасти являться следствием изменения динамики ДВП, поскольку ДВП считается одним из наиболее вероятных механизмов распространения судорожной активности при киндлинге (Годухин, 2005). Нарушение кальциевого гомеостаза в глиальных клетках *S100B*-нокаутов (Xiong et al., 2000) также могло бы являться причиной их повышенной предрасположенности к судорожной активности, поскольку кальциевые волны в астроцитах играют важную роль в эпилептогенезе (Losi et al., 2012).

Секреция S100B регулируется нейронной активностью. После индуцированных внутрибрюшинным введением пентилентетразола судорог, длящихся около 1 мин, происходит быстрое (в течение 10 мин) увеличение количества S100B в цереброспинальной жидкости, сохраняющееся, как минимум, в течение 4 ч (Oses et al., 2004). Индукция с помощью агониста глутаматных рецепторов каината высокочастотной активности (гамма-осцилляций, электрофизиологического коррелята вызываемых каинатом *in vivo* судорог) в срезах гиппокампа также сопровождается увеличением секреции S100B, причем эффект не связан с прямым действием каината на астроциты, а опосредован нейронной активностью, что доказывается его блокадой ингибитором натриевых каналов тетродотоксином (Sakatani et al., 2008). Секретируемый в этих условиях S100B модулирует нейронную активность RAGE-зависимым путем, однако локализация этих рецепторов неясна (Sakatani et al., 2008).

Как показали эксперименты *in vitro*, секреция S100B из астроцитов может регулироваться такими зависимыми от нейронной активности факторами, как глутамат (Ciccarelli et al., 1999; Tramontina et al., 2006; Sakatani et al., 2008), рецепторы серотонина 5-HT_{1A} (Whitaker-Azmitia et al., 1990) и TNF α (Edwards and Robinson, 2006).

Фармакологическая активация аденозиновых (A1) или метаботропных глутаматных (mGlu3) рецепторов увеличивала секрецию S100B, индуцированную средой с пониженным содержанием сыворотки, в культивируемых астроцитах, причем данный эффект не зависел от белкового синтеза (Ciccarelli et al., 1999). Sakatani et al. (2008) также показали увеличение секреции S100B в культивируемых астроцитах при добавлении глутамата (50 мкМ) и продемонстрировали критическую роль mGlu3 в увеличении секреции S100B, связанном с повышенной синаптической активностью, в срезах гиппокампа. Глутамат в токсической концентрации (1 мМ), напротив, подавлял секрецию S100B, индуцированную бессывороточной средой, в культивируемых астроцитах (Tramontina et al., 2006). Эффект глутамата был связан с активацией глутаматных транспортеров и, предположительно, снижением уровня цАМФ в клетках. В присутствии сыворотки глутамат не влиял на секрецию S100B. Следует отметить, что в работе Tramontina et al. (2006) агонист mGlu3 DCG-IV (1 мкМ) также подавлял секрецию S100B, тогда как в экспериментах Ciccarelli et al. (1999) DCG-IV был неэффективен в данной концентрации и вызывал противоположный эффект в более высоких концентрациях. По-видимому, влияние глутамата на секрецию S100B может модулироваться факторами, присутствовавшими в средах, использованных авторами данных работ.

Активация рецепторов серотонина 5-HT_{1A} культивируемых астроцитов усиливала морфогенетические свойства культуральной среды, которые блокировались анти-S100-антителами (Whitaker-Azmitia et al., 1990), а трехдневная инкубация культуры астроцитов в присутствии TNF α уменьшала

внутриклеточное и увеличивала внеклеточное содержание S100B (Edwards and Robinson, 2006).

Также в условиях *in vitro* идентифицирован ряд факторов, влияющих на экспрессию S100B в астроцитах, среди которых такие важные для нейропластичности белки, как BDNF (Djalali et al., 2005) и IL-1 β (Sheng et al., 1996).

В мозге *Bdnf*-нокаутных мышей наблюдается локальное снижение S100B-иммунореактивности в ядрах шва и, в меньшей степени, в гиппокампе, без изменения числа S100B-иммунопозитивных клеток, а добавление BDNF к культуре астроцитов увеличивает количество белка S100B, не изменяя уровень его секреции (Djalali et al., 2005). Инъекция IL-1 β в мозг крыс увеличивала содержание S100B в гомогенатах мозга и число астроцитов, экспрессирующих детектируемый уровень S100B, в срезах мозга, тогда как аппликация IL-1 β или IL-1 α к культуре глиомы C6 увеличивала уровни мРНК и белка *S100B* в клетках (Sheng et al., 1996).

Интерес к молекулярным механизмам регуляции экспрессии *S100B* связан не только с его участием в процессах нейропластичности в нормальных условиях, но и с вовлечением этого потенциально провоспалительного агента в патологические процессы, причем не только в мозге. Количество S100B увеличивается при травмах мозга, нейродегенеративных заболеваниях, в некоторых опухолях (Траилин и Левада, 2009; Donato et al., 2009; Sorci et al., 2010; Astrand et al., 2013). Уровень S100B в сыворотке положительно коррелирует с расстройствами настроения (mood disorders) (Schroeter et al., 2013) и шизофренией (Yelmo-Cruz et al., 2013; Aleksovskaja et al., 2014). Аллель *S100B*, характеризующийся повышенным уровнем экспрессии, является фактором риска развития биполярного расстройства (Dagdan et al., 2011), хотя уровень S100B в крови при этом не превышает максимальных значений, регистрируемых у здоровых людей. Следовательно, хроническое повышение экспрессии *S100B* даже в

физиологических пределах может оказать негативное воздействие при неблагоприятном сочетании патогенных факторов.

Тем не менее, регуляция экспрессии *S100B* остается крайне малоизученной. Промотор *S100B* имеет сложную организацию и содержит множественные, иногда клеточно-специфичные, элементы, оказывающие как позитивное, так и негативное влияние на транскрипцию (Jiang et al., 1993; Nagiwwara and Sueoka, 1995; Castets et al., 1997). Потенциальный CRE присутствует в гене *S100B* человека (Allore et al., 1990), но в генах *S100B* мыши (Jiang et al., 1993) и крысы (Nagiwwara and Sueoka, 1995) его нет. Потенциальная AP-1-связывающая последовательность идентифицирована в генах *S100B* человека и мыши (Zimmer et al., 1995), а в промоторе *S100B* крысы присутствуют потенциальные сайты связывания Egr1. Однако функциональность всех этих регуляторных элементов экспериментально не подтверждена.

Доказано вовлечение в регуляцию *S100B* человека и мыши транскрипционного фактора SOX9 (Saito et al., 2007), человеческий *S100B* в культурах клеток меланомы трансактивируется факторами НОХС6/11 (Zhang et al., 2007) и p53 (Lin et al., 2004). Роль этих факторов в экспрессии генов, ассоциированной с синаптической пластичностью, не исследовалась. Однако в экспериментах на моллюсках было обнаружено, что обучение сопровождается ацетилированием в мозге белка с молекулярной массой 53 кДа (Данилова и др., 2010). Возможно, этот белок является транскрипционным фактором p53, активность которого в значительной мере регулируется ацетилированием. Анализ литературы, представленный в следующем разделе, демонстрирует значительное перекрытие регуляторных сетей нейропластичности и путей модуляции активности p53, что косвенно свидетельствует о возможном участии p53 в процессах нейропластичности.

2.7. Вероятные пути регуляции транскрипционного фактора p53 при формировании долговременной потенциации

Регуляция p53 исключительно сложна. Ключевое значение для активации p53 имеют фосфорилирование его сериновых/треониновых аминокислотных остатков и ацетилирование лизиновых остатков (Lavin and Gueven, 2006). Фосфорилирование p53 облегчает его последующее ацетилирование (Spange et al., 2009), а также уменьшает связывание с Mdm2 и S100B, которые являются негативными регуляторами p53 (Freedman et al., 1999; Wilder et al., 2006; Nag et al., 2013). Однако влияние фосфорилирования конкретного сайта на ДНК-связывающую и транскрипционную активность p53 зависит от промотора (Lohrum and Scheidtmann, 1996), и в некоторых случаях фосфорилирование не является обязательным для активации p53 (Thompson et al., 2004). Более того, фосфорилирование S376/S378 способствует быстрой деградации p53, и их дефосфорилирование может активировать p53 (Lavin and Gueven, 2006).

Представленный в разделе анализ литературы не претендует на всесторонний анализ регуляции p53, а ограничен выяснением возможности контроля транскрипционной активности p53 молекулярными каскадами, вовлеченными в регуляцию экспрессии генов при формировании ДВП. Основные обсуждаемые пути представлены на рисунке 1.

Следует подчеркнуть, что использованные при составлении схемы данные получены на разных объектах (срезы гиппокампа, культуры клеток, включая нейробластомы и глиомы) и на разных видах животных. Между тем, характер активности сигнальных каскадов может отличаться не только в разных клетках, но и в разных компартментах одной клетки (Hardingham and Bading, 2010). Поэтому приведенная сеть ни в коей мере не может рассматриваться как попытка прямой экстраполяции представленных данных на клетки гиппокампа крыс, а только как инструмент для обоснования гипотез и планирования исследований.

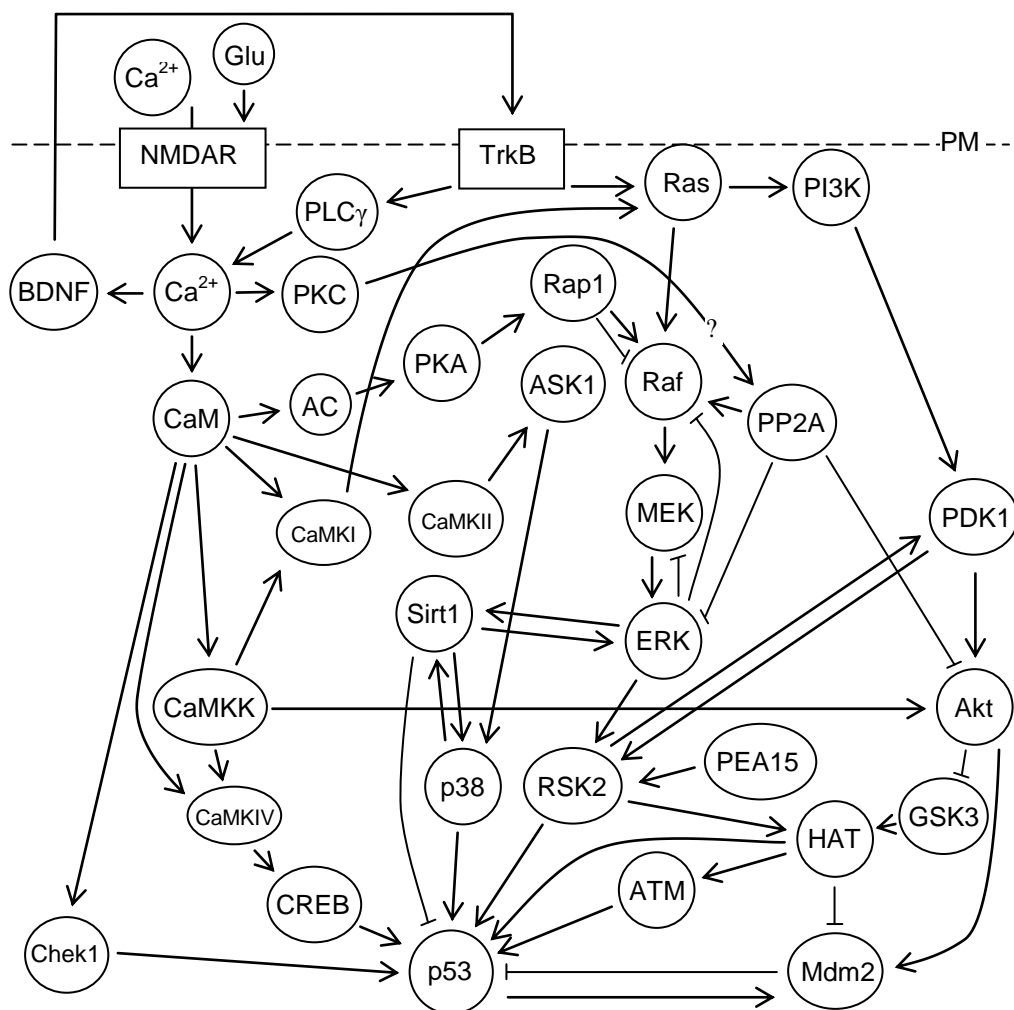


Рис. 1. Вероятные пути регуляции p53 молекулярными каскадами, вовлеченными в формирование ДВП

PM – клеточная мембрана; Glu – глутамат; TrkB – тирозинкиназный рецептор; PLC γ – фосфолипаза C γ ; Ras, Rap1 – малые G-белки; PI3K – phosphatidylinositol-3-kinase; PDK1 – phosphatidylinositide-dependent kinase 1; PKC, ATM и Akt – протеинкиназы C, ATM и Akt; GSK3 – glycogen synthase kinase-3; Raf, MEK, ERK, ASK1, p38 – MAP-киназы; AC – аденилатциклазы; CaM – кальмодулин; CaMKI, CaMKII, CaMKIV, CaMKK, Chek1 – Ca²⁺/кальмодулин-зависимые протеинкиназы; HAT – ацетилтрансферазы; Sirt1 – деацетилаза Sirt1; PP2A – протеинфосфатаза 2A; PEA-15 – phosphoprotein enriched in astrocytes, 15 kDa.

Одним из ключевых звеньев в механизмах ДВП в поле CA1 гиппокампа являются глутаматные рецепторы NMDA-типа, активация которых обеспечивает вход кальция в клетки (Скребицкий и Чепкова, 1999).

Кальций является важнейшим регулятором экспрессии генов (West et al., 2001; Mellström and Naranjo, 2001). Отчасти эффекты кальция могут быть опосредованы его влиянием на секрецию и экспрессию BDNF (West et al., 2001; Zheng et al., 2011). В свою очередь, BDNF, связываясь с тирозинкиназным рецептором TrkB, вызывает увеличение внутриклеточной концентрации кальция, стимулируя его выброс из депо, опосредованный фосфолипазой C γ (Yoshii and Constantine-Paton, 2010), и активируя глутаматэргическую синаптическую передачу, как на пресинаптическом, так и на постсинаптическом уровне (Martin and Finsterwald, 2011).

Формирование ДВП сопровождается также усилением синтеза/секреции оксида азота, однако у *Bdnf*-нокаутных мышей ингибирование NO синтазы не влияет на экспрессию остаточной ДВП в поле CA1, и, следовательно, можно предположить, что активируемые оксидом азота при индукции ДВП внутриклеточные регуляторные каскады перекрываются с BDNF-зависимыми каскадами (Leßmann et al., 2011).

Связывание BDNF с TrkB активирует три сигнальных каскада: митоген-активируемые протеинкиназы, фосфолипазу C γ и фосфатидилинозитол-3-киназу (Yoshii and Constantine-Paton, 2010).

MAP-киназный каскад Raf/MEK/MAPK способен активировать p53 (Lin et al., 1998). Этот эффект мог бы опосредоваться мишенью MAPK/ERK – протеинкиназой RSK2. Для полной активации RSK2 необходимо совместное действие ERK и PDK1. В свою очередь, активированная киназой MAPK/ERK RSK2 аллостерически активирует PDK1 (Frödin et al., 2000). ERK и RSK2 регулируются также скаффолд-фактором PEA-15, нефосфорилированная форма которого стимулирует MAPK/ERK-зависимую активацию RSK2 (Vaidyanathan et al., 2007). PEA-15 является многофункциональным белком, вовлеченным в регуляцию выживания, пролиферации и подвижности клеток,

метаболизма глюкозы (Fiory et al., 2009), а также в процессы гиппокампа-зависимого обучения (Ramos et al., 2009). Его активность регулируется протеинкиназами С, СаМКII, Akt (Fiory et al., 2009) и через СаМКК (СаМК kinase)/АМПК путь (Hindupur et al., 2014).

RSK2 активирует и фосфорилирует p53 (S15) *in vitro* и *in vivo*, была также показана совместная локализация RSK2 и p53 в ядре (Cho et al., 2005). Кроме того, действие RSK2 на p53 могло бы опосредоваться транскрипционным фактором CREB, играющим важную роль в индукции экспрессии генов при долговременной потенциации, так как считается, что MAPK/ERK-зависимое фосфорилирование CREB при ДВП осуществляется через RSK2 (Miyamoto, 2006), а CREB, фосфорилированный в положении S133, может напрямую взаимодействовать с p53, увеличивая при этом его транскрипционную активность (Arnould et al., 2002). Наконец, RSK2 могла бы стимулировать ацетилирование p53 через активацию ацетилтрансфераз (Wong et al., 2004), которые играют важную роль в регуляции p53 (Phillips and Vousden, 2000). Следует, однако, иметь в виду, что Wong K. et al. (2004) связывают активацию ацетилтрансфераз с RSK2 и MSK1/2, основываясь лишь на экспериментах с использованием стауроспорина – неспецифического ингибитора фосфолипид-/Ca²⁺-зависимых протеинкиназ.

Ацетилирование снижает энзиматическую активность PTEN и Mdm2 и увеличивает активность протеинкиназы ATM (Spange et al., 2009), которая, в свою очередь, активирует p53 (Ling and Lin, 2011). При этом взаимодействие ATM с p53 может блокироваться E3 убиквитинлигазой EDD за счет ее связывания с p53, независимо от ее лигазной активности (Ling and Lin, 2011).

Ацетилирование лизинов p53 защищает их от убиквитинилирования, поэтому активность деацетилаз является необходимым условием для опосредованной Mdm2 деградации p53 (Ling and Lin, 2011). Однако деацетилазы (в частности, Sirt1) могут также конкурировать с Mdm2 за связывание с мишенью, защищая последнюю от деградации (Bosch-Presegué et al., 2011). Основной деацетилазой, инактивирующей p53, как полагают

Spange et al. (2009), является Sirt1. Sirt1 деацетилюет K379 мышинового p53 (эквивалент человеческого K382), что препятствует транслокации p53 в ядро и приводит к увеличению его количества в цитоплазме (Yi and Luo, 2010). Однако в регуляции p53 могут также принимать участие деацетилазы Sirt2 (Peck et al., 2010) и HDACs I/II (Solomon et al., 2006). Sirt1 активирует Akt (Herskovits and Guarente, 2014), а также образует контуры положительной обратной связи с MAP-киназами ERK и p38 (Hong et al, 2011), однако фосфорилирование не только активирует Sirt1, но и стимулирует ее деградацию в протеасомах (Hong et al, 2010).

Sirt1 экспрессируется в ядрах нейронов гиппокампа, и у *Sirt1*-нокаутных мышей нарушены гиппокамп-зависимая память и сохранение ДВП в поле CA1 гиппокампа (Michán et al., 2010), тогда как активатор Sirt1 ресвератрол (внутрижелудочковое введение в течение недели), напротив, улучшает формирование долговременной памяти и ДВП в поле CA1 у мышей дикого типа, но не у *Sirt1*-нокаутов (Zhao et al., 2013), что свидетельствует о возможном вовлечении Sirt1 в механизмы синаптической пластичности.

Эффективность киназных каскадов естественным образом зависит от их антагонистов – фосфатаз (McConnell and Wadzinski, 2009). Активность ацетилтрансфераз также регулируется протеинфосфатазами (Wong et al., 2004). Однако регуляторные эффекты фосфатаз не ограничены их ферментативной активностью, они могут также выполнять функции scaffold-факторов (Perry et al., 2009).

Akt активируется протеинкиназами PDK1 и mTOR (Steelman et al., 2011). CaMKK может активировать Akt напрямую, без участия PI3K (Yano et al., 1998). Фосфорилирование Mdm2 протеинкиназой Akt, с одной стороны, активирует Mdm2-опосредованное убиквитинилирование и деградацию p53 в протеасомах (Gottlieb et al., 2002; Ogawara et al., 2002), с другой стороны, стимулирует протеасомную деградацию самой Mdm2 (Steelman et al., 2011). Akt ингибирует GSK3 (Cross et al., 1995) – активатор ацетилтрансферазы Tip60, которая, в свою очередь, не только активирует p53 (Charvet et al., 2011;

Nayak and Cooper, 2012), но и ацетилюет гистоны в районе сайта связывания p53 в промоторе, что дополнительно стимулирует p53-зависимую транскрипцию (Tang et al., 2006).

Деградация p53 может осуществляться не только в протеасомах, но и Ca²⁺-зависимой протеазой кальпаином, активность которой регулируется, также Ca²⁺-зависимым путем, кальпастатином (Carafoli et al., 2001).

МАРК p38-зависимая регуляция p53 была продемонстрирована в экспериментах на культурах клеток. МАРК p38 активирует p53, фосфорилируя S389 (Huang et al., 1999). В свою очередь, p53 индуцирует экспрессию одной из изоформ PP2C (*PPM1D*, или *Wip1*), которая дефосфорилирует и инактивирует p38, осуществляя, таким образом, отрицательную обратную связь в цепи регуляции p53 (McConnell and Wadzinski, 2009). Аналогичную роль играет, по-видимому, p53-зависимая транскрипция генов его негативных регуляторов Mdm2 (Freedman et al., 1999; Nag et al., 2013) и S100B (Lin et al., 2004). МАРК p38 может регулировать не только транскрипционные факторы, но и стабильность мРНК (Miyazawa et al., 1998; Winzen et al., 1999).

Кальций модулирует активность МАРК/ЕРК многими путями (Waltereit and Weller, 2003). Например, Ca²⁺/кальмодулин-зависимые киназы и цАМФ/РКА могут регулировать МАРК/ЕРК через малый G-белок Rap1, который активирует одни формы МАР3К (B-Raf) и ингибирует другие (Raf-1) (Vossler et al., 1997). Вероятно, существуют различия между нейронами и астроцитами в механизмах сопряжения этих каскадов, поскольку аппликация глутамата не оказывает влияния на активность МАР/ЕРК киназ в культивируемых астроцитах, в отличие от нейронов (Kurino et al., 1995).

СаМКII фосфорилирует и активирует ASK1 (МАР3К, вышележащая относительно МАРК p38), что объясняет активацию p38 при увеличении внутриклеточной концентрации кальция, вызванной деполяризацией мембраны (Takeda and Ichijo, 2002). Ca²⁺/кальмодулин-зависимые киназы Chek1 и Dapk1 стимулируют транскрипционную активность p53,

фосфорилируя его в положении S20 (Craig et al., 2007). Наконец, Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые киназы стимулируют экспорт деацетилаз из ядра в цитоплазму, активируя тем самым транскрипцию (Chawla et al., 2003).

Таким образом, внутриклеточные регуляторные каскады могут быть объединены множеством разноуровневых "латеральных" взаимосвязей, и, теоретически, существует масса возможностей контроля активности p53 со стороны молекулярной сети, вовлеченной в регуляцию процессов, связанных с формированием ДВП.

2.8. Проблемы и перспективы развития исследований молекулярно-генетических аспектов долговременной потенциации

Синаптическая пластичность и экспрессия генов тесно взаимосвязаны, однако транскрипционная программа, запускаемая в ответ на нейронную активность, приводящую к модификации синаптических связей, остается малоизученной. Прежде всего, обращает на себя внимание сформировавшаяся диспропорция между начавшимся еще в середине 90-х годов бурным ростом интереса к роли глии в регуляции синаптической передачи и явной недооценкой возможности вовлечения генетического аппарата глии в генерацию паттернов генетической экспрессии, активирующихся при индукции ДВП. Несмотря на имеющиеся отдельные указания на изменения экспрессии глиальных генов при ДВП (Jankowsky et al., 2000; Pita-Almenar et al., 2012), в целом этот вопрос практически не исследован, и, по крайней мере, еще до сравнительно недавнего времени, экспрессия глиальных генов преимущественно воспринималась скорее как шум, мешающий изучать процессы, происходящие в нейронах.

Увеличение уровня глиального белка S100B (а также, возможно, S100A1, экспрессирующегося как в астроцитах, так и в нейронах) в мозге крыс при обучении (Hydén and Lange, 1970; Шерстнев и др., 2001) указывает на возможное влияние нейронной активности на экспрессию их генов.

Изучение механизма этого явления представляется актуальным для развития представлений о связи нейропластичности с генетической экспрессией в глии, а также может оказаться полезным для понимания патогенеза некоторых неврологических заболеваний, сопровождающихся увеличением уровня белков S100B/A1.

Необходимость более детального исследования данного феномена диктуется также наличием в литературе противоречивых сведений о влиянии нейронной активности на экспрессию S100B – судорожная активность (Nevroni et al., 1998) и индукция ДВП (Park et al., 2006) приводят к уменьшению количества мРНК *S100B* в зубчатой извилине гиппокампа. Одной из причин расхождения этих результатов с данными, полученными при обучении, могут быть, вероятно, особенности регуляции гена *S100B* в нейронных стволовых клетках, присутствующих в субгранулярном слое зубчатой извилины.

В этом контексте уместно отметить сложившееся доминирование зубчатой извилины как объекта в исследованиях связи ДВП с экспрессией генов, тогда как сведений о динамике транскриптома в поле CA1 при индукции ДВП в синапсах CA3-CA1 почти нет, несмотря на интенсивное использование этой области для анализа механизмов синаптической пластичности. Также крайне мало подобных работ на срезах гиппокампа, хотя именно условия *in vitro* открывают широкие возможности для применения в качестве исследовательского инструмента экзогенных лигандов.

Одним из немногих транскрипционных факторов, роль которых в регуляции гена *S100B* доказана, является p53. Анализ внутриклеточных молекулярных каскадов, вовлеченных в механизмы синаптической пластичности, и путей регуляции p53 показывает теоретическую возможность его активации при индукции ДВП.

Транскрипционный фактор p53 – важнейший регулятор процесса "программированной клеточной смерти" (апоптоза), однако список его

функций постоянно пополняется (Vousden and Prives, 2009). Показано, что p53 регулирует пролиферацию и дифференцировку нейронных стволовых клеток, рост и регенерацию аксонов (Tedeschi and Di Giovanni, 2009; Solá et al., 2012), а также метаболический гомеостаз, причем p53-зависимый ответ на стресс может быть не только проапоптозным, но и адаптивным (Maddocks and Vousden, 2011; Itahana et al., 2014).

Нижележащие элементы системы апоптоза (белки семейства Bcl2 и регулируемые ими протеолитические ферменты, каспазы) также могут участвовать в процессах, не связанных с клеточной смертью, включая и синаптическую пластичность (Гуляева, 2004; Кудряшова и др., 2005; Bravarenko et al., 2006; Solá et al., 2012; Snigdha et al., 2012; Li and Sheng, 2012). Поскольку p53 регулирует экспрессию многих про- и антиапоптозных факторов, включая ряд белков семейства Bcl2, изучение транскрипционной активности p53 и экспрессии его мишеней при формировании ДВП представляется актуальной задачей.

Таким образом, исследование влияния нейронной активности на генетический аппарат глии и вклада транскрипционного фактора p53 в регуляцию генов при формировании ДВП представляет собой комплекс взаимосвязанных проблем, решение которых необходимо для развития существующих представлений о связи нейропластичности и экспрессии генов.

Глава 3. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Животные

Эксперименты проведены на 1085 срезах гиппокампа, полученных от 301 крысы-самца Wistar весом 180-300 г (возраст 1,5-3 мес.), выращенных в виварии Института Цитологии и Генетики (г. Новосибирск). После транспортировки животных содержали не менее недели в отдельном помещении в условиях свободного доступа к пище и воде при световом режиме 12 ч день/12 ч ночь. Эксперимент начинали в середине дневного периода.

3.2. Приготовление срезов гиппокампа

После декапитации животного мозг помещали в холодный (1-3°C) аэрированный карбогеном (95% O₂, 5% CO₂) физиологический раствор следующего состава (мМ): NaCl – 126, KCl – 4, NaH₂PO₄ – 1.24, MgSO₄ – 1.3, CaCl₂ – 2, NaHCO₃ – 26, глюкоза – 10, pH 7.4. После выделения левый гиппокамп переносили на агаровую подложку и готовили срезы (толщина 400 мкм) из его дорзальной части с помощью чоппера. Направление срезов составляло 60° относительно продольной (септо-темпоральной) оси гиппокампа (рисунок 2), что соответствует доминирующему направлению коллатералей Шаффера в этой части гиппокампа (Митюшов и др., 1986; Ishizuka et al., 1990; Ropireddy and Ascoli, 2011). Срезы помещали в проточную (2 мл/мин, 22-24°C) камеру на 30 мин, в течение последующих 20 мин температуру поднимали до 32-33°C.

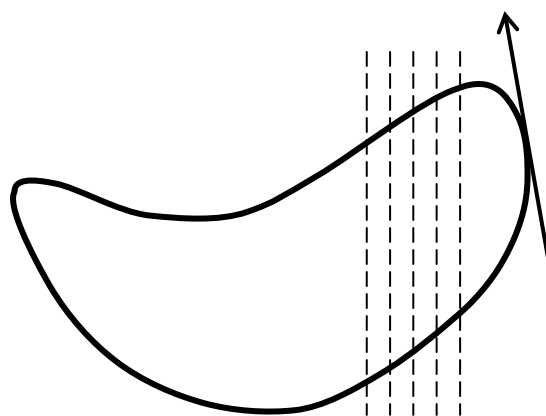


Рис. 2. Ориентация срезов гиппокампа.

Левый гиппокамп разворачивали на поверхности агарового блока, как показано на рисунке. Вид сверху, стрелка – ростральное направление. Пунктирные линии – плоскости срезов.

3.3. Электрофизиологические эксперименты

Внеклеточный регистрирующий и стимулирующие электроды помещали в пирамидном и радиальном слоях поля CA1 соответственно (рисунок 3). Амплитуду популяционного спайка (п-спайка), вызванного стимуляцией коллатералей Шаффера, определяли как расстояние от максимально негативной точки спайка до линии, соединяющей ближайшие к этой точке максимумы потенциала (рисунок 4). За наклон полевого возбуждающего постсинаптического потенциала (пВПСП) принимали тангенс наклона линии, соединяющей минимум волоконного ответа с максимумом позитивной волны вызванного ответа (рисунок 4). Интенсивность тестирующего/тетанизирующего стимула подбирали таким образом, чтобы амплитуда п-спайка в ответе составляла ~50% максимальной. Тетанизацию (4 серии стимулов (100 Гц, 1 с) с интервалом 30 с) или низкочастотную стимуляцию [НС] (400 стимулов в течение 91 с, что соответствует частоте 4,4 Гц) начинали через 2,5-3,5 ч после приготовления срезов. При проверке эффективности протоколов стимуляции в отношении

индукции потенциации, использовали один срез гиппокампа от каждого животного. Интервал тестирования в этих экспериментах составлял 5 мин.

Для проведения биохимических анализов от каждого животного брали по 4 среза гиппокампа. При исследовании влияния тетанизации или НС на динамику экспрессии генов в интервале до 2 ч (включительно) после стимуляции один из срезов служил контролем и не подвергался никаким манипуляциям в течение всего времени инкубации (4,5 ч). Три других среза тетанизировали или подвергали низкочастотной стимуляции за 10-120 мин до окончания инкубации (рисунок 5). Электроды устанавливали на срез за 5 мин до и убирали сразу после стимуляции. При исследовании влияния тетанизации на экспрессию *S100B* через 4-6 ч после тетанизации два среза из четырех стимулировали через 2,5 ч после приготовления, затем стимулированные и контрольные срезы извлекали из камеры попарно через соответствующие промежутки времени. Для приготовления образцов РНК/белка объединяли по 3-5 срезов от разных животных.

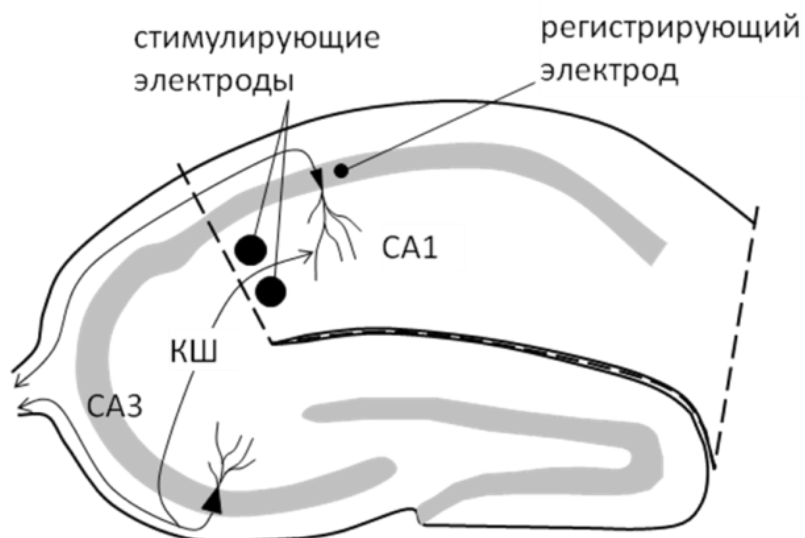


Рис. 3. Расположение электродов в срезе гиппокампа

Пунктиром выделена область (CA1), вырезавшаяся в конце эксперимента для проведения биохимических анализов. КШ – коллатерали Шаффера.

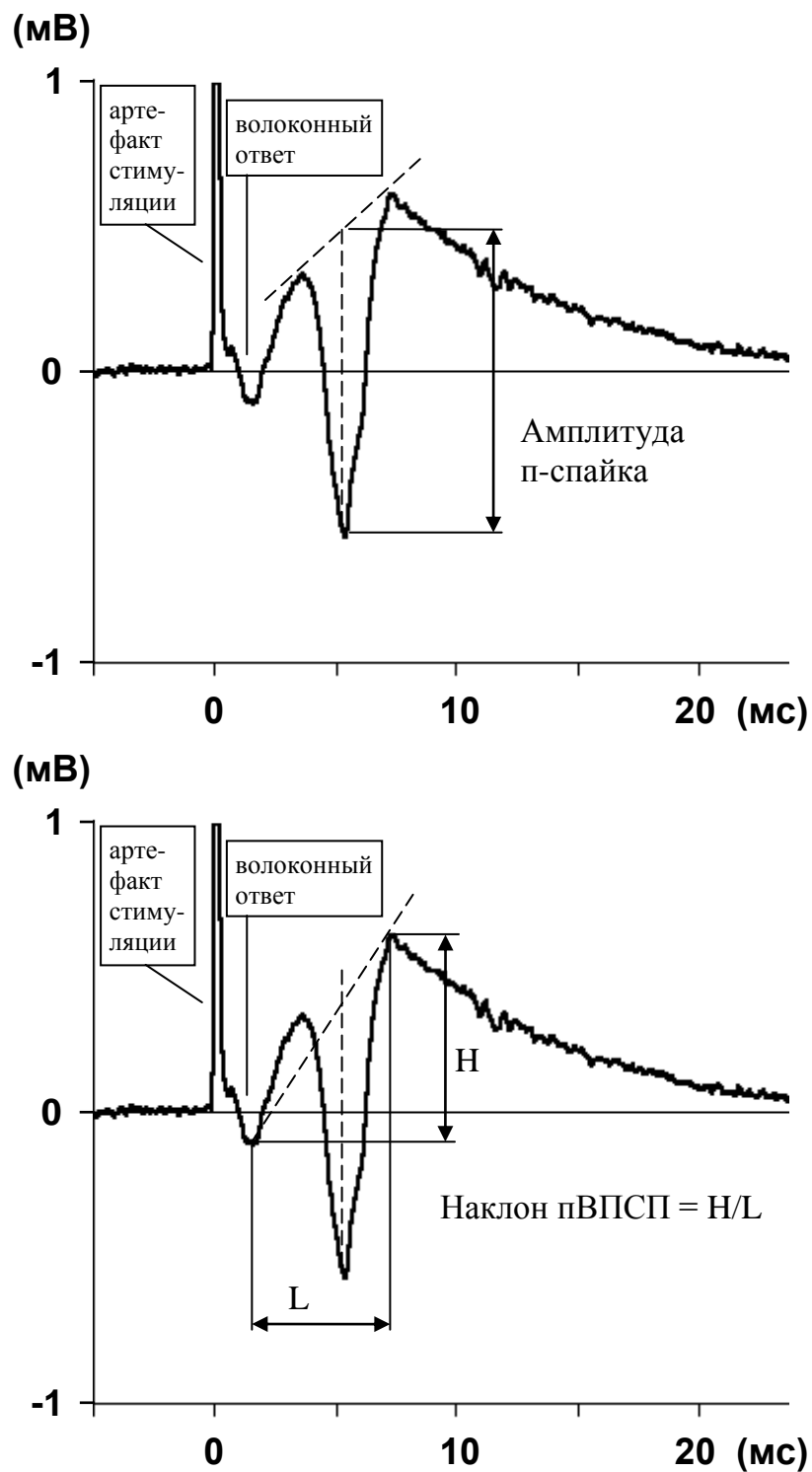


Рис. 4. Определение параметров вызванного ответа.

Ордината – потенциал (мВ), абсцисса – время от момента стимуляции (мс). Пояснения в тексте.

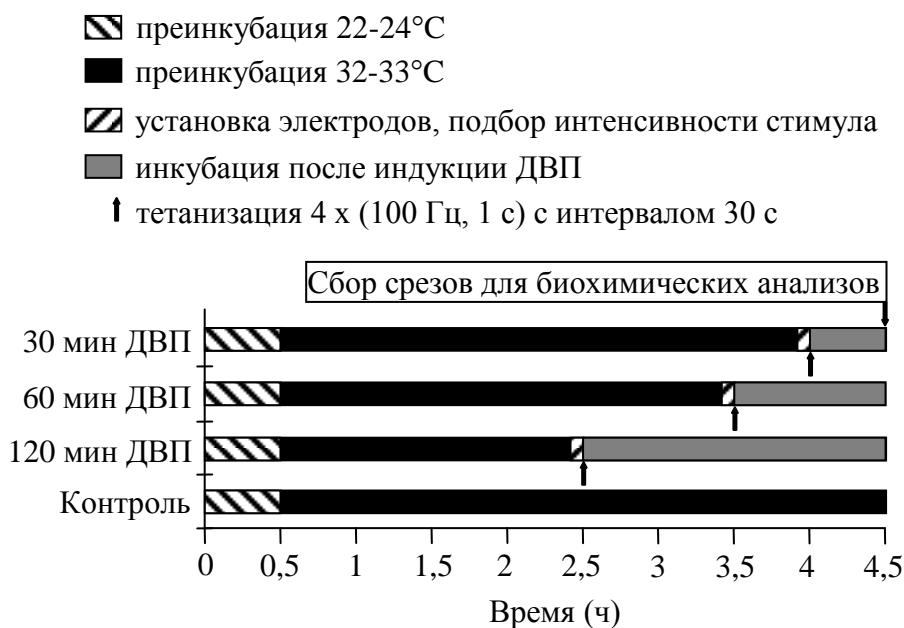


Рис. 5. Порядок подготовки срезов для биохимических анализов.

Отсчет времени – от момента помещения срезов в экспериментальную камеру. Аналогично готовили срезы для временных точек 30, 60 и 120 мин после низкочастотной стимуляции и 10, 20 и 40 мин после индукции ДВП. Стрелками отмечен момент воздействия. Пояснения в тексте.

В экспериментах с ингибиторами сигнальных молекул и соответствующих контрольных экспериментах тетанизацию одного среза проводили через 3 ч 45 мин после приготовления срезов, второго – через 4 минуты, после чего оставляли срезы в камере ещё на 30 мин (при изучении эффектов МК-801 или nutlin-3) или на 20 мин (в остальных случаях). Два контрольных среза извлекали из камеры в интервале между извлечениями тетанизированных срезов.

Ингибиторы (кроме МК-801) растворяли в ДМСО, МК-801 – в воде (10 мМ), аликвоты хранили при -20°C . Концентрация маточных растворов подбиралась таким образом, чтобы концентрация ДМСО в рабочем растворе составляла 0,1% (разведение 1:1000). Физиологический раствор с МК-801 подавали в экспериментальную камеру за 20 мин до и отмывали через 10 мин после начала тетанизации. Остальные исследуемые препараты или

растворитель добавляли к протоке за 30 мин до тетанизации и оставляли до окончания эксперимента.

3.4. Ингибиторы сигнальных путей

На рисунке 6 представлена гипотетическая схема регуляции экспрессии *S100B* при развитии потенциации, на основании которой выбирались препараты для исследования, которые также показаны на рисунке. Более детальное описание схемы приведено в обзоре литературы (раздел 2.7).

Были изучены эффекты ингибитора убиквитинлигазы Mdm2 nutlin-3 (20 мкМ, количество экспериментов в контрольной группе $n_1=4$, количество экспериментов с ингибитором $n_2=4$), ингибитора кальмодулинкиназ KN-93 (5 мкМ, $n_1=n_2=3$) и его неактивного аналога KN-92 (5 мкМ, $n_1=n_2=3$), ингибитора протеинкиназ K-252a (10-200 нМ, $n_1=n_2=4$), ингибиторов MAPK киназы MEK1 (PD 98059, 40 мкМ, $n_1=n_2=3$), MAP киназы p38 (SB 202190, 1 мкМ, $n_1=n_2=3$), RSK (BRD7389, 10 мкМ, $n_1=4$, $n_2=3$), протеинкиназ C и RSK2 (bisindolylmaleimide I, 100 нМ, $n_1=n_2=3$), деацетилазы Sirt1 (EX-527, 1 мкМ, $n_1=n_2=4$), ингибитора p53-зависимой транскрипции (cyclic pifithrin- α , 5 мкМ, $n_1=3$, $n_2=4$), блокатора глутаматных рецепторов NMDA-типа (МК-801, 10 мкМ, $n_1=5$, $n_2=4$). Указанные значения n соответствуют количеству пар (интактный/тетанизированный) образцов РНК/белка, для получения которых объединяли по 4 среза от двух животных.

Ингибитор Mdm2 nutlin-3 (Sigma). Nutlin-3 – ингибитор убиквитинлигазы Mdm2, являющейся антагонистом транскрипционного фактора p53. Nutlin-3a (активный стереоизомер nutlin-3) в концентрации 10 мкМ вызывает увеличение количества белка p53 и его транскрипционной активности (Vassilev et al., 2004).

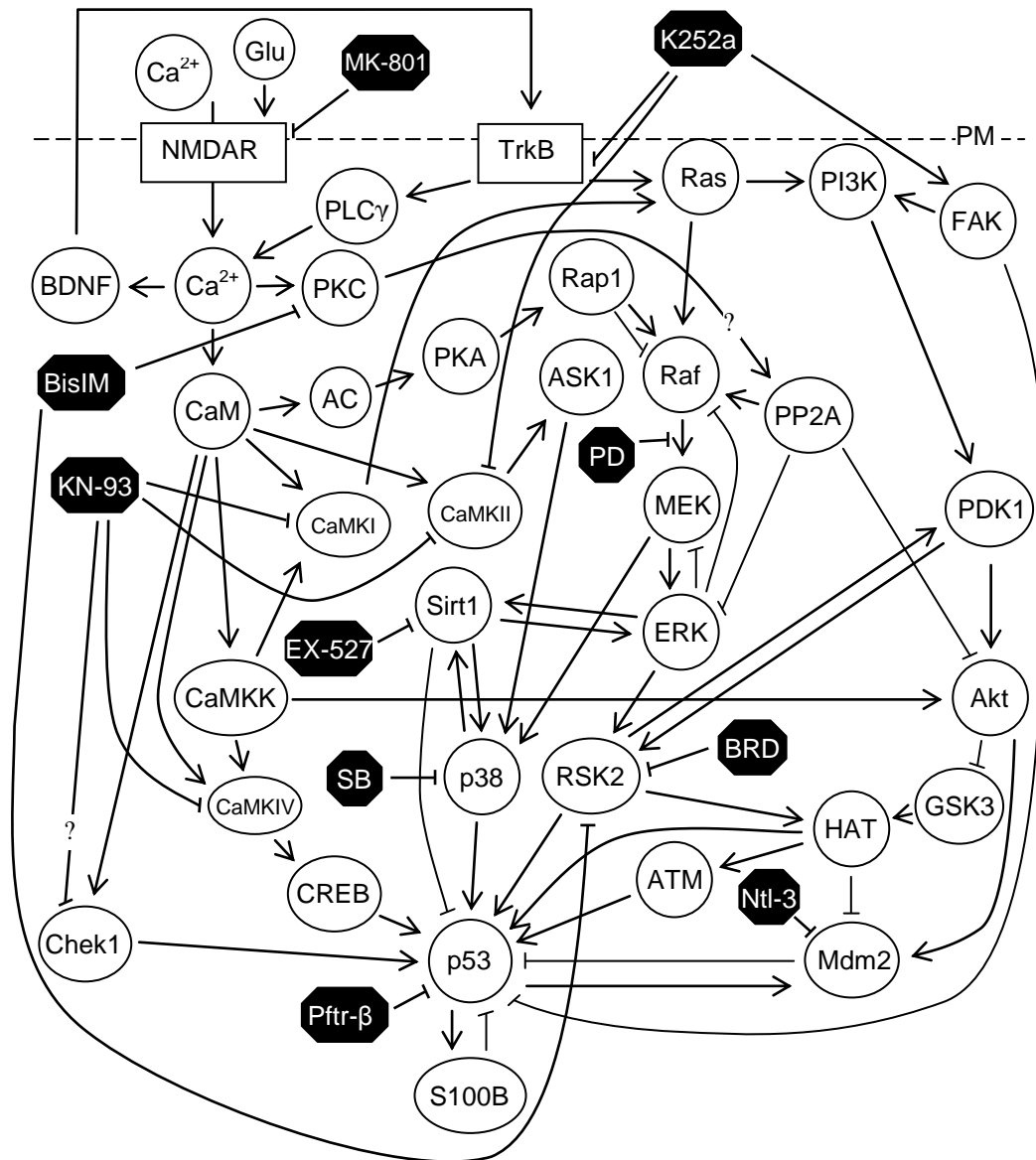


Рис. 6. Ингибиторы сигнальных каскадов, использованные для идентификации путей регуляции экспрессии S100B, связанной с индукцией ДВП

Черными восьмиугольниками обозначены использованные в работе ингибиторы. BisIM – bisindolylmaleimide I; BRD – BRD7389; Ntl-3 – nutlin-3; PD – PD98059; SB – SB202190; Pfttr-β – pifithrin-β. FAK – focal adhesion kinase. Остальные обозначения – как на рисунке 1.

Ингибитор кальмодулинкиназ KN-93 и его неактивный аналог KN-92 (Calbiochem). KN-93 препятствует активации Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ, нарушая их связывание с кальмодулином, и не блокирует

кальмодулин-независимую (автономную) активность CaMKII (Sumi et al., 1991). Показана его эффективность в отношении CaMKI (Condon et al., 2002) и CaMKIV (Qin et al., 2002). KN-93 может также нарушать работу потенциалзависимых калиевых и кальциевых каналов (Wayman et al., 2011). Например, KN-93 и KN-92 блокируют кальциевые каналы L-типа (50%-ное подавление в течение 1 ч при концентрации 1 мкМ) (Gao et al., 2006).

K-252a (Sigma) ингибирует различные протеинкиназы, включая протеинкиназы A, C и G, конкурируя с АТФ за места связывания (K_i 18-25 нМ) (Kase et al., 1987). Используется также как эффективный блокатор CaMKII (IC_{50} 2,8 нМ) (Hashimoto et al., 1991) и тирозинкиназных рецепторов нейротрофинов (IC_{50} 3 нМ) (Berg et al., 1992). Эффективность ингибирования различных кальмодулин-зависимых киназ значительно варьирует, например, IC_{50} для MLCK (myosin light chain kinase) составляет 1-3 мкМ (Nakanishi et al., 1988).

PD 98059 (Sigma) – ингибитор активации MAPK киназы MEK1 (IC_{50} 2-7 мкМ), связывается с дефосфорилированной (неактивной) MEK1, препятствуя ее активации MAPKK киназой Raf (Alessi et al., 1995).

SB 202190 (Sigma) – ингибитор основных изоформ MAP киназы p38 (α и β). В концентрации 1 мкМ ингибирует p38 α/β на 95-97% (Bain et al., 2007).

Bisindolylmaleimide I (Calbiochem) – ингибитор кальцийзависимых изоформ (α , β и γ) протеинкиназы C (IC_{50} 8-20 нМ) (Martiny-Baron et al., 1993), в концентрации 100 нМ подавляет суммарную активность этих изоформ примерно на порядок. Производные бисиндолилмалеимида с близкой эффективностью ингибируют как протеинкиназу Ca, так и RSK2 (Bain et al., 2007). В более высоких концентрациях подавляет также активность протеинкиназ C ϵ и C δ (IC_{50} 132 и 210 нМ, соответственно) (Martiny-Baron et al., 1993).

Ингибитор киназ семейства RSK BRD7389 (Sigma) в концентрации 10 мкМ на 71-86% ингибирует киназы RSK (Fomina-Yadlin et al., 2010).

EX-527 (Sigma) – селективный ингибитор Sirt1 (IC_{50} 38 нМ), гораздо менее эффективен в отношении Sirt2/3 (IC_{50} 20-50 мкМ), не ингибирует деацетилазы классов I/II в концентрации до 100 мкМ. Увеличивает индуцированное генотоксическими агентами ацетилирование лизина 382 (мишень Sirt1) в белке p53 клеток человека, с максимальным эффектом в концентрации 1 мкМ (Solomon et al., 2006).

Cyclic pifithrin- α (pifithrin- β , Sigma) – более стабильный и менее токсичный аналог пифитрина- α со сходной биологической активностью, представляющий собой продукт его спонтанной трансформации, происходящей в физиологических условиях (Gary and Jensen, 2005). Пифитрин- α (10-30 мкМ) уменьшает количество p53 в ядре и ингибирует p53-зависимую транскрипцию (Komarov et al., 1999). Pifithrin- β хуже растворяется в воде (Gary and Jensen, 2005), и мы вынуждены были снизить его концентрацию до 5 мкМ, поскольку при концентрации 10 мкМ в наших условиях формировался преципитат. Это снижение вряд ли могло быть критичным, поскольку концентрации пифитрина- β 1 и 10 мкМ обладают сходной антиапоптозной активностью (Da Pozzo et al., 2014).

3.5. Хранение материала

По окончании инкубации срезы помещали в холодный физиологический раствор и вырезали из них поле CA1, как показано на рисунке 3. Использовали два альтернативных способа предварительного хранения материала: 1) помещение в жидкий азот, с последующим переносом в морозильную камеру (-70°C); 2) консервация в протекторном реагенте (Allprotect Tissue Reagent, Qiagen) в течение 18 ч при 4°C , хранение при температуре -20°C .

3.6. ПЦР в реальном времени

Для выделения суммарной РНК и обработки ДНКазой I применяли коммерческие наборы (Qiagen), обратную транскрипцию проводили с помощью набора RT² First Strand cDNA Synthesis Kit (Qiagen), в соответствии с протоколами производителя. Для определения уровня мРНК проводили ПЦР в реальном времени с использованием iTaq SYBR Green Supermix with ROX (Bio-Rad Laboratories) на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad Laboratories). В качестве гена сравнения был выбран *β-actin*. Используемые в работе праймеры перечислены в таблице 1. Оптимальная концентрация всех пар праймеров в реакционной смеси составила 300 нМ. ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 25 нг кДНК, в следующих условиях: предварительный прогрев (95°C, 3 мин), затем 40 циклов: денатурация (95°C, 15 с), отжиг (58°C, 20 с), элонгация (72°C, 20 с), измерение флуоресценции (80°C, 10 с). Для контроля специфичности ПЦР использовали кривые плавления. Относительный уровень мРНК (FC, fold change) оценивали с использованием значений пороговых циклов C_T с учетом эффективностей реакций (E) исследуемого гена и гена сравнения (Livak and Schmittgen, 2001):

$$FC = \frac{(1 + E_x)^{-C_{T,x,q}}}{(1 + E_r)^{-C_{T,r,q}}} \times \frac{(1 + E_r)^{-C_{T,r,cb}}}{(1 + E_x)^{-C_{T,x,cb}}}$$

где E_x и E_r – эффективности реакций для исследуемого гена (x) и гена сравнения (r), $C_{T,x/r,q}$ и $C_{T,x/r,cb}$ – величины пороговых циклов для стимулированных (q) и контрольных (cb) срезов. Для определения величины E готовили серию разведений образцов кДНК, строили графики зависимости C_T от логарифма разведения кДНК и вычисляли коэффициент наклона (a) линии регрессии по методу наименьших квадратов. Значение E получали из уравнения (Schmittgen and Livak, 2008):

$$a = -1/\log(1 + E)$$

Таблица 1. Праймеры, использованные в ПЦР анализе.

| Ген | Праймеры |
|---------------------------------|--|
| <i>S100B</i> | F: 5'-TTGCCCTCATTGATGTCTTCCA-3' R: 5'-TCTGCCTTGATTCTTACAGGTGAC-3' |
| <i>S100A1</i> | F: 5'-CCATGGAGACCCTCATCAAT-3' R: 5'-TTCTGGACATCCAGGAAGC-3' |
| <i>Fos</i> | F: 5'-AGCTGAAGGCTGAACCCTTTGATG-3' R: 5'- TCCCAGTCTGCTGCATAGAAGGA-3' |
| <i>Jun</i> | F: 5'-ATGGAGTCTCAGGAGCGGATCAA-3' R: 5'-ACTTTCTGCTTAAGCTGTGCCACC-3' |
| <i>JunB</i> | F: 5'-AGACCAAGAGCGCATCAAAGTGGA-3' R: 5'-GGGTCATGACCTTCTGTTTGAGCT-3' |
| <i>Egr1</i> | F: 5'-AGCACCTGACCACAGAGTCC-3' R: 5'-CCACTGACTAGGCTGAAAAGG-3' |
| <i>p53</i> | F: 5'-GGATGCCCGTGCTGCCGAGGAG-3' R: 5'-AGTGAAGGGACTAGCATTTGTC-3' |
| <i>β-actin</i> | F: 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3' R: 5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3' |

При изучении экспрессии мишеней p53 через 30 мин после тетанизации для проведения ПЦР в реальном времени использовали прибор CFX96 ("Bio-Rad") и набор праймеров "p53 Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array" (PARN-027Z; "Qiagen"). Указанный набор содержал, в частности, праймеры для мРНК *Egr1* и *Jun*. Полученные для этих генов данные были объединены с результатами измерения на IQ5. Кроме того, для статистической оценки изменения уровней мРНК *Egr1*, *Fos*, *Jun* и *JunB* через 30 мин после тетанизации использовали данные, полученные на CFX96 с использованием набора "Synaptic Plasticity RT² Profiler PCR Array" (PARN-126Z; "Qiagen"), которые значимо не отличались от результатов, полученных с помощью IQ5. Описание генов набора "p53 Signaling Pathway" приведено в таблице 2.

Таблица 2. Гены набора "p53 Signaling Pathway".

| RefSeq | Символ | Описание | Названия гена |
|--------------|---------------|--|---|
| NM_023979 | <i>Apaf1</i> | Apoptotic peptidase activating factor 1 | - |
| NM_024148 | <i>Apex1</i> | APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 | APE, Apex, REF-1 |
| NM_001106821 | <i>Atm</i> | Ataxia telangiectasia mutated homolog (human) | - |
| NM_001106647 | <i>Bag1</i> | BCL2-associated athanogene | - |
| NM_017059 | <i>Bax</i> | Bcl2-associated X protein | - |
| NM_173837 | <i>Bbc3</i> | Bcl-2 binding component 3 | Puma |
| NM_016993 | <i>Bcl2</i> | B-cell CLL/lymphoma 2 | Bcl-2 |
| NM_022684 | <i>Bid</i> | BH3 interacting domain death agonist | - |
| NM_022274 | <i>Birc5</i> | Baculoviral IAP repeat-containing 5 | AP14 |
| NM_053420 | <i>Bnip3</i> | BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3 | MGC93043 |
| NM_012514 | <i>Brca1</i> | Breast cancer 1 | - |
| NM_031542 | <i>Brca2</i> | Breast cancer 2 | - |
| NM_017259 | <i>Btg2</i> | BTG family, member 2 | Agl, An, Pc3, Tis21, an-1 |
| NM_022522 | <i>Casp2</i> | Caspase 2 | - |
| NM_031632 | <i>Casp9</i> | Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase | Apaf3, Casp-9-CTD, Casp9_v1, Ice-Lap6, Mch6 |
| NM_171991 | <i>Ccnb1</i> | Cyclin B1 | - |
| NM_001100821 | <i>Ccne1</i> | Cyclin E1 | CYCLE, Ccne |
| NM_012923 | <i>Ccng1</i> | Cyclin G1 | CYCG, Ccng, MGC93642 |
| NM_052981 | <i>Ccnh</i> | Cyclin H | - |
| NM_133571 | <i>Cdc25a</i> | Cell division cycle 25 homolog A (<i>S. pombe</i>) | - |
| NM_001107396 | <i>Cdc25c</i> | Cell division cycle 25 homolog C (<i>S. pombe</i>) | - |
| NM_019296 | <i>Cdk1</i> | Cyclin-dependent kinase 1 | Cdc2, Cdc2a |
| NM_053593 | <i>Cdk4</i> | Cyclin-dependent kinase 4 | - |
| NM_080782 | <i>Cdkn1a</i> | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A | Cip1, Waf1 |
| NM_031550 | <i>Cdkn2a</i> | Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A | Arf, INK4A, MTS1, p16, p16Cdkn2a, p19ARF |
| NM_080400 | <i>Chek1</i> | CHK1 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>) | - |

| RefSeq | Символ | Описание | Названия гена |
|---------------|------------------|---|--|
| NM_053677 | <i>Chek2</i> | CHK2 checkpoint homolog (S. pombe) | Chk2, Rad53 |
| XM_236927 | <i>Cul9</i> | Cullin 9 | Parc, RGD1562008 |
| NM_001107335 | <i>Dapk1</i> | Death associated protein kinase 1 | - |
| NM_053354 | <i>Dnmt1</i> | DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1 | - |
| NM_001100778 | <i>E2f1</i> | E2F transcription factor 1 | - |
| NM_001137626 | <i>E2f3</i> | E2F transcription factor 3 | RGD1561600 |
| NM_031507 | <i>Egfr</i> | Epidermal growth factor receptor | ERBB1, ErbB-1, Errp |
| NM_012551 | <i>Egr1</i> | Early growth response 1 | Krox-24, NGFI-A, Ngf1, Ngfi, zif-268 |
| XM_576312 | <i>Ep300</i> | E1A binding protein p300 | - |
| NM_001106228 | <i>Ercc1</i> | Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 | - |
| NM_012689 | <i>Esr1</i> | Estrogen receptor 1 | ER-alpha, Esr, RNESTROR |
| NM_152937 | <i>Fadd</i> | Fas (TNFRSF6)-associated via death domain | Mort1 |
| NM_139194 | <i>Fas</i> | Fas (TNF receptor superfamily, member 6) | Tnfrsf6 |
| NM_012908 | <i>Faslg</i> | Fas ligand (TNF superfamily, member 6) | Apt1Lg1, CD95-L, Fas1, Tnfsf6 |
| NM_001106395 | <i>Foxo3</i> | Forkhead box O3 | Fkhr11, Foxo3a |
| NM_024127 | <i>Gadd45a</i> | Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | Ddit1, Gadd45 |
| NM_001025409 | <i>Hdac1</i> | Histone deacetylase 1 | - |
| NM_024359 | <i>Hif1a</i> | Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) | MOP1 |
| NM_052807 | <i>Igf1r</i> | Insulin-like growth factor 1 receptor | IGFIRC, JTK13 |
| NM_012589 | <i>Il6</i> | Interleukin 6 | ILg6, Ifnb2 |
| NM_021835 | <i>Jun</i> | Jun oncogene | - |
| NM_031515 | <i>Kras</i> | V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog | Kras2, c-Ki-ras, p21 |
| NM_001106095 | <i>Lig4</i> | Ligase IV, DNA, ATP-dependent | - |
| XM_346005 | <i>LOC367198</i> | Similar to Serine/threonine-protein kinase ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) | - |
| NM_021846 | <i>Mcl1</i> | Myeloid cell leukemia sequence 1 | - |

| RefSeq | Символ | Описание | Названия гена |
|--------------|-------------------|---|------------------------------------|
| NM_001108099 | <i>Mdm2</i> | Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse) | - |
| NM_001012026 | <i>Mdm4</i> | Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse) | - |
| NM_031053 | <i>Mlh1</i> | MutL homolog 1 (E. coli) | - |
| NM_031058 | <i>Msh2</i> | MutS homolog 2 (E. coli) | - |
| NM_012603 | <i>Myc</i> | Myelocytomatosis oncogene | MGC105490, RNCMYC, c-мус, mMyc |
| NM_176079 | <i>Myod1</i> | Myogenic differentiation 1 | MGC156574 |
| NM_012609 | <i>Nf1</i> | Neurofibromin 1 | - |
| XM_342346 | <i>Nfkb1</i> | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 | NF-kB |
| NM_022381 | <i>Pcna</i> | Proliferating cell nuclear antigen | PCNAR, Pcna, cyclin |
| NM_001008385 | <i>Pmaip1</i> | Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 | Noxa |
| NM_001105825 | <i>Ppm1d</i> | Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform | - |
| NM_001107529 | <i>Prc1</i> | Protein regulator of cytokinesis 1 | - |
| NM_001105713 | <i>Prkca</i> | Protein kinase C, alpha | Pkca |
| NM_031606 | <i>Pten</i> | Phosphatase and tensin homolog | ММАС1, Mmac, TEP1 |
| NM_022391 | <i>Pttg1</i> | Pituitary tumor-transforming 1 | Pttg |
| NM_017045 | <i>Rb1</i> | Retinoblastoma 1 | - |
| NM_199267 | <i>Rela</i> | V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian) | NFkB |
| NM_001109358 | <i>RGD1566319</i> | Similar to Sestrin 2 (Hi95) | - |
| NM_001044276 | <i>Rprm</i> | Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate | MGC109515 |
| NM_057108 | <i>Serpinb5</i> | Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5 | Maspin, PI-5, Pi5 |
| XM_232745 | <i>Sfn</i> | Stratifin | - |
| NM_001107627 | <i>Sirt1</i> | Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae) | Sir2 |
| NM_032612 | <i>Stat1</i> | Signal transducer and activator of transcription 1 | - |
| NM_012675 | <i>Tnf</i> | Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) | MGC124630, RATTNF, TNF-alpha, Tnfa |
| NM_001108873 | <i>Tnfrsf10b</i> | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b | - |

| RefSeq | Символ | Описание | Названия гена |
|--------------|-----------------|--|--------------------------|
| NM_030989 | <i>Trp53</i> | Tumor protein p53 | MGC112612, Trp53, p53 |
| XM_223012 | <i>Trp53bp2</i> | Tumor protein p53 binding protein, 2 | Trp53bp2 |
| NM_019221 | <i>Trp63</i> | Tumor protein p63 | Ket, P731, Trp731, Trp63 |
| NM_001108696 | <i>Trp73</i> | Tumor protein p73 | P73, Trp73 |
| NM_031534 | <i>Wt1</i> | Wilms tumor 1 | - |
| NM_001006999 | <i>Xrcc4</i> | X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4 | MGC95022 |
| NM_177419 | <i>Xrcc5</i> | X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 | Ku80, Kup80 |
| NM_022548 | <i>Zmat3</i> | Zinc finger, matrin type 3 | PAG608, Wig1 |

3.7. Вестерн блот

Для иммунохимической детекции белков использовали лизаты, полученные при гомогенизации срезов гиппокампа в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% NP-40, 1 mM DDT, 1 mM EDTA и ингибиторы протеаз Complete Mini protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Количество белка определяли методом Бредфорда, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта. 30 мг белка разделяли электрофорезом по методу Лэммли, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали сначала с первичными антителами против S100B (1:500, Millipore), p53 (1:500, Santa Cruz Biotechnology), Вах (1:2000, Abcam), Bcl2 (1:1000, Abcam) или b-actin (1:2000, Sigma-Aldrich), затем конъюгатом вторичных антител с пероксидазой (1:1000, Sigma-Aldrich). Визуализацию иммунореактивных полос проводили с использованием ECL-набора Visualizer Spray and Glow (Millipore).

3.8. Хроматиновая иммунопреципитация

Срезы гиппокампа гомогенизировали в буфере PBS, содержащем 0,4% NP-40. К гомогенату добавляли формальдегид до 1% и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением глицина до конечной концентрации 125 мМ, после чего проводили инкубацию 20 мин на льду. Гомогенат центрифугировали 3000 g, 10 мин и промывали охлажденным на льду буфером PBS, содержащим 0,4% NP-40. К осадку добавляли 650 мкл лизирующего буфера (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 1% Тритон X-100, 10 мМ ЭДТА, 1% SDS), содержащего ингибиторы протеаз (Complete Mini, “Roche Diagnostics”) и инкубировали на льду в течение 30 мин. Лизат подвергался озвучиванию на ультразвуковом дезинтеграторе (MicrosonTM Ultrasonic Liquid Processor XL-2000) на льду 3 раза по 20 сек через интервалы 30 сек при амплитуде равной 20 мкм. Средний размер хроматина, полученный после озвучивания, составлял 500-1000 п.н. Озвученный лизат центрифугировался при 13000 g, 10 мин и разбавлялся в 10 раз буфером (16,7 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 1,2 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 1,1% Тритон X-100, 0,01% SDS), содержащим ингибиторы протеаз (Complete Mini, “Roche Diagnostics”). 20 мкл неразбавленного лизата замораживали и хранили при температуре -20°C для позитивного контроля (Input).

Для предотвращения неспецифического связывания хроматина с белком G проводили предварительную очистку разбавленного лизата добавлением агарозы, конъюгированной с белком G (Protein G Agarose/ Salmon Sperm DNA, “Millipore”) (20 мкл на 1 мл разбавленного лизата) с последующим инкубированием при 4°C , 1 ч при постоянном перемешивании. Агарозу удаляли центрифугированием при 5000 g, 1 мин. Супернатант (2 мл) переносили в новые пробирки и инкубировали при 4°C , 18 ч при постоянном перемешивании с 5 мкг антител против белка p53 (sc-6243, Santa Cruz Biotechnology) или нормального кроличьего IgG. После инкубации с антителами в пробирки добавляли по 30 мкл агарозы, конъюгированной с

белком G (Protein G Agarose/ Salmon Sperm DNA, “Millipore”), и дополнительно инкубировали при 4°C, 1 ч при постоянном перемешивании.

Иммунокомплекс осаждали центрифугированием при 5000 g, 1 мин и последовательно промывали низко-солевым буфером (20 mM Трис-НСl, pH 8,0, 2 mM ЭДТА, 150 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 0,01% SDS), высоко-солевым буфером (20 mM Трис-НСl, pH 8,0, 2 mM ЭДТА, 500 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 0,01% SDS), LiCl буфером (10 mM Трис-НСl, pH 8,0, 250 mM LiCl, 1 mM ЭДТА, 1% NP-40) и дважды TE буфером (10 mM Трис-НСl, pH 8,0, 0,25 mM ЭДТА). К осадку иммунокомплекса добавляли 500 мкл буфера для элюции (100 mM NaHCO₃, 1% SDS, 0,3 M NaCl), инкубировали 15 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании и центрифугировали при 5000 g, 1 мин. К супернатанту добавляли NaCl до конечной концентрации 0,5 M и инкубировали при 65°C, 6 ч. После инкубации добавляли 20 мкл 0,5 M ЭДТА, 40 мкл Трис-НСl и 5 мкл протеиназы K (20 мг/мл) и дополнительно инкубировали при 42°C, 1 ч. Полученные фрагменты ДНК экстрагировали смесью фенол/хлороформ 1:1. Центрифугировали при 12000 g, 15 мин. К верхней водной фазе добавляли равный объем изопропилового спирта и инкубировали 18 ч при –20°C, затем центрифугировали при 12000 g, 15 мин. Супернатант собирали пипеткой и удаляли. Далее к осадку добавляли охлажденный 70% этиловый спирт, вновь проводили центрифугирование и удаляли супернатант, после чего осадок ДНК подсушивали под тягой при 42°C и растворяли в 15 мкл TE буфера.

Анализ полученной ДНК проводили методом ПЦР с использованием представленных в таблице 3 праймеров, специфичных для областей –760/–559 (Site1), –509/–309 (Site2) и +1/+205 (Site3) гена S100B крысы [нумерация нуклеотидов – от старта транскрипции, определенного Nagiwara and Sueoka (1995)]. Каждая проба ПЦР содержала 25 нг ДНК, 20 мкл 1x буфера для ПЦР (0,1 M Трис-НСl, pH 8,3, 0,5 M KCl, 1,8 mM MgCl₂), 0,2 mM dNTP, 20 пмоль соответствующих праймеров и 2 ед. ак. Taq-ДНК-полимеразы. Реакцию амплификации проводили в следующих температурных режимах: 95°C – 15

сек, 61°C – 15 сек и 72°C – 20 сек в течение 35 циклов, с использованием амплификатора “Терцик”, Россия. Продукты ПЦР разделяли методом горизонтального электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле.

Таблица 3. Праймеры, использованные для идентификации сайтов связывания p53

| Сайт | Праймеры |
|-------|---|
| Site1 | F: 5'-TGAGTCGAACCAGAGCAGGGGT-3' R: 5'-ACACACGTCCSTTTGCACCTCG-3' |
| Site2 | F: 5'-TGTGACAAGAGGCACAGCGTTTCT-3' R: 5'-TCTTCTCAGGGACCAGGGTGCG-3' |
| Site3 | F: 5'-TCCACATTTCTGCCCAACAGACC-3' R: 5'-TCCAGAGAGGACTGGGTGTGGACT-3' |

Все биохимические анализы выполнены Владимиром Олеговичем Пустыльняком, старшим научным сотрудником лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза НИИМББ.

3.9. Статистическая обработка

Данные приводятся в виде "среднее ± стандартная ошибка среднего", если не указано иное. Для оценки достоверности отличий использовали t-критерий Стьюдента, критерий знаков и ANOVA.

Для коррекции уровней значимости на множественные сравнения применяли метод Бенджамини-Хохберга. Для контроля FDR (false discovery rate) уровни значимости p распределяли в порядке возрастания: p_1, \dots, p_m . Затем находили максимальную величину k , для которой выполнялось условие:

$$p_k \leq \frac{k}{m} \times 0,05$$

В случае существования k , нулевые гипотезы, отвергнутые при p_{k+1}, \dots, p_m , принимали за ложные открытия. Соответствующие значения p в таблицах заключены в скобки – (p).

Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Оценка эффективности протоколов стимуляции

Для тетанизации использовали 4 разряда с частотой 100 Гц длительностью 1 с, с интервалом 30 с.

В контрольных экспериментах проводилось только тестирование популяционных ответов пирамидных нейронов CA1 на стимуляцию коллатералей Шаффера с интервалом 5 мин. Как показано на рисунке 7, тетанизация вызывала значительное увеличение амплитуды вызванных тестирующей стимуляцией п-спайков в поле CA1, которое сохранялось в течение всего времени наблюдения (3 ч). Двухфакторный ANOVA (группа{Тетанизация, Контроль}×время{36}) с повторными измерениями в факторе "время" показал достоверный эффект тетанизации, по сравнению с контролем, в период от 5 до 180 мин после тетанизации – $F(1, 7) = 18$, $p = 0,004$.

Низкочастотная стимуляция (НС) тем же количеством стимулов (400), распределенных равномерно в течение того же временного интервала (91 с, соответствует частоте 4,4 Гц), что и при тетанизации, не увеличивала амплитуду ответов (рисунок 7). Двухфакторный ANOVA (группа{НС, Контроль}×время{36}) с повторными измерениями в факторе "время" продемонстрировал отсутствие достоверного эффекта группы – $F(1, 5) = 1,6$, $p = 0,26$. При этом наблюдались достоверные эффекты времени и межфакторного взаимодействия – в обоих случаях $F(35, 175) = 2,9$, $p = 2 \cdot 10^{-6}$, что было связано с тенденцией к депрессии ответов сразу после НС и последующим кратковременным (до 65 мин после стимуляции) нарастанием их амплитуды. В период от 70 до 180 мин после НС указанные эффекты были недостоверны – $F(22, 110) = 1,5$, $p = 0,07$.

ANOVA {группа(НС, Тетанизация)×время(36)} с повторными измерениями в факторе "время" показал достоверное отличие влияния

тетанизации и низкочастотной стимуляции на амплитуду п-спайков – эффект группы $F(1, 6) = 10,6$, $p = 0,017$.

Добавление в перфузирующий раствор ДМСО (0,1%) в течение 60 мин не оказывало влияния на базальный уровень ответов и не нарушало индукцию или сохранение потенциации (рисунок 8). Двухфакторный ANOVA {группа(ДМСО, Контроль)×время(36)} с повторными измерениями в факторе "время" показал отсутствие достоверного эффекта группы – $F(1, 7) = 0,7$, $p = 0,43$. Соответственно, t -критерий Стьюдента также не выявил различий между группами ни в одной из временных точек.

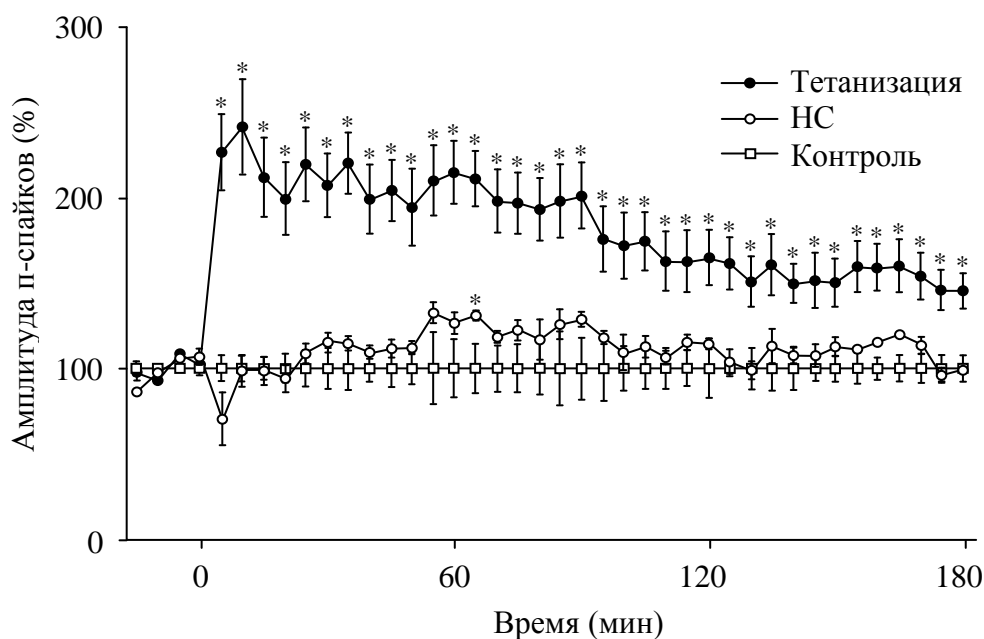


Рис. 7. Влияние тетанизации и низкочастотной стимуляции на амплитуду п-спайков в пирамидном слое поля СА1 срезов гиппокампа крыс.

П-спайки были вызваны стимуляцией коллатералей Шаффера с интервалом 5 мин. Абсцисса – время после начала тетанизации ($n=5$) или низкочастотной стимуляции (НС, $n=3$). Ордината – амплитуда п-спайка, нормированная дважды: сначала относительно средней амплитуды п-спайка в ответах на 4 стимула, предшествовавших тетанизации или низкочастотной стимуляции, или соответствующего периода контрольных экспериментов, затем относительно средней амплитуды ответов в контрольной группе ($n=4$). * – $p < 0,05$, относительно контрольной группы, t -критерий Стьюдента.

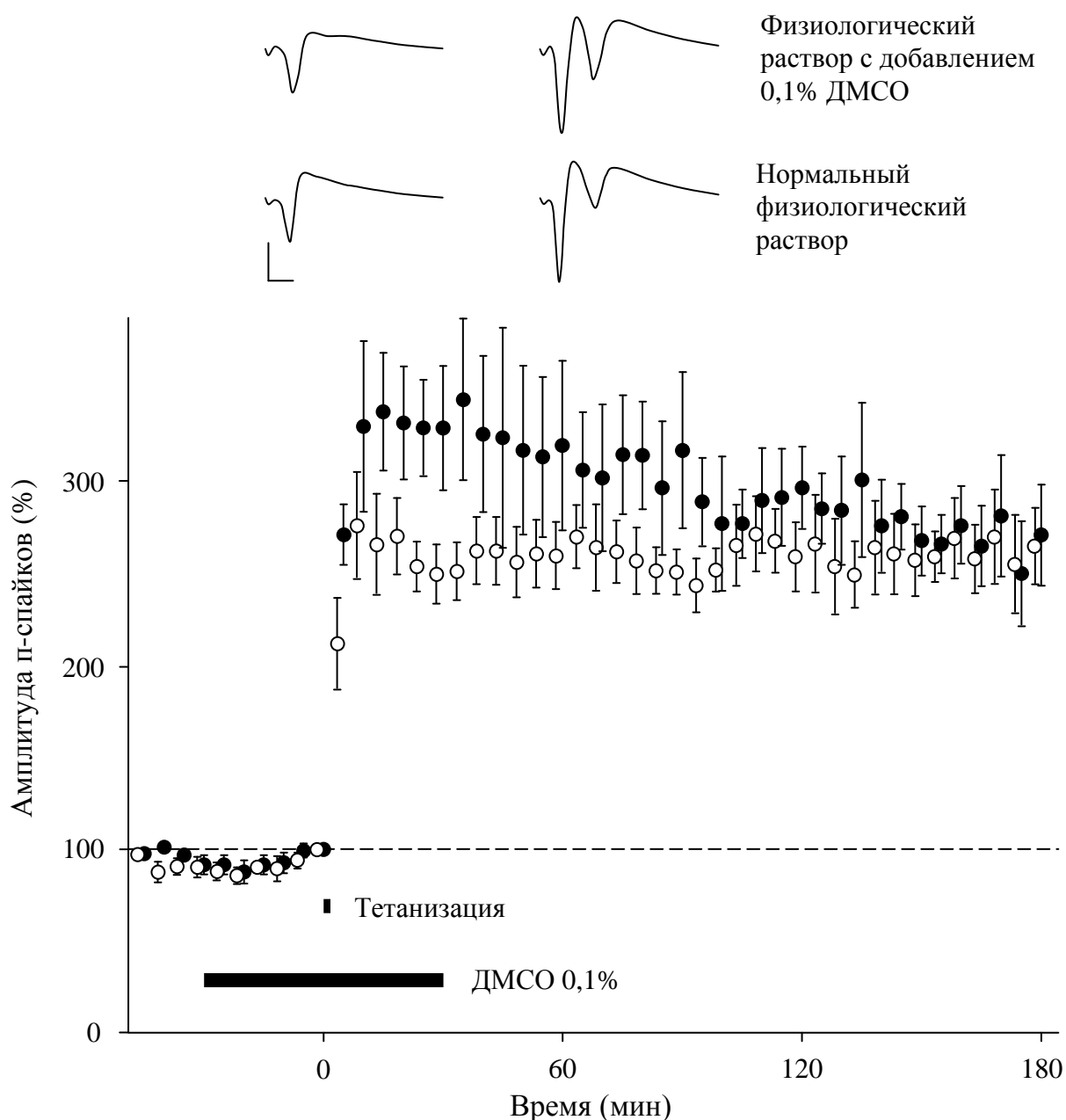


Рис. 8. Долговременная потенция в поле CA1 в нормальном физиологическом растворе и в присутствии 0,1% ДМСО.

Абсцисса – время после начала тетанизации. Ордината – амплитуда п-спайка, нормированная относительно амплитуды п-спайка в ответе на стимул, непосредственно предшествовавший тетанизации. Темными полосами в нижней части рисунка отмечено время инкубации с ДМСО и общее время тетанизации (включая интервалы между разрядами). Черные кружки – эксперименты с ДМСО ($n = 4$), светлые – с нормальным физиологическим раствором ($n = 5$). В верхней части рисунка – репрезентативные ответы на стимулы, предъявленные за 5 мин до (слева) и через 30 мин после (справа) тетанизации. Калибровка: 3 мс, 1 мВ.

4.2. Динамика уровня мРНК *S100B* и *S100A1* после тетанизации или низкочастотной стимуляции в поле CA1 гиппокампа крыс

При проведении биохимических тестов мы объединяли материал, полученный в нескольких (от трех до шести) электрофизиологических экспериментах, что позволяло, во-первых, получить достаточное количество материала при максимально возможной в наших условиях локализации изучаемой области, и, во-вторых, снизить дисперсию и, соответственно, количество анализов, необходимых для получения воспроизводимых результатов. В первой серии экспериментов каждый образец РНК содержал материал от пяти животных.

Тетанизация коллатералей Шаффера достоверно увеличивала содержание мРНК как *S100B*, так и *S100A1* в поле CA1, по сравнению с контрольными интактными срезами, находившимися в той же камере, что и стимулированные срезы (рисунок 9). В обоих случаях двухфакторный ANOVA (группа {Тетанизация, Контроль} × время {30 мин, 60 мин, 120 мин}) с повторными измерениями в факторе "время" показал достоверные эффекты группы {*S100B*: $F(1, 6) = 28$, $p = 0,002$; *S100A1*: $F(1, 4) = 248$, $p = 0,0001$ }. Однако динамика индуцированной тетанизацией экспрессии *S100B* и *S100A1* оказалась разной, что отразилось в отличиях в эффектах времени {*S100B*: $F(2, 12) = 38$, $p = 0,00001$; *S100A1*: $F(2, 8) = 4,1$, $p = 0,06$ } и межфакторного взаимодействия {*S100B*: $F(2, 12) = 38$, $p = 0,00001$; *S100A1*: $F(2, 8) = 4,1$, $p = 0,06$ }.

Уже через 30 мин после тетанизации в образцах наблюдалось значительное увеличение уровня мРНК *S100B* (рисунок 9), до $286 \pm 27\%$ относительно контрольных [нестимулированных] срезов ($p = 0,006$, $n = 4$, парный t-критерий Стьюдента), затем ее уровень постепенно снижался (до $218 \pm 26\%$ через 60 мин, $p = 0,02$, $n = 4$) и через 120 мин после тетанизации мало отличался от контроля ($128 \pm 14\%$, $p = 0,14$, $n = 4$).

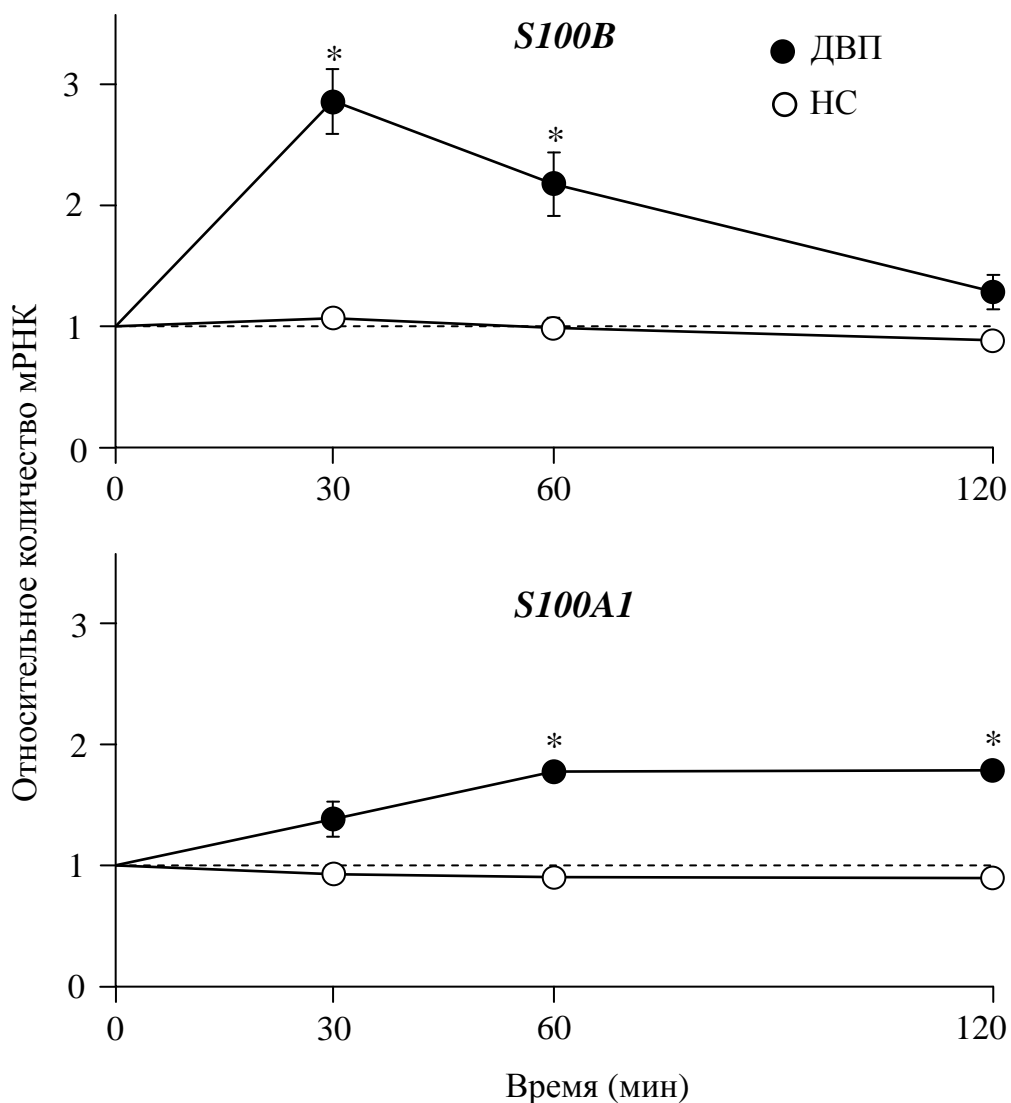


Рис. 9. Динамика относительного содержания мРНК *S100B* и *S100A1* в поле СА1 срезов гиппокампа крыс после тетанизации (ДВП) или низкочастотной стимуляции (НС).

Ордината – относительное количество мРНК в образцах. Уровень мРНК в контрольных (т.е. нестимулированных) образцах принят за 1. Абсцисса – время после начала стимуляции (мин). *S100B* (ДВП) – $n=4$, в остальных случаях $n=3$. * – $p < 0,05$, парный t-критерий. Контроль FDR при $m=6$.

Содержание мРНК *S100A1* (рисунок 9), напротив, медленно нарастало в течение первого часа и оставалось на достигнутом уровне в течение следующего часа после тетанизации (30 мин, $138 \pm 30\%$, $p = 0,15$; 60 мин,

$177 \pm 10\%$, $p = 0,004$; 120 мин, $179 \pm 1\%$, $p = 0,001$; $n = 3$, парный t-критерий Стьюдента).

Низкочастотная стимуляция не изменяла уровень мРНК *S100B* и *S100A1*, по сравнению с интактным контролем (рисунок 9). Соответственно, ANOVA (группа{НС, Тетанизация} \times время{30 мин, 60 мин, 120 мин}) продемонстрировал существенное различие в динамике мРНК после тетанизации и низкочастотной стимуляции, которое выразилось в достоверных эффектах группы для обоих генов {*S100B*: $F(1, 5) = 21$, $p = 0,006$; *S100A1*: $F(1, 4) = 314$, $p = 0,00006$ } и межфакторного взаимодействия для *S100B* – $F(2, 10) = 19$, $p = 0,0004$.

Следовательно, наблюдаемые после индукции ДВП изменения экспрессии *S100B* и *S100A1* не связаны с механическим повреждением срезов электродами или неспецифическими эффектами электростимуляции, а зависят от определенного паттерна нейронной активности, необходимого для запуска процессов нейропластичности.

Таким образом, нам удалось получить модель ассоциированного с нейропластичностью изменения экспрессии генов *S100*, которая согласуется с неоднократно продемонстрированным эффектом увеличения количества белков S100 в мозге при обучении (Hydén and Lange, 1970; Алексидзе и др., 1982; Громов и др., 1991; Шерстнев и др., 2001).

4.3. Динамика уровня мРНК ранних генов *Fos*, *Jun*, *JunB* и *Egr1* после индукции ДВП в поле CA1 гиппокампа крыс

На следующем этапе исследования мы попытались оценить возможный вклад в индукцию экспрессии генов *S100* транскрипционного фактора *Egr1* и комплекса AP-1, роль которых в синаптической пластичности и обучении интенсивно изучается (Анохин, 2003; Alberini, 2009).

В гене *S100A1* крысы идентифицирована (Zimmer et al., 1995) потенциальная AP-1-связывающая последовательность, а в промоторе *S100B*

крысы есть потенциальные сайты связывания *Egr1*: GTGTGGGTG (-2038/-2030) и CACCCACGC (-102/-94), нумерация нуклеотидов – от старта транскрипции, определенного Nagiwaru and Sueoka (1995). Поскольку активность этих факторов в значительной мере определяется уровнем их экспрессии, для оценки возможности участия транскрипционных факторов комплекса AP-1 (*Fos*, *Jun*, *JunB*) и *Egr1* в индукции экспрессии *S100A1* и *S100B* соответственно было проведено сравнительное исследование динамики мРНК указанных ранних генов и *S100B/A1*.

В первой серии экспериментов изучали динамику экспрессии ранних генов в интервале 30-120 мин после индукции ДВП с использованием праймеров, указанных в таблице 1 (раздел 3.6). ANOVA (группа {Тетанизация, Контроль} × время {30 мин, 60 мин, 120 мин}) с повторными измерениями в факторе "время" для всех ранних генов продемонстрировал достоверные эффекты группы {*Fos*: $F(1, 10) = 13,8$, $p = 0,004$; *Jun*: $F(1, 6) = 11,5$, $p = 0,015$; *JunB*: $F(1, 6) = 93$, $p = 0,00007$; *Egr1*: $F(1, 6) = 41$, $p = 0,00068$ } и разные по статистической значимости эффекты времени {*Fos*: $F(2, 20) = 2,1$, $p = 0,14$; *Jun*: $F(2, 12) = 14,4$, $p = 0,00065$; *JunB*: $F(2, 12) = 7$, $p = 0,01$; *Egr1*: $F(2, 12) = 54$, $p = 10^{-6}$ } и межфакторного взаимодействия {*Fos*: $F(2, 20) = 2,1$, $p = 0,14$; *Jun*: $F(2, 12) = 14,4$, $p = 0,00065$; *JunB*: $F(2, 12) = 7$, $p = 0,01$; *Egr1*: $F(2, 12) = 54$, $p = 10^{-6}$ }.

В дополнительных экспериментах изучали экспрессию ранних генов через 30 мин после тетанизации в составе наборов "Synaptic Plasticity RT² Profiler PCR Array" (*Egr1*, *Fos*, *Jun* и *JunB*) и "p53 Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array" (*Egr1* и *Jun*). Полученные для данной временной точки данные достоверно не отличались в разных сериях опытов и были объединены в одну группу (рисунок 10).

Содержание мРНК *Egr1*, *JunB* и *Jun* постепенно нарастало после тетанизации (рисунок 10). Однако увеличение уровня мРНК *Jun* на ранних стадиях было небольшим, тогда как относительное количество мРНК *Egr1* и *JunB* значительно увеличивалась уже через 30 мин после тетанизации.

Содержание мРНК *Fos* было достоверно выше контроля через 30 мин после тетанизации (рисунок 10), затем возвращалось к исходному уровню (через 60 мин после тетанизации), а на 120-й минуте вновь наблюдалась тенденция к увеличению ($p < 0,03$, по сравнению с уровнем мРНК через 60 мин после тетанизации, $n=6$). Хотя увеличение уровня мРНК *Fos* через 120 мин после тетанизации было недостоверным относительно контроля при использовании парного t-критерия Стьюдента ($p=0,07$), оно оказалось достоверным по критерию знаков ($p < 0,05$).

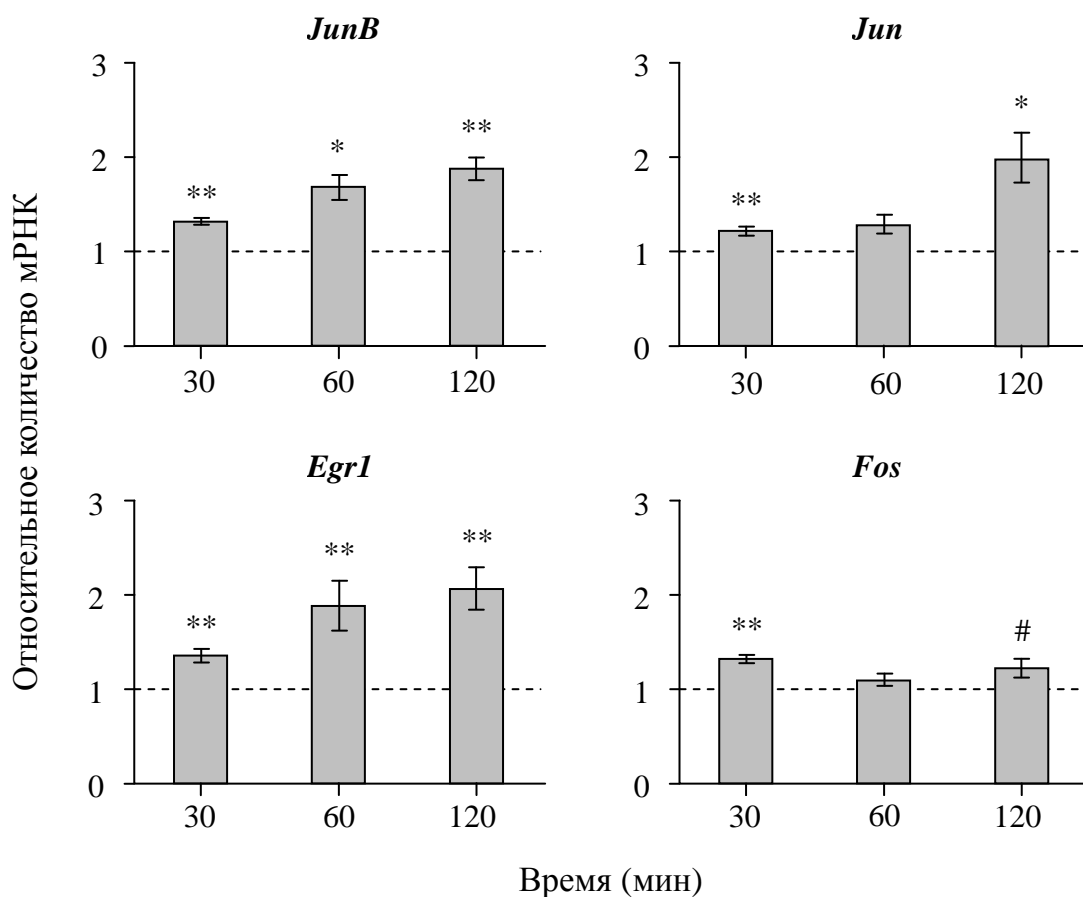


Рис. 10. Динамика экспрессии *Fos*, *Jun*, *JunB* и *Egr1* в поле CA1 срезов гиппокампа крыс после индукции ДВП.

Ордината – относительное количество мРНК в образцах. Уровень мРНК в контрольных (т.е. нестимулированных) образцах принят за 1. Абсцисса – время после начала стимуляции (мин). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ (парный t-критерий Стьюдента), # – $p < 0,05$ (критерий знаков). *JunB* (30 мин) – $n=8$, *Jun* и *Egr1* (30 мин) – $n=12$, *Fos* (30 мин) – $n=10$, *Fos* (60 и 120 мин) – $n=6$, в остальных случаях $n=4$. Контроль FDR для значений p_t при $m=12$.

В динамике экспрессии *S100A1* и *JunB* наблюдалось заметное сходство (рисунок 11). Коэффициент корреляции (r) средних значений относительных уровней мРНК *S100A1* и *JunB* составил 0,98 ($p < 0,0005$). Это позволяет сформулировать рабочую гипотезу о возможном вовлечении варианта комплекса AP-1, содержащего JunB, в регуляцию гена *S100A1* при формировании ДВП. Ограничения для интерпретации полученных результатов, связанные с возможным несоответствием динамики мРНК и белка, обсуждаются в разделе 5.2 (стр. 126).

Что же касается *S100B*, то динамику его экспрессии, очевидно, определяет не *Egr1*, хотя полностью исключить участие *Egr1* в регуляции *S100B*, безусловно, нельзя.

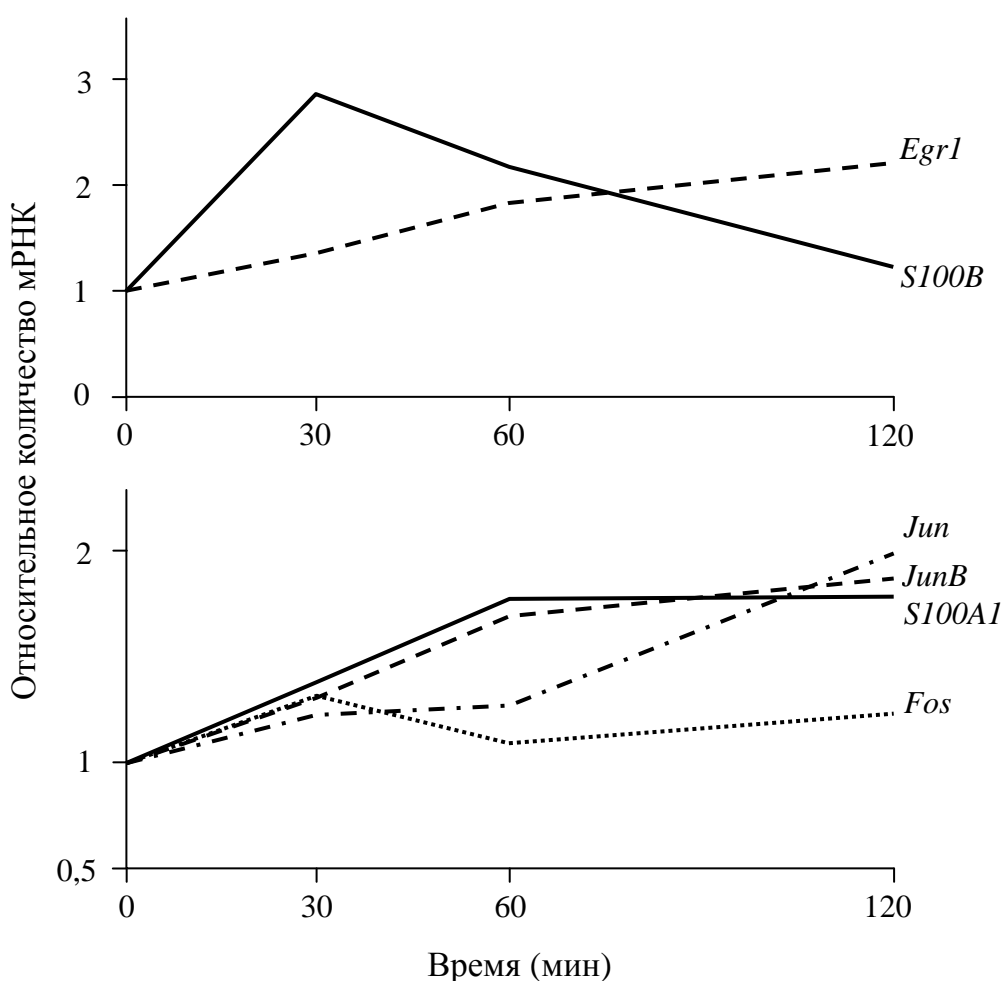


Рис. 11. Сравнение динамики экспрессии ранних генов и генов *S100* после индукции потенциации. Обозначения осей – как на рисунке 10.

4.4. Экспрессия *S100B* во временном интервале 10-360 мин после тетанизации

Дальнейший анализ мы ограничили геном *S100B*, поскольку уровень его экспрессии намного превышает экспрессию других генов семейства *S100* в мозге крыс, включая *S100A1* (Baudier et al., 1985; Kuwano et al., 1987). Прежде всего, чтобы точнее представлять себе временные параметры развития регуляторных процессов, мы более детально исследовали динамику экспрессии *S100B* после индукции потенциации, как на ранней стадии, так и на поздней, поскольку продемонстрированное ранее (Nevroni et al., 1998) снижение уровня мРНК *S100B* в зубчатой извилине крыс через 6 ч после индуцированных каинатом судорог позволяло предположить, что в нашей модели фаза восстановления экспрессии *S100B* в интервале 30-120 мин после тетанизации может перейти в фазу подавления экспрессии на более поздних этапах.

На рисунке 12 объединены результаты первой (рисунок 9) и дополнительных серий экспериментов. Данные по временным точкам 10, 20 и 40 мин после тетанизации были получены на одних и тех же животных, то есть являются зависимыми друг от друга величинами, аналогично данным первой серии экспериментов. То же относится к временным точкам 4 и 6 часов после тетанизации. Общее время переживания срезов в этом случае было разным для групп "4 часа" и "6 часов", поэтому каждой группе тетанизированных срезов соответствовал отдельный контроль. Однако достоверных отличий по относительному уровню мРНК или белка *S100B* между контрольными образцами выявлено не было.

Оказалось, что содержание мРНК *S100B* в поле CA1 заметно увеличивается уже через 10 мин после начала тетанизации коллатералей Шаффера (рисунок 12). Максимальное увеличение содержания мРНК *S100B* наблюдается через 20-30 мин после тетанизации, затем её количество постепенно уменьшается.

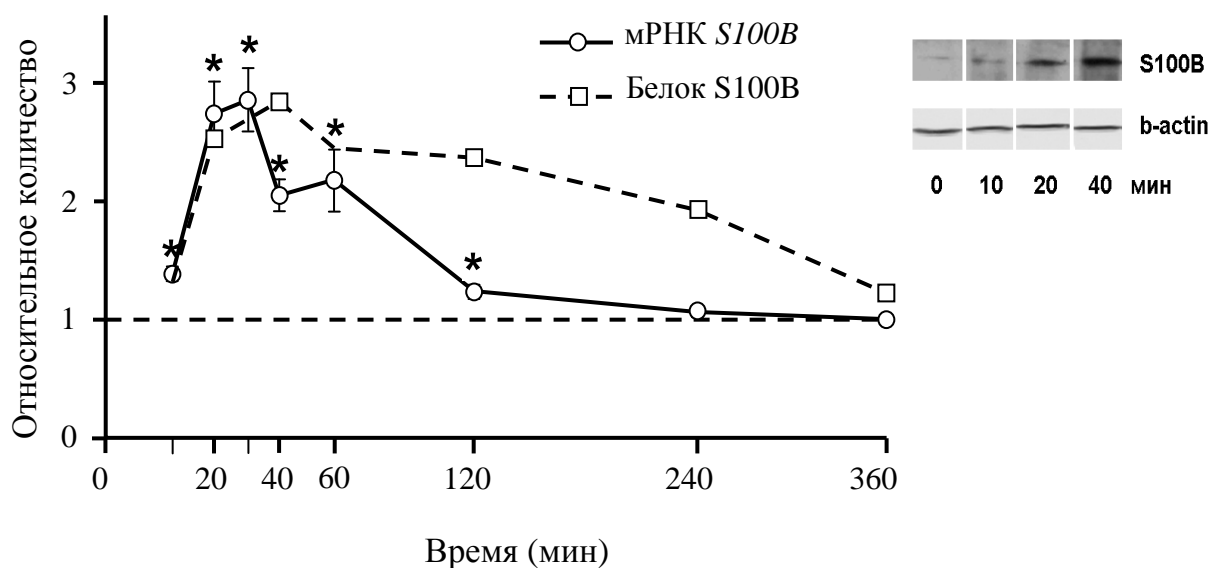


Рис. 12. Изменение содержания мРНК и белка *S100B* в поле СА1 гиппокампа крысы после тетанизации коллатералей Шаффера.

Ордината – количество мРНК или белка *S100B*, нормированное относительно мРНК или белка β -актина, соответственно. Содержание мРНК и белка в контроле (нететанизированные срезы) принято за 1 (горизонтальная пунктирная линия). Абсцисса – время (мин) от начала тетанизации, шкала нелинейная, промежуточные метки делят соответствующие интервалы пополам. Отмечены достоверные отличия уровня мРНК от контроля: * – $p < 0,05$, парный t-критерий Стьюдента. Изменения количества белка достоверны в диапазоне 20-240 мин. Количество независимых экспериментов для белка $n = 3$, для мРНК $n = 3$ для точек 10, 20, 40, 240 и 360 мин, $n = 4$ для 30 и 60 мин, $n = 9$ для 120 мин. Справа – репрезентативные Вестерн-блоты.

Дополнительные эксперименты доказали воспроизводимость сохранения повышенного уровня мРНК *S100B* через 120 мин после тетанизации (на $23 \pm 6\%$ относительно контрольных срезов, $p = 0,006$, $n = 9$, парный *t*-критерий Стьюдента). Через 4-6 часов после тетанизации содержание мРНК *S100B* в образцах не отличалось от контроля.

Для подтверждения функциональности изменений содержания мРНК *S100B* мы оценили количество белка S100B с поле CA1 после тетанизации с помощью Вестерн блот анализа. Содержание белка S100B в срезах значительно увеличивалось через 20 мин после тетанизации и оставалось повышенным до 240-й минуты (рисунок 12). Максимум уровня белка S100B приходился на 40-ую мин после тетанизации, то есть был сдвинут относительно максимума мРНК на 10-20 мин.

Таким образом, ключевые регуляторные события, определяющие динамику экспрессии *S100B* при формировании ДВП, приходятся на первые 40 мин после стимуляции.

4.5. Участие p53 в регуляции гена *S100B* при формировании ДВП

Анализ нуклеотидной последовательности промотора гена *S100B* крысы показал наличие потенциальных p53-респонсивных элементов (p53-PE), обладающих неполным соответствием канонической структуре сайта связывания p53. В таблице 4 указана локализация некоторых p53-PE относительно старта транскрипции *S100B*, определенного Nagiwara and Sueoka (1995), и старта транскрипции NM_013191.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25742>). Мы исследовали ДНК-связывающую активность p53 в CA1 срезов гиппокампа при ДВП с помощью метода хроматиновой иммунопреципитации (ChIP), выбрав в качестве зондов три участка промотора *S100B* (Site1/3), в пределах которых имелись потенциальные p53-PE.

Таблица 4. Потенциальные p53-респонсивные элементы в промоторе гена *S100B* крысы.

| Локализация в изученных сайтах | Последовательности потенциальных p53-PE | Положение относительно старта транскрипции | |
|--------------------------------|---|--|-------------|
| | | (Hagiwara and Sueoka, 1995) | NM_013191.1 |
| | AGAC(A/G)AACCT(n) ₈ GAGCGAGTTC | -1571/-1544 | -1751/-1724 |
| | TAACATTTGT(n) ₂ GGGCTTGTCT | -1100/-1079 | -1280/-1259 |
| Site1 | AAACTTCATT(n) ₇ TAGCATGTCG | -679/-653 | -859/-833 |
| Site1 | GGACGTGTGT(n) ₄ AAGCTATCCT | -568/-545 | -748/-725 |
| Site2 | GGCCATCTCTnAAGCATTTCT | -459/-439 | -639/-619 |
| | CCACCAGCCC(n) ₃ AA(C/T)CTTGCCT | -77/-55 | -257/-235 |
| Site3 | GTGGTTGTCC(n) ₁₁ AACCTTGGCC | 109/139 | -72/-42 |

Подчеркнуты нуклеотиды, не соответствующие канонической формуле RRRCWWGYYY(n)₀₋₁₃RRRCWWGYYY. Альтернативные нуклеотиды (N/N) представляют собой расхождения в последовательности, опубликованной Hagiwara and Sueoka (1995), и в текущей версии гена (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25742>).

Как было показано в предыдущем разделе, уровень мРНК *S100B* увеличивается уже через 10 мин и достигает максимума через 20-30 мин после тетанизации. Оказалось, что именно в этом временном интервале, причем с той же динамикой, значительно увеличивается способность p53 связываться с выбранными нами для анализа сайтами в промоторе гена *S100B* (рисунок 13).

Увеличение ДНК-связанной фракции p53 не было вызвано ростом общего количества белка p53 (рисунок 14, Б, В), что указывает на активацию p53 за счет посттрансляционных модификаций. Общее количество белка p53 даже уменьшалось через 20 мин после тетанизации, хотя содержание мРНК *p53* в срезах не изменялось (рисунок 14), что свидетельствует о снижении скорости трансляции мРНК или ускоренной деградации белка p53 при формировании потенциации.

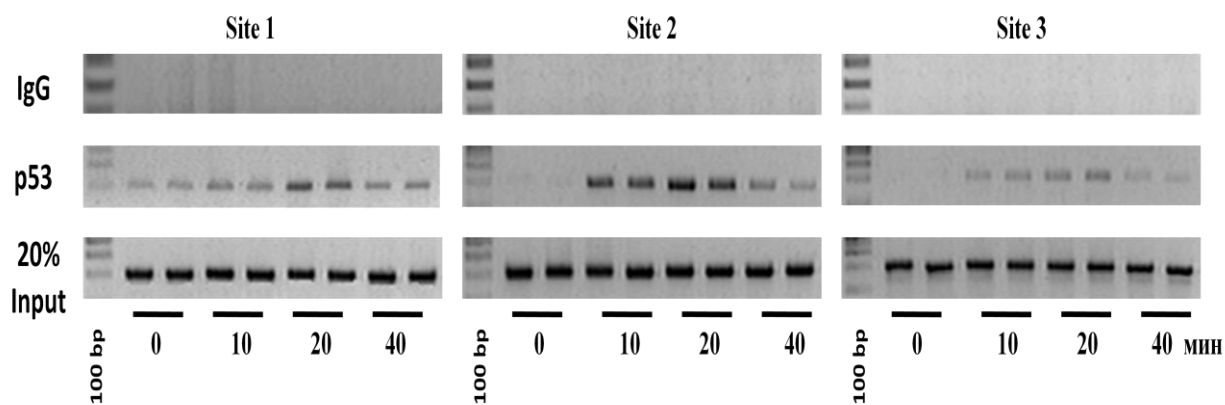


Рис. 13. Связывание p53 с потенциальными респонсивными элементами в промоторе гена *S100B* в поле CA1 гиппокампа крыс через 10, 20 и 40 мин после тетанизации и в контрольных образцах (0 мин).

Иммунопреципитация хроматина с антителами против p53 или нормальным кроличьим IgG. Участки ДНК амплифицировали с помощью ПЦР и разделяли в агарозном геле.

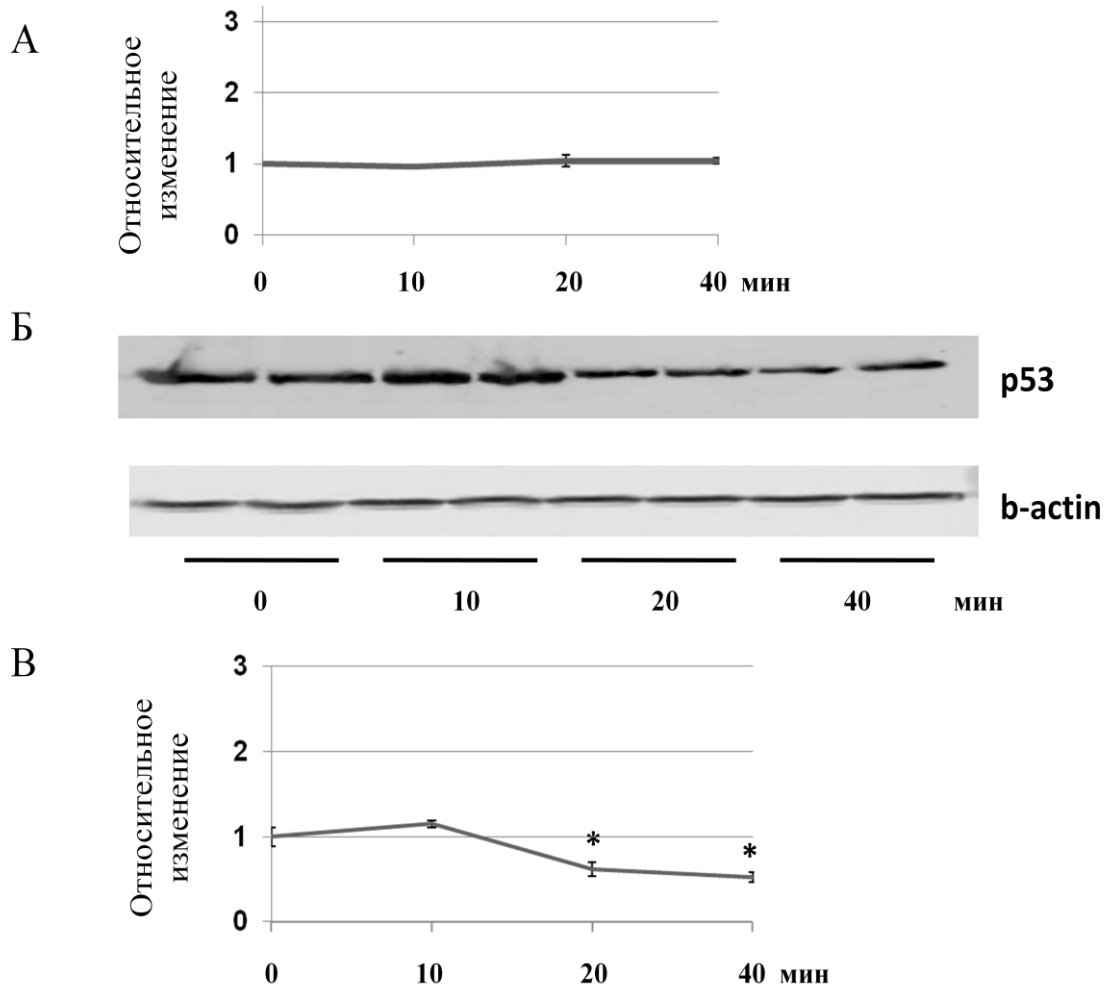


Рис. 14. Влияние тетанизации на экспрессию *p53* в поле СА1 гиппокампа крыс.

Горизонтальная ось – время от начала тетанизации. (А) Относительное содержание мРНК *p53* (контроль принят за 1). Достоверных отличий между группами не выявлено ($n=3$). (Б) Репрезентативные данные Вестерн блот анализа для *p53* и β -актина. (В) Относительный уровень белка *p53* по данным денситометрии, нормализованный относительно β -актина и контрольного уровня (принят за 1).

Таким образом, долговременная потенциация сопровождается временным увеличением активности транскрипционного фактора p53, что, возможно, и является одной из причин усиления синтеза S100B. Для дополнительной проверки функциональности связывания p53 с промотором *S100B* были проведены эксперименты с использованием низкомолекулярных ингибиторов, оказывающих существенное влияние на транскрипционную активность p53. Мы изучили влияние на индуцированную тетанизацией экспрессию *S100B* ингибитора p53 пифитрина-β, а также активаторов p53 нутлина-3 и EX-527, являющихся ингибиторами важнейших негативных регуляторов p53 – убиквитинлигазы Mdm2 и деацетилазы Sirt1, соответственно.

Оба активатора p53 увеличивали базальный уровень мРНК *S100B* (рисунок 15), частично имитируя эффект тетанизации, однако тетанизация в их присутствии приводила к дальнейшему значительному росту количества мРНК *S100B* через 20 (EX-527) или 30 (нутлин-3) минут после тетанизации. Это может свидетельствовать о том, что в индукцию экспрессии *S100B* при потенциации вовлечены, кроме p53, какие-то дополнительные факторы, что подтверждается также неполной блокадой индуцированного тетанизацией увеличения экспрессии *S100B* в присутствии пифитрина-β (рисунок 15).

Отсутствие влияния пифитрина-β на уровень мРНК *S100B* в нететанизированных срезах (рисунок 15) свидетельствует о том, что p53 не вносит вклада в регуляцию базальной экспрессии *S100B*, что, по-видимому, связано с его эффективным ингибированием со стороны Sirt1 и Mdm2 в отсутствие дополнительной активации, происходящей при индукции ДВП.

Наблюдавшееся в присутствии EX-527 увеличение базального уровня мРНК *S100B* ($210 \pm 5\%$ от среднего базального уровня в контрольных экспериментах с 0,1% ДМСО) было гораздо выше эффекта нутлина-3 ($151 \pm 3\%$). При этом эффекты EX-527 и тетанизации были аддитивны (рисунок 15) – двухфакторный ANOVA [ингибитор(ДМСО, EX-527)×стимуляция(Контроль, Тетанизация)] с повторными измерениями в

факторе "стимуляция" не выявил достоверного межфакторного взаимодействия ($F(1, 6) = 1,28, p = 0,3$). Однако в относительных величинах увеличение экспрессии *S100B* после тетанизации в присутствии EX-527 (в 2,2 раза по сравнению с нететанизированными срезами) было все же ниже нормы (в 3,4 раза в соответствующих контрольных экспериментах).

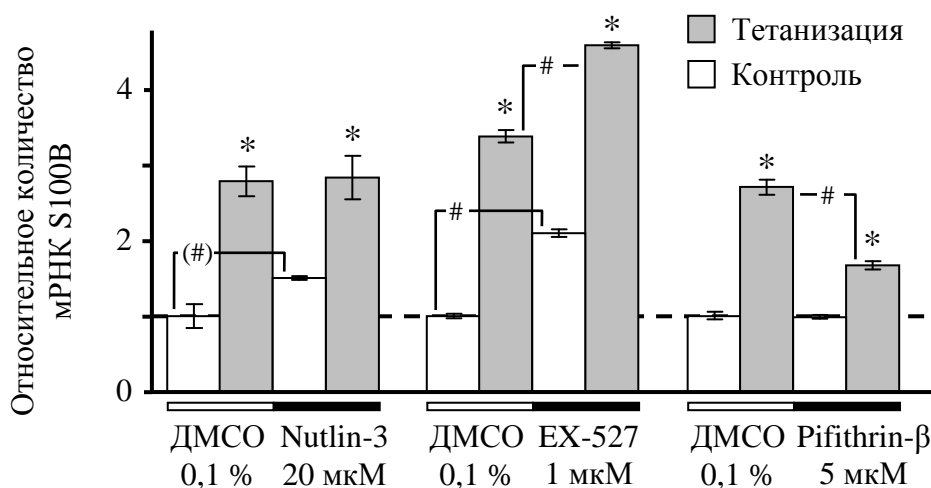


Рис. 15. Влияние регуляторов активности p53 на экспрессию *S100B* в поле CA1 гиппокампа крысы.

Темные столбцы – тетанизированные срезы, светлые столбцы – контроль. Содержание мРНК *S100B* в каждом образце нормировали относительно уровня мРНК β-актина, затем относительно среднего уровня мРНК *S100B* в нететанизированных срезах, инкубированных в растворителе. Для контроля FDR соответствующие сравнения, представленные на рис. 15 и 18, были сведены в одну группу. * – $p < 0,05$, относительно соответствующего контроля, парный t-критерий, контроль FDR для экспериментов с растворителем при $m=11$, для экспериментов с экзогенными лигандами $m=12$; # – $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента, $m=12$. Индикатор уровня значимости, не выдержавшего коррекции на множественные сравнения, заключен в скобки.

Представляется весьма вероятным, что действие Sirt1 на экспрессию *S100B* включает в себя существенный p53-независимый компонент. Влияние Sirt1 на экспрессию *S100B* могло быть опосредовано не только p53, но также фактором, обеспечивающим базальный уровень транскрипции, и/или гипотетическим альтернативным "фактором тетанизации". Кроме того, Sirt1 контролирует процессы транскрипции через регуляцию ацетилирования гистонов и, опосредованно, метилирования промоторов (Gonfloni et al., 2014).

В присутствии нутлина-3, в отличие от EX-527, наблюдалась некоторая тенденция к окклюзии эффекта тетанизации. Однако из-за более высокой дисперсии в этих экспериментах двухфакторный ANOVA [ингибитор(ДМСО, nutlin-3)×стимуляция(Контроль, Тетанизация)] с повторными измерениями в факторе "стимуляция" также не выявил достоверного межфакторного взаимодействия ($F(1, 6) = 2,5$, $p = 0,16$), то есть и в этом случае нельзя исключить аддитивность влияния нутлина-3 и тетанизации на экспрессию *S100B*.

Таким образом, в целом результаты экспериментов с пифитрином-β, EX-527 и нутлином-3 подтверждают, что экспрессия гена *S100B* крысы, как и у человека (Lin et al., 2004), позитивно регулируется транскрипционным фактором p53. При этом в состоянии покоя p53 неактивен и не участвует в поддержании базального уровня транскрипции *S100B*. Индукция ДВП сопровождается временным связыванием p53 с промотором *S100B*, что вносит существенный вклад в увеличение экспрессии *S100B*, по крайней мере, в ранней стадии потенциации (20-30 мин после тетанизации).

4.6. Регуляция экспрессии p53 при формировании ДВП

Уменьшение количества белка p53 через 20 мин после тетанизации свидетельствует о росте активности его негативных регуляторов при индукции ДВП. Как отмечалось выше, к важнейшим регуляторам p53 относятся убиквитинлигаза Mdm2 и деацетилазы, в частности, Sirt1. Mdm2

негативно модулирует транскрипционную активность, стабильность белка и трансляцию мРНК *p53* (Nag et al., 2013). Деацетилирование лизиновых остатков молекулы *p53* снижает его активность и делает лизиновые остатки доступными для убиквитинилирования, что приводит к экспорту *p53* из ядра и последующей его деградации в протеасомах (Kuribayashi and El-Deiry, 2008). Чтобы оценить вклад Mdm2 и Sirt1 в регуляцию *p53* при формировании ДВП, мы исследовали влияние их ингибиторов на индуцированное тетанизацией снижение уровня белка *p53*.

Добавление в экспериментальную камеру растворителя (0,1% ДМСО) не влияло на динамику экспрессии *p53* при развитии ДВП. Через 30 мин после тетанизации содержание белка *p53* в образцах снижалось до 70 ± 5 % относительно контроля ($p=0,005$, парный t-критерий, $n=4$), а количество мРНК *p53* оставалось неизменным (рисунок 16, А-В), что согласуется с данными, полученными с использованием нормального физиологического раствора (рисунок 14).

Инкубация с нутлином-3 в течение 60 мин приводила к значительному увеличению базального уровня (т.е. в нететанизированных срезах) белка *p53* в поле SA1 (рисунок 16, Б, В). Наблюдалась также тенденция к увеличению базального уровня мРНК *p53* (на 17 ± 2 % относительно среднего уровня контроля в растворе без нутлина, $p=0,06$, t-критерий, $n_1=n_2=4$).

Ингибирование Mdm2 полностью блокировало уменьшение количества белка *p53* через 30 мин после тетанизации. Содержание мРНК *p53* в этих условиях немного увеличивалось после тетанизации (на 7 ± 1 %, $p=0,0001$, парный t-критерий, по сравнению с соответствующим контролем, $n=4$) и достигало уровня 126 ± 2 % относительно срезов, тетанизированных в физиологическом растворе с 0,1% ДМСО ($p=0,022$, t-критерий, $n_1=n_2=4$).

Ингибирование Sirt1 в течение 50 мин не изменяло базальный уровень белка *p53*, но, аналогично нутлину-3, полностью блокировало уменьшение количества белка *p53* через 20 мин после тетанизации (рисунок 16, Д, Е). На уровень мРНК *p53* EX-527 не оказывал влияния (рисунок 16, Г).

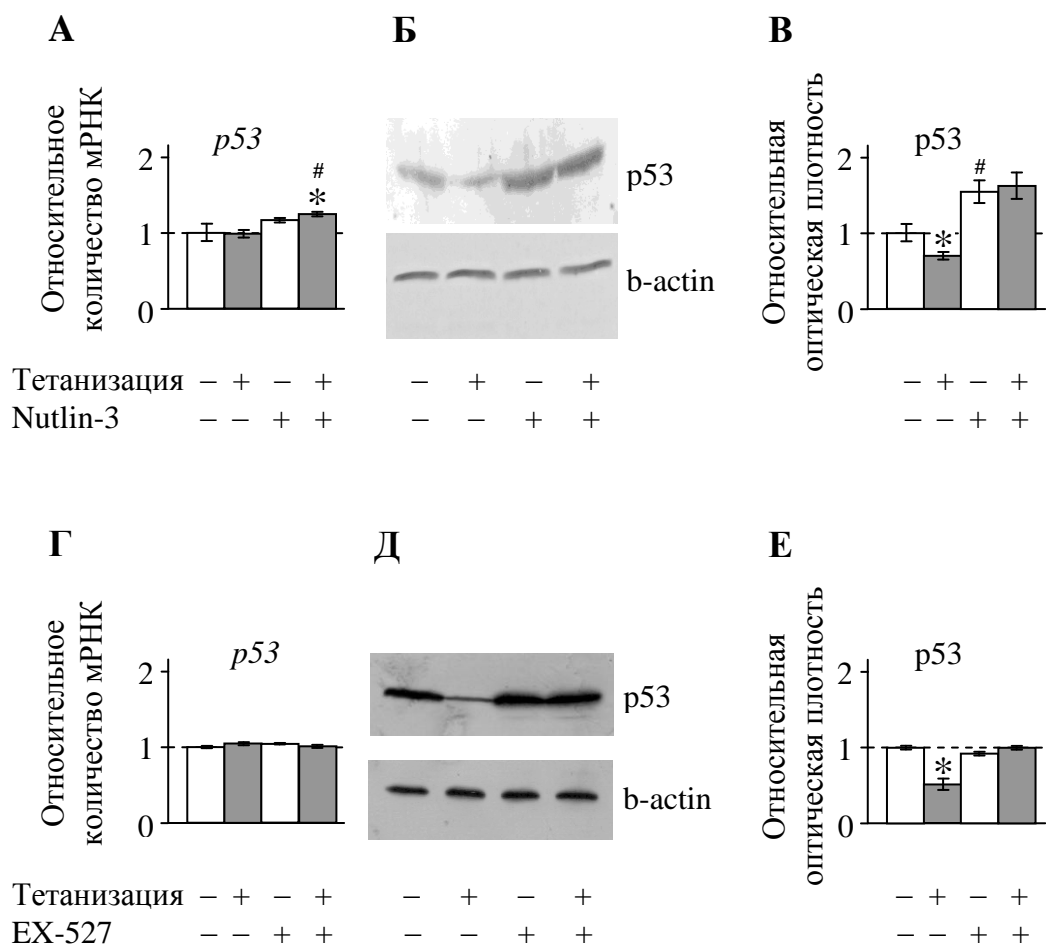


Рис. 16. Влияние тетанизации, нутлина-3 и EX-527 на экспрессию *p53* в поле СА1 гиппокампа крысы.

А, Г – относительное количество мРНК. Б, Д – репрезентативные Вестерн блоты. В, Е – данные денситометрического анализа Вестерн блотов. * – $p < 0,05$, относительно соответствующего контроля (нететанизированные срезы), парный t-критерий Стьюдента; # – $p < 0,05$, относительно соответствующих групп "Тетанизация(-)/Ингибитор(-)", t-критерий Стьюдента; $n=4$ для всех групп.

Таким образом, тандем Sirt1/Mdm2 играет ключевую роль в уменьшении количества белка *p53* при индукции долговременной потенциации в поле СА1 гиппокампа. Принимая во внимание значительное влияние ацетилирования *p53* на его активность, а также преимущественно

ядерную локализацию Sirt1, с высокой степенью вероятности можно предположить, что Sirt1 вносит также существенный вклад в быструю инактивацию p53 при формировании ДВП.

4.7. Вклад глутаматных рецепторов NMDA-типа и протеинкиназ в регуляцию *S100B* при формировании ДВП

Чтобы более детально выяснить механизмы регуляции *S100B*, мы изучили влияние ингибиторов различных элементов внутриклеточных регуляторных каскадов на индуцированную тетанизацией экспрессию *S100B*. На рисунке 6 (раздел 3.4) представлена гипотетическая схема регуляции экспрессии *S100B* при развитии потенциации, на основании которой выбирались препараты для исследования, которые также показаны на рисунке.

Из-за большой продолжительности исследования тестирование разных веществ проводилось на разных партиях животных и сопровождалось отдельными контрольными экспериментами. Базальный уровень мРНК *S100B*, а иногда и величина его изменения после тетанизации достоверно отличались в разных контрольных группах, поэтому они не были объединены.

Наиболее вероятные причины зависимости экспрессии *S100B* от частоты стимуляции коллатералей Шаффера – 1) более интенсивное вытекание глутамата из синаптической щели при тетанизации и, соответственно, активация большего числа глутаматных рецепторов (например, метаботропных) на астроцитах и 2) участие в процессе рецепторов NMDA-типа, для активации которых важна суммация возбуждающих постсинаптических потенциалов. Для оценки роли NMDAR в индукции экспрессии *S100B* мы использовали неконкурентный ингибитор NMDAR МК-801. В отличие от ингибиторов, конкурирующих с глутаматом за места связывания, МК-801 способен полностью заблокировать NMDAR,

однако он взаимодействует только с активным рецептором, т.е. предварительная преинкубация не гарантирует полной блокады поступления кальция в клетки через каналы рецепторов на начальном этапе тетанизации. Для оценки эффективности блокады NMDAR в наших условиях были проведены электрофизиологические эксперименты.

МК-801 (10 мкМ) существенно подавлял формирование посттетанической потенциации в поле СА1 гиппокампа крысы (рисунок 17). Тетанизация коллатералей Шаффера в присутствии МК-801 приводила к увеличению амплитуды ответов на тестирующие стимулы через 60 мин после тетанизации только на $52 \pm 7\%$, в отличие от прироста на $160 \pm 18\%$ при тетанизации в нормальных условиях. Этот результат согласуется с данными Grover and Yan (1999), которые показали частичное подавление ДВП в поле СА1 гиппокампа крыс в условиях блокады NMDAR как конкурентным антагонистом AP5, так и комбинацией AP5 и МК-801.

Эксперименты с МК-801 показали, что активация NMDAR в ходе тетанизации имеет существенное значение для индукции экспрессии *S100B* (рисунок 18), что подтверждается значимыми эффектами фактора "ингибитор" ($F(1, 7) = 9,1, p = 0,02$) и межфакторного взаимодействия ($F(1, 7) = 57, p = 0,00013$) в ANOVA [ингибитор(нормальный физиологический раствор, МК-801)×стимуляция(контроль, тетанизация)] с повторными измерениями в факторе "стимуляция". Тетанизация в присутствии МК-801 приводила к достоверному увеличению содержания мРНК *S100B* в образцах через 30 мин после тетанизации (на $32 \pm 3\%$, $n=4, p<0,002$, парный t-критерий, по сравнению с базальным уровнем), однако это увеличение было значительно менее выражено, чем в нормальных условиях (на $126 \pm 12\%$, $n=5, p<0,002$, t-критерий, по сравнению с тетанизацией в присутствии МК-801).

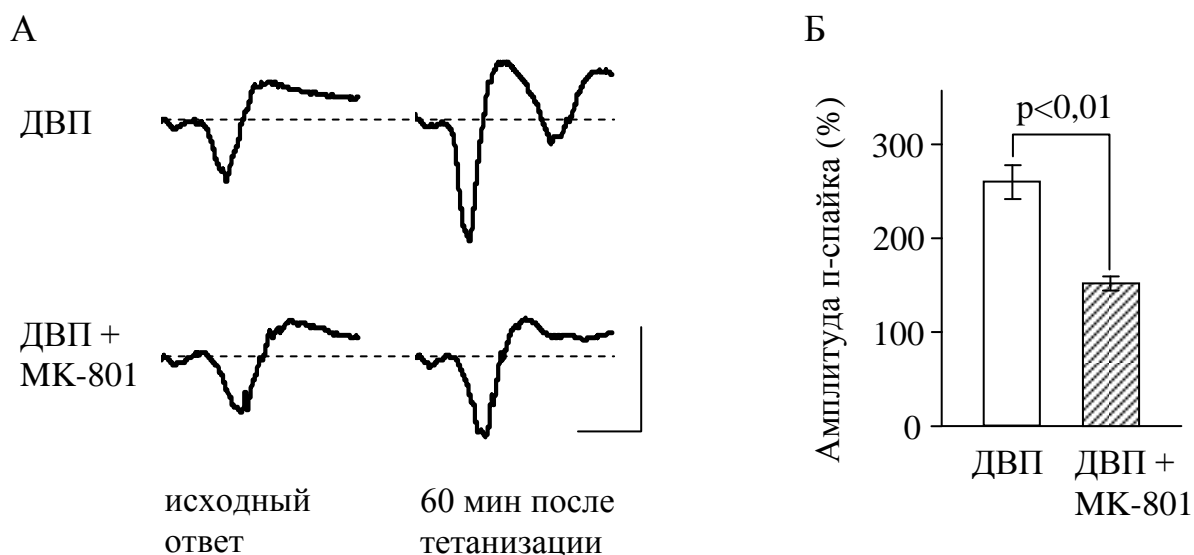


Рис. 17. Блокада рецепторов NMDA-типа снижает выраженность долговременной посттетанической потенциации в поле CA1 гиппокампа крысы.

А – репрезентативные примеры ответов, регистрируемых в пирамидном слое CA1 при стимуляции коллатералей Шаффера, непосредственно перед и через 60 мин после тетанизации в нормальном физиологическом растворе и в присутствии 10 мкМ МК-801. Калибровка – 2 мВ, 3 мс. Б – величина ответов (в процентах от исходной) через 60 мин после тетанизации в норме (ДВП, $n = 5$) и на фоне блокады рецепторов NMDA-типа (ДВП + МК-801, $n = 3$).

Ингибитор кальмодулинкиназа KN-93 полностью блокировал увеличение экспрессии *S100B* через 20 мин после ДВП (рисунок 18), что отразилось в высокозначимых эффектах фактора "ингибитор" ($F(1, 4)=48$, $p=0,0022$) и межфакторного взаимодействия ($F(1, 4)=57$, $p=0,0016$) в ANOVA [ингибитор(ДМСО, KN-93)×стимуляция(контроль, тетанизация)] с повторными измерениями в факторе "стимуляция". При этом KN-92 (неактивный аналог KN-93) не оказывал влияния на уровень мРНК *S100B*, ANOVA [ингибитор(ДМСО, KN-92)×стимуляция(контроль, тетанизация)] с повторными измерениями в факторе "стимуляция" показал отсутствие достоверных эффектов фактора "ингибитор" ($F(1, 4)=0,2$, $p=0,68$) и межфакторного взаимодействия ($F(1, 4)=0,1$, $p=0,76$).

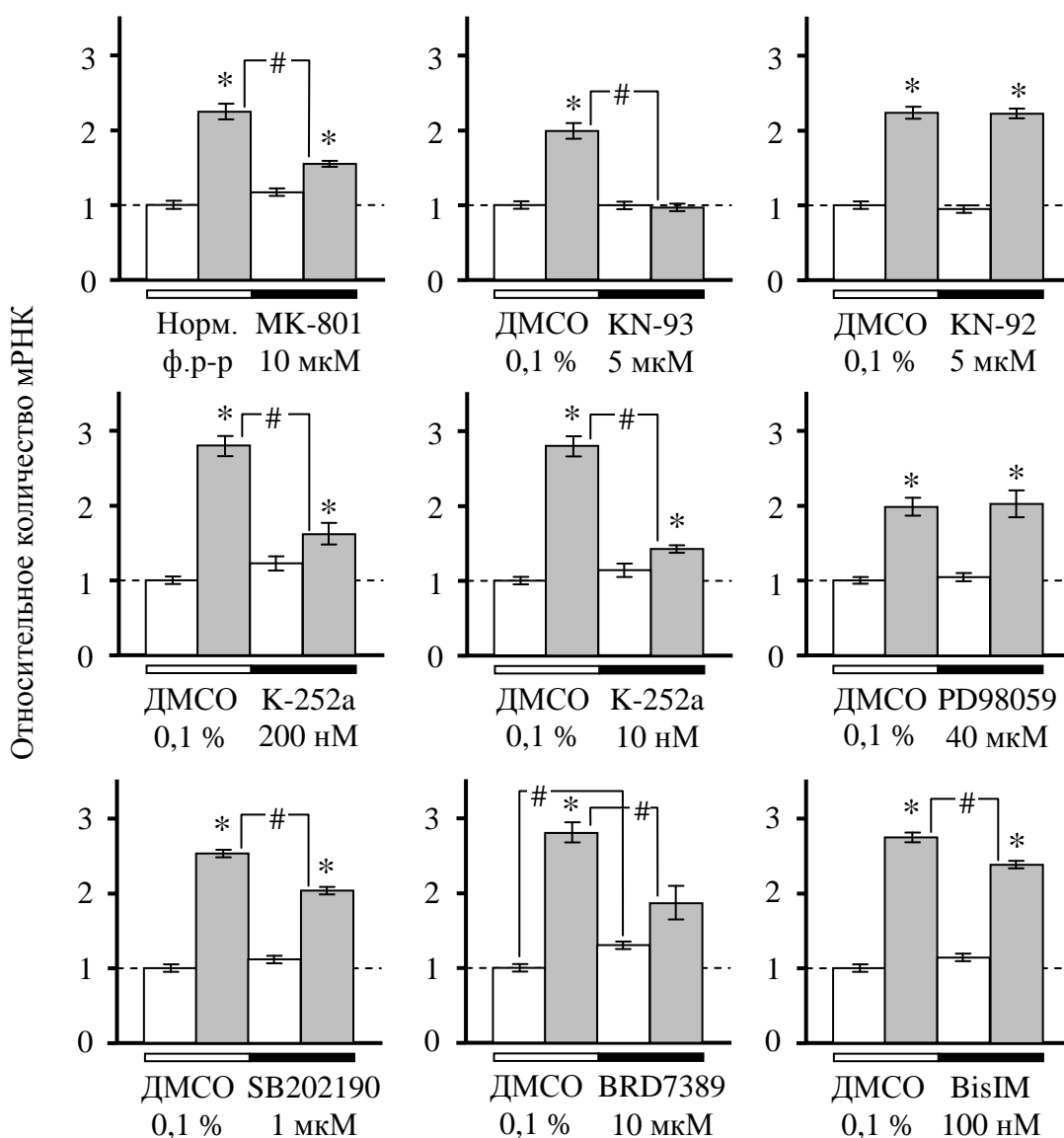


Рис. 18. Влияние ингибиторов NMDAR и протеинкиназ на базальную и индуцированную тетанизацией коллатералей Шаффера экспрессию *S100B*.

Темные столбцы – тетанизированные срезы, светлые столбцы – контроль. Содержание мРНК *S100B* в каждом образце нормировали относительно уровня мРНК β -актина, затем относительно среднего уровня мРНК *S100B* в нететанизированных срезах, инкубированных в растворителе. Референсная группа (эксперименты с растворителем) для 10 и 200 нМ К-252а – общая. * – $p < 0,05$, относительно соответствующего контроля, парный t-критерий; # – $p < 0,05$, t-критерий. Для контроля FDR соответствующие сравнения, представленные на рис. 15 и 18, были сведены в одну группу.

Хотя различия влияния KN-93 и KN-92 на экспрессию *S100B* достаточно очевидны, мы использовали ANOVA для их формальной оценки. Эксперименты с KN-93 и KN-92 проводились на разных партиях животных, и контрольные группы отличались не только по базальному уровню мРНК *S100B* ($p=0,0006$, t-критерий), но и по эффекту тетанизации, хотя в последнем случае и недостоверно (после нормировки относительно базального уровня $p=0,18$, t-критерий).

Различия в базальном уровне нивелировались нормировкой данных внутри каждой партии относительно среднего базального уровня в контрольных экспериментах, полученные таким образом величины представлены на рисунке 18. Для нивелирования различий между партиями животных в эффектах тетанизации данные дополнительно нормировали в соответствии с формулой:

$$K_n = 1 + (K_{исх} - 1)/(K_t - 1), \quad (1)$$

где K_n и $K_{исх}$ – соответственно нормированное и исходное количество мРНК; K_t – среднее количество мРНК *S100B* в тетанизированных срезах в контрольных экспериментах.

После проведенного преобразования ANOVA [ингибитор(KN-93, KN-92)×стимуляция(контроль, тетанизация)] с повторными измерениями в факторе "стимуляция" продемонстрировал достоверные эффекты фактора "ингибитор" ($F(1, 4) = 272$, $p = 0,00008$) и межфакторного взаимодействия ($F(1, 4) = 84$, $p = 0,00078$), что подтверждает очевидное различие в эффектах KN-93 и KN-92.

KN-93 и KN-92 подавляют активность потенциалзависимых кальциевых каналов L- и N-типа (Gao et al., 2006). Поскольку ингибитор рецепторов NMDA-типа МК-801 блокирует увеличение уровня мРНК *S100B* при ДВП не полностью, можно было бы предположить, что эти каналы, экспрессирующиеся и в нейронах, и в астроцитах (Pappura et al., 2011), также

вовлечены в регуляцию синтеза *S100B*. Однако отсутствие влияния KN-92 на индукцию экспрессии *S100B* (рисунок 18) свидетельствует о том, что роль потенциалзависимых кальциевых каналов в этом процессе незначительна.

K-252a обладает широким спектром активности. Из известных мишеней, наиболее эффективно он ингибирует CaMKII и тирозинкиназные рецепторы нейротрофинов (Trk). В частности, в концентрации 200 нМ K-252a блокирует влияние BDNF на синаптическую передачу (Madara and Levine, 2008) и BDNF-зависимую транскрипцию раннего гена *Arc* (Zheng et al., 2009). Однако в том же диапазоне концентраций (100-500 нМ) K-252a может имитировать или усиливать действие нейротрофинов, что связывают с его способностью активировать нерцепторную тирозинкиназу FAK (Maroney et al., 1995), которая взаимодействует со многими сигнальными путями, в частности, активирует фосфатидилинозитол-3-киназу, а также напрямую ингибирует p53 (Golubovskaya, 2014).

Чтобы разделить эффекты влияния K-252a на разные мишени, мы сравнили действие препарата в двух концентрациях: 200 нМ (наиболее часто используемая) и 10 нМ, при которой слабо выражены активация FAK (Maroney et al., 1995) и ингибирование протеинкиназ A и C (Kase et al., 1987), однако сохраняется существенное, более чем вдвое, подавление активности Trk (Berg et al., 1992) и CaMKII (Hashimoto et al., 1991).

K-252a в обеих использованных концентрациях не оказывал достоверного влияния на базальный уровень мРНК *S100B*, но существенно подавлял увеличение экспрессии *S100B*, индуцированное тетанизацией, хотя количество мРНК *S100B* все же было достоверно повышенным через 20 мин после тетанизации по сравнению с нестимулированными срезами (рисунок 18). ANOVA [ингибитор(ДМСО, K-252a 200 нМ)×стимуляция(контроль, тетанизация)] с повторными измерениями в факторе "стимуляция" продемонстрировал достоверные эффекты фактора "ингибитор" ($F(1, 6) = 13$, $p = 0,011$) и межфакторного взаимодействия ($F(1, 6) = 81$, $p = 0,00011$). Аналогично, ANOVA [ингибитор(ДМСО, K-252a 10

нМ)×стимуляция(контроль, тетанизация)] с повторными измерениями в факторе "стимуляция" показал высокосignимые эффекты фактора "ингибитор" ($F(1, 6) = 38, p = 0,0008$) и межфакторного взаимодействия ($F(1, 6) = 147, p = 0,00002$).

Действие препарата не зависело от концентрации. ANOVA [ингибитор(К-252а 200 нМ, К-252а 10 нМ)×стимуляция(контроль, тетанизация)] с повторными измерениями в факторе "стимуляция" не выявил достоверных эффектов фактора "ингибитор" ($F(1, 6) = 1,16, p = 0,32$) или межфакторного взаимодействия ($F(1, 6) = 0,6, p = 0,47$). Данная серия экспериментов была проведена на одной партии животных и имела одну контрольную группу, поэтому для сравнения эффектов разных концентраций препарата дополнительной нормировки не требовалось.

Таким образом, влияние К-252а было связано преимущественно с ингибированием кальмодулин-зависимых киназ и/или Trk, а протеинкиназы А, С и FAK не влияли существенно на экспрессию *S100B* в этих условиях. Принимая во внимание полную блокаду увеличения экспрессии *S100B* в присутствии KN-93, можно предположить, что в использованных концентрациях К-252а не был достаточно эффективен в отношении некоторых CaMK, регулирующих экспрессию *S100B* при формировании ДВП.

Ингибирование MAPK киназы MEK1 (PD 98059, 40 мкМ) не влияло на уровень мРНК *S100B* (рисунок 18). Ингибирование кальцийзависимых изоформ протеинкиназ С и RSK (bisindolylmaleimide I), MAP киназ p38 α/β (SB202190) или RSK (BRD7389) приводило к умеренному, но достоверному снижению экспрессии *S100B*, индуцированной тетанизацией, по сравнению с контрольными экспериментами (рисунок 18). Соответствующие ANOVA [ингибитор(ДМСО, X)×стимуляция(контроль, тетанизация)] с повторными измерениями в факторе "стимуляция" (X – bisindolylmaleimide I, SB202190 или BRD7389) показали значимые эффекты межфакторного взаимодействия

для всех перечисленных ингибиторов – $F(1, 4)=35$, $p=0,004$; $F(1, 4)=202$, $p=0,00014$ и $F(1, 5)=35$, $p=0,002$ соответственно).

Протеинкиназы С регулируют активность многих сигнальных каскадов (Gonzalez-Guerrico et al., 2005). Например, протеинкиназа $C\alpha$ может инактивировать протеинкиназу Akt, индуцируя ее дефосфорилирование, опосредованное, как полагают Gonzalez-Guerrico et al. (2005), протеинфосфатазой 2A (рисунок 6). Однако данные экспериментов с bisindolylmaleimide I (рисунок 18) не дают достаточных оснований предполагать, что протеинкиназы С существенно влияют на экспрессию *S100B* при ДВП. Производные бисиндолилмалеимида с близкой эффективностью ингибируют как протеинкиназу $C\alpha$, так и RSK2 (Bain et al., 2007). С учетом известной роли RSK2 в регуляции транскрипции при формировании ДВП (Miyamoto, 2006) и регуляции активности p53 (Cho et al., 2005), а также результатов экспериментов с BRD7389 (рисунок 18), представляется более вероятным, что влияние bisindolylmaleimide I на экспрессию *S100B* было связано именно с ингибированием RSK2.

Ни один из препаратов не снижал базальный уровень мРНК *S100B* (т.е. в нететанизированных срезах). Напротив, в присутствии K-252a, bisindolylmaleimide I, SB 202190, BRD7389 наблюдалась тенденция к его увеличению, несмотря на то, что все эти ингибиторы частично подавляли увеличение уровня мРНК *S100B* после тетанизации. Вероятно, этот эффект был связан с недостаточной селективностью препаратов. Например, увеличение базальной экспрессии *S100B* в присутствии BRD7389 могло быть связано с активацией кальмодулинкиназ CaMKIV, CHEK1, DAPK1 (Fomina-Yadlin et al., 2010).

4.8. Экспрессия генов-мишеней p53 в ранней фазе долговременной потенциации

Для оценки влияния p53 на динамику транскриптома при формировании ДВП был использован набор праймеров "p53 Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array" (PARN-027Z; "Qiagen"), позволяющий измерять уровень мРНК 84-х генов, функционально связанных с p53, в том числе 50-ти генов, прямо (благодаря связыванию с промотором или белок-белковому взаимодействию с непосредственными активаторами транскрипции) или опосредованно (через влияние на экспрессию других транскрипционных факторов) регулируемых фактором p53.

Тетанизация изменяла уровень мРНК большого числа исследованных генов (таблица 5). При этом не наблюдалось достоверной связи между характером изменения экспрессии генов и знаком их регуляции со стороны p53. Соотношение числа генов (с учетом поправки на множественные сравнения), экспрессия которых увеличилась, не изменилась или уменьшилась, не отличалось значимо между группами генов, активируемых фактором p53 (16:13:2), и генов, репрессируемых p53 (9:9:2). Таким образом, регуляция генов-мишеней p53 при формировании ДВП имеет сложный характер, и вклад p53, по-видимому, во многих случаях не является решающим.

Чтобы оценить вклад p53 в индуцированную тетанизацией экспрессию генов, мы сравнили влияние тетанизации на динамику мРНК в норме и на фоне активации p53-зависимой транскрипции нутлином-3 (Vassilev et al., 2004). В идеальной ситуации, в присутствии нутлина-3 экспрессия p53-зависимого гена должна изменяться в контрольных срезах в направлении, предсказываемом знаком регуляции со стороны p53 (если он известен).

Таблица 5. Влияние тетанизации и нутлина-3 на экспрессию генов набора "p53 Signaling Pathway" и *S100B* в поле СА1 гиппокампа крысы.

| Ген | Гены-мишени p53 | | Растворитель | | Нутлин-3 | | | | rmANOVA (нутлин-3(2)×тетанизация(2)) | | | |
|--------------|-----------------|----------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | | | Влияние тетанизации | | Изменение базальной экспрессии | | Влияние тетанизации | | Эффект нутлина-3 | | Эффект взаимодействия | |
| | TP | Ссылки | Тр/Кр | p _t | Кн/Кр | p _t | Тн/Кн | p _t | F(1,6) | p | F(1,6) | p |
| <i>Apafl</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,25 | 7·10 ⁻⁴ | 1,25 | 0,005 | 1,25 | 0,020 | 29 | 0,002 | 0,9 | нд |
| <i>Apex1</i> | | | 1,11 | 0,013 | 1,29 | 1·10 ⁻⁴ | 0,98 | нд | 43 | 6·10 ⁻⁴ | 32 | 0,001 |
| <i>Atm</i> | | | 1,27 | 0,004 | 1,37 | 0,002 | 1,08 | 0,004 | 22 | 0,003 | 19 | 0,005 |
| <i>Bag1</i> | | | 1,13 | 0,022 | 1,30 | 0,005 | 1,01 | нд | 38 | 9·10 ⁻⁴ | 10 | (0,019) |
| <i>Bax</i> | + | Miyashita et al., 2008 | 1,41 | 0,021 | 1,38 | 0,002 | 1,08 | нд | 12 | 0,013 | 6,8 | (0,041) |
| <i>Bbc3</i> | + | Riley et al., 2008 | 0,93 | 0,028 | 1,33 | 0,003 | 0,87 | (0,047) | 20 | 0,004 | 3,3 | нд |
| <i>Bcl2</i> | - | Budhram-Mahadeo, 1999 | 0,71 | 1·10 ⁻⁴ | 0,92 | 0,018 | 0,94 | нд | 1,1 | нд | 91 | 8·10 ⁻⁵ |
| <i>Bid</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,26 | 0,003 | 1,23 | 0,033 | 1,19 | 0,001 | 8,1 | 0,029 | 0,8 | нд |
| <i>Birc5</i> | - | Riley et al., 2008 | 1,22 | нд | 1,35 | 0,016 | 1,08 | нд | 19 | 0,005 | 0,3 | нд |
| <i>Bnip3</i> | | | 1,13 | 9·10 ⁻⁴ | 1,27 | 2·10 ⁻⁴ | 1,08 | 0,017 | 56 | 3·10 ⁻⁴ | 1,7 | нд |
| <i>Brca1</i> | (-) | Löhr et al., 2003 | 1,38 | 0,020 | 1,58 | 1·10 ⁻⁴ | 1,51 | нд | 24 | 0,003 | 1,2 | нд |
| <i>Brca2</i> | | | 1,20 | 0,027 | 1,10 | 0,003 | 1,51 | 0,010 | 19 | 0,005 | 11 | 0,015 |
| <i>Btg2</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,47 | 0,006 | 1,41 | 0,006 | 1,11 | 4·10 ⁻⁴ | 17 | 0,006 | 21 | 0,004 |
| <i>Casp2</i> | (-) | Baptiste-Okoh et al., 2008 | 1,30 | 0,006 | 1,34 | 0,011 | 1,12 | 1·10 ⁻⁴ | 15 | 0,008 | 10 | (0,019) |

Таблица 5. (Продолжение).

| Ген | Гены-мишени p53 | | Растворитель | | Нутлин-3 | | | | mANOVA (нутлин-3(2)×тетанизация(2)) | | | |
|---------------|-----------------|-------------------------|---------------------|----------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | | | Влияние тетанизации | | Изменение базальной экспрессии | | Влияние тетанизации | | Эффект нутлина-3 | | Эффект взаимодействия | |
| | TP | Ссылки | Tr/Kp | p _t | Kn/Kp | p _t | Tn/Kn | p _t | F(1,6) | p | F(1,6) | p |
| <i>Casp9</i> | | | 1,14 | 0,019 | 1,28 | 4·10 ⁻⁴ | 1,02 | нд | 58 | 3·10 ⁻⁴ | 9,6 | (0,021) |
| <i>Ccnb1</i> | – | Innocente and Lee, 2005 | 1,03 | нд | 1,12 | 0,020 | 1,18 | 0,001 | 27 | 0,002 | 37 | 9·10 ⁻⁴ |
| <i>Ccne1</i> | | | 1,26 | 0,030 | 1,31 | 2·10 ⁻⁵ | 1,10 | нд | 27 | 0,002 | 2,3 | нд |
| <i>Ccng1</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,31 | 0,003 | 1,35 | 3·10 ⁻⁵ | 1,16 | 3·10 ⁻⁵ | 47 | 5·10 ⁻⁴ | 7,1 | (0,038) |
| <i>Ccnh</i> | | | 1,18 | 0,014 | 1,25 | 0,009 | 1,11 | 0,006 | 13 | 0,011 | 1,3 | нд |
| <i>Cdc25a</i> | (–) | Rother et al., 2007 | 1,09 | нд | 1,06 | нд | 1,31 | 0,001 | 63 | 2·10 ⁻⁴ | 29 | 0,002 |
| <i>Cdc25c</i> | – | Riley et al., 2008 | 1,17 | нд | 1,13 | 0,012 | 1,27 | 0,012 | 7,1 | 0,038 | 1,3 | нд |
| <i>Cdk1</i> | (–) | Badie et al., 2000 | 0,96 | нд | 1,01 | нд | 1,31 | 3·10 ⁻⁵ | 15 | 0,008 | 1195 | 4·10 ⁻⁸ |
| <i>Cdk4</i> | | | 1,10 | 0,008 | 1,24 | 3·10 ⁻⁴ | 1,07 | 0,016 | 105 | 5·10 ⁻⁵ | 0,4 | нд |
| <i>Cdkn1a</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,20 | (0,041) | 1,17 | 0,028 | 1,15 | (0,036) | 9,4 | 0,022 | 0,3 | нд |
| <i>Cdkn2a</i> | – | Stott et al., 1998 | 1,06 | нд | 1,38 | 0,001 | 1,19 | нд | 423 | 1·10 ⁻⁶ | 2,4 | нд |
| <i>Chek1</i> | – | Kho et al., 2004 | 1,31 | 0,010 | 1,29 | 0,010 | 1,07 | нд | 23 | 0,003 | 5,3 | нд |
| <i>Chek2</i> | – | Matsui et al., 2004 | 1,04 | нд | 1,22 | нд | 1,18 | 0,008 | 6,8 | 0,040 | 20 | 0,004 |
| <i>Cul9</i> | | | 1,20 | 0,025 | 1,35 | 0,002 | 1,05 | нд | 31 | 0,001 | 7,8 | (0,032) |
| <i>Dapk1</i> | + | Martoriati et al., 2005 | 1,34 | 0,003 | 1,41 | 7·10 ⁻⁴ | 0,90 | 0,002 | 14 | 0,010 | 136 | 2·10 ⁻⁵ |

Таблица 5. (Продолжение).

| Ген | Гены-мишени p53 | | Растворитель | | Нутлин-3 | | | | mANOVA (нутлин-3(2)×тетанизация(2)) | | | |
|----------------|-----------------|-----------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | | | Влияние тетанизации | | Изменение базальной экспрессии | | Влияние тетанизации | | Эффект нутлина-3 | | Эффект взаимодействия | |
| | TP | Ссылки | Тр/Кр | p _t | Кн/Кр | p _t | Тн/Кн | p _t | F(1,6) | p | F(1,6) | p |
| <i>Dnmt1</i> | – | Riley et al., 2008 | 1,15 | нд | 1,19 | нд | 1,16 | 2·10 ⁻⁵ | 19 | 0,005 | 0,5 | нд |
| <i>E2f1</i> | (–) | Carvajal et al., 2012 | 1,34 | 0,006 | 1,22 | 0,003 | 1,28 | 2·10 ⁻⁵ | 45 | 5·10 ⁻⁴ | 0,00 | нд |
| <i>E2f3</i> | | | 1,62 | 6·10 ⁻⁴ | 1,78 | 4·10 ⁻⁶ | 0,76 | 3·10 ⁻⁴ | 39 | 8·10 ⁻⁴ | 528 | 4·10 ⁻⁷ |
| <i>Egfr</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,39 | 0,023 | 1,33 | 0,001 | 1,29 | 0,006 | 70 | 2·10 ⁻⁴ | 0,01 | нд |
| <i>Egr1</i> | + | Yu et al., 2007 | 1,22 | 0,012 | 1,21 | 0,025 | 1,11 | 0,008 | 20 | 0,004 | 3,7 | нд |
| <i>Ep300</i> | | | 1,17 | 0,019 | 1,22 | 0,003 | 1,02 | нд | 9,9 | 0,02 | 7,8 | (0,03) |
| <i>Ercc1</i> | | | 1,17 | 0,006 | 1,29 | 1·10 ⁻⁴ | 1,11 | 2·10 ⁻⁴ | 39 | 8·10 ⁻⁴ | 1,9 | нд |
| <i>Esr1</i> | + | Angeloni et al., 2004 | 1,09 | нд | 1,16 | нд | 1,26 | нд | 26 | 0,002 | 0,6 | нд |
| <i>Fadd</i> | | | 1,39 | 0,001 | 1,57 | 1·10 ⁻⁴ | 0,83 | (0,035) | 75 | 1·10 ⁻⁴ | 66 | 2·10 ⁻⁴ |
| <i>Fas</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,18 | нд | 1,14 | 0,021 | 1,23 | нд | 17 | 0,006 | 0,3 | нд |
| <i>Faslg</i> | + | Fukazawa et al., 1999 | 1,19 | нд | 1,19 | 0,026 | 1,14 | 0,024 | 16 | 0,007 | 0,06 | нд |
| <i>Foxo3</i> | | | 1,49 | 3·10 ⁻⁴ | 1,69 | 3·10 ⁻⁵ | 0,79 | 0,002 | 43 | 6·10 ⁻⁴ | 347 | 2·10 ⁻⁶ |
| <i>Gadd45a</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,26 | 0,027 | 1,41 | 2·10 ⁻⁵ | 0,96 | 0,001 | 61 | 2·10 ⁻⁴ | 24 | 0,003 |
| <i>Hdac1</i> | | | 1,12 | нд | 1,24 | 0,002 | 1,10 | (0,046) | 27 | 0,002 | 0,00 | нд |
| <i>Hif1a</i> | | | 1,30 | 0,001 | 1,46 | 5·10 ⁻⁵ | 0,95 | нд | 41 | 7·10 ⁻⁴ | 145 | 2·10 ⁻⁵ |

Таблица 5. (Продолжение).

| Ген | Гены-мишени p53 | | Растворитель | | Нутлин-3 | | | | rmANOVA (нутлин-3(2)×тетанизация(2)) | | | |
|---------------|-----------------|------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------|-----------------------|---------|
| | | | Влияние тетанизации | | Изменение базальной экспрессии | | Влияние тетанизации | | Эффект нутлина-3 | | Эффект взаимодействия | |
| | TP | Ссылки | Tr/Kp | p _t | Kn/Kp | p _t | Tn/Kn | p _t | F(1,6) | p | F(1,6) | p |
| <i>Igflr</i> | | | 1,08 | нд | 1,14 | 0,006 | 1,11 | 0,009 | 22 | 0,004 | 1,2 | нд |
| <i>Il6</i> | - | Santhanam et al., 1991 | 1,45 | 0,011 | 1,31 | 3·10 ⁻⁴ | 1,26 | 3·10 ⁻⁴ | 38 | 8·10 ⁻⁴ | 1,7 | нд |
| <i>Jun</i> | | | 1,35 | 0,017 | 1,32 | 0,002 | 1,15 | (0,032) | 27 | 0,002 | 3,0 | нд |
| <i>Kras</i> | | | 1,11 | нд | 1,22 | 0,003 | 1,07 | 0,012 | 71 | 2·10 ⁻⁴ | 0,4 | нд |
| <i>Lig4</i> | | | 1,12 | нд | 1,14 | нд | 1,12 | нд | 6,8 | 0,04 | 0,01 | нд |
| <i>Mcl1</i> | | | 1,30 | 0,013 | 1,32 | 2·10 ⁻⁴ | 1,12 | 0,006 | 61 | 2·10 ⁻⁴ | 5,4 | нд |
| <i>Mdm2</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,21 | 0,016 | 1,22 | 0,003 | 1,13 | нд | 35 | 0,001 | 0,5 | нд |
| <i>Mdm4</i> | | | 1,16 | нд | 1,27 | 2·10 ⁻⁴ | 1,03 | нд | 80 | 1·10 ⁻⁴ | 3,6 | нд |
| <i>Mlh1</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,16 | (0,037) | 1,21 | 0,017 | 1,06 | нд | 14 | 0,009 | 1,0 | нд |
| <i>Msh2</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,10 | нд | 1,11 | нд | 1,16 | 4·10 ⁻⁵ | 6,1 | (0,049) | 1,3 | нд |
| <i>Myc</i> | - | Moberg et al., 1992 | 1,48 | 0,009 | 1,31 | 0,001 | 1,34 | 3·10 ⁻⁴ | 48 | 5·10 ⁻⁴ | 0,2 | нд |
| <i>Nf1</i> | | | 1,54 | 6·10 ⁻⁴ | 1,25 | 1·10 ⁻⁴ | 1,37 | 3·10 ⁻⁴ | 51 | 4·10 ⁻⁴ | 2,7 | нд |
| <i>Nfkb1</i> | | | 1,27 | 4·10 ⁻⁴ | 1,27 | 1·10 ⁻⁴ | 1,12 | 0,005 | 44 | 6·10 ⁻⁴ | 28 | 0,002 |
| <i>Pcna</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,33 | 4·10 ⁻⁵ | 1,28 | 0,007 | 1,29 | 0,014 | 28 | 0,002 | 0,3 | нд |
| <i>Pmaip1</i> | + | Oda et al., 2000 | 1,55 | 0,008 | 1,47 | 0,036 | 1,16 | 2·10 ⁻⁷ | 12 | 0,012 | 11 | (0,017) |

Таблица 5. (Продолжение).

| Ген | Гены-мишени p53 | | Растворитель | | Нутлин-3 | | | | mANOVA (нутлин-3(2)×тетанизация(2)) | | | |
|----------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | | | Влияние тетанизации | | Изменение базальной экспрессии | | Влияние тетанизации | | Эффект нутлина-3 | | Эффект взаимодействия | |
| | TP | Ссылки | Tr/Kp | p _t | Kn/Kp | p _t | Tn/Kn | p _t | F(1,6) | p | F(1,6) | p |
| <i>Ppm1d</i> | + | Fiscella et al., 1997 | 1,11 | 0,010 | 1,23 | 0,001 | 1,10 | 0,010 | 75 | 1·10 ⁻⁴ | 0,2 | нд |
| <i>Prcl</i> | - | Li et al., 2004a | 1,29 | нд | 1,28 | 0,002 | 1,20 | нд | 16 | 0,007 | 0,03 | нд |
| <i>Prkca</i> | - | Zhan et al., 2005 | 1,30 | 0,007 | 0,92 | 0,008 | 1,58 | 0,001 | 1,4 | нд | 17 | 0,007 |
| <i>Pten</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,47 | (0,042) | 1,46 | 0,009 | 0,92 | нд | 15 | 0,009 | 16 | 0,007 |
| <i>Pttg1</i> | - | Kho et al., 2004 | 0,89 | 0,023 | 0,96 | нд | 0,69 | 3·10 ⁻⁴ | 21 | 0,004 | 42 | 7·10 ⁻⁴ |
| <i>Rb1</i> | - | Shiio et al., 1992 | 1,16 | нд | 1,30 | 0,002 | 1,01 | нд | 48 | 4·10 ⁻⁴ | 5,8 | нд |
| <i>Rela</i> | | | 1,18 | 0,002 | 1,31 | 2·10 ⁻⁵ | 0,99 | нд | 43 | 6·10 ⁻⁴ | 91 | 8·10 ⁻⁵ |
| <i>RGD1566319</i> | + | Budanov, Karin, 2008 | 1,23 | нд | 1,32 | 7·10 ⁻⁴ | 1,04 | нд | 33 | 0,001 | 1,7 | нд |
| <i>Rprm</i> | + | Ohki et al., 2000 | 0,74 | 0,029 | 0,95 | нд | 1,15 | 0,019 | 13 | 0,012 | 30 | 0,002 |
| <i>S100B</i> | + | Lin et al., 2004 | 2,93 | 3·10 ⁻⁵ | 1,51 | (0,047) | 1,88 | 0,020 | 1,5 | нд | 2,5 | нд |
| <i>Sfn (14-3-3s)</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,11 | нд | 1,09 | нд | 1,45 | нд | 41 | 7·10 ⁻⁴ | 0,8 | нд |
| <i>Sirt1</i> | | | 1,46 | 0,004 | 1,32 | 0,002 | 1,22 | 0,015 | 17 | 0,006 | 5,5 | нд |
| <i>Stat1</i> | | | 1,24 | 0,001 | 1,36 | 3·10 ⁻⁵ | 1,00 | нд | 40 | 7·10 ⁻⁴ | 163 | 1·10 ⁻⁵ |
| <i>Tnf</i> | (+) | Brown et al., 2007 | 1,28 | 3·10 ⁻⁴ | 1,25 | 2·10 ⁻⁴ | 1,13 | 0,002 | 37 | 9·10 ⁻⁴ | 33 | 0,001 |
| <i>Tnfrsf10b</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,17 | нд | 1,27 | нд | 1,05 | нд | 55 | 3·10 ⁻⁴ | 0,2 | нд |

Таблица 5. (Продолжение).

| Ген | Гены-мишени p53 | | Растворитель | | Нутлин-3 | | | | mANOVA (нутлин-3(2)×тетанизация(2)) | | | |
|-----------------|-----------------|----------------------|---------------------|----------------|--------------------------------|----------------|---------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | | | Влияние тетанизации | | Изменение базальной экспрессии | | Влияние тетанизации | | Эффект нутлина-3 | | Эффект взаимодействия | |
| | ТР | Ссылки | Тр/Кр | p _t | Кн/Кр | p _t | Тн/Кн | p _t | F(1,6) | p | F(1,6) | p |
| <i>Trp53</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,00 | нд | 1,17 | нд | 1,07 | 1·10 ⁻⁵ | 63 | 2·10 ⁻⁴ | 2,0 | нд |
| <i>Trp53bp2</i> | - | Lopez et al., 2000 | 1,11 | 0,009 | 1,13 | 0,008 | 1,06 | 0,016 | 6,8 | 0,040 | 2,6 | нд |
| <i>Trp63</i> | + | Riley et al., 2008 | 1,17 | нд | 0,98 | нд | 1,39 | 0,011 | 0,3 | нд | 1,3 | нд |
| <i>Trp73</i> | + | Riley et al., 2008 | 2,15 | 0,003 | 1,43 | 0,013 | 1,76 | 0,002 | 9,8 | 0,020 | 0,2 | нд |
| <i>Xrcc4</i> | | | 1,03 | нд | 1,14 | 0,006 | 1,15 | 2·10 ⁻⁴ | 87 | 9·10 ⁻⁵ | 14 | 0,010 |
| <i>Xrcc5</i> | | | 1,35 | нд | 1,40 | 0,040 | 1,10 | (0,046) | 21 | 0,004 | 1,3 | нд |
| <i>Zmat3</i> | + | Israeli et al., 1997 | 0,99 | нд | 1,06 | нд | 1,22 | 0,001 | 30 | 0,002 | 37 | 9·10 ⁻⁴ |

Тр, Кр, Тн, Кн – уровни мРНК в тетанизированных (Т) и контрольных (К) срезах, инкубированные в растворителе (р) или нутлине-3 (н). В столбцах "Тр/Кр" и "Тн/Кн" представлены средние кратности изменения уровней мРНК в тетанизированных срезах относительно соответствующего контроля. Справа от каждого значения указан уровень значимости по парному t-критерию Стьюдента. В столбце "Кн/Кр" представлено отношение средних уровней мРНК в контрольных срезах, инкубированных в нутлине-3, и в контрольных срезах, инкубированных в растворителе. Справа от каждого значения указан уровень значимости отличий между соответствующими группами по t-критерию Стьюдента. Знаками "+" или "-" в столбце "ТР" отмечены гены, экспрессию которых p53, соответственно, активирует или репрессирует, в том числе опосредованно (знаки заключены в скобки). В правой части таблицы представлены

результаты ANOVA (нутлин-3(растворитель, нутлин-3)×тетанизация(контроль, тетанизация)) с повторными измерениями в факторе "тетанизация". $N_d - p_t > 0,05$. Достоверные эффекты межфакторного взаимодействия свидетельствуют о возможном участии нутлин-3-зависимого фактора в регуляции соответствующих генов (названия выделены жирным шрифтом) при формировании ДВП. В скобки заключены значения p , превышающие порог достоверности, скорректированный на множественные сравнения ($m=81$, 80 генов набора "p53 Signaling Pathway", уровни мРНК которых достигли порога детекции ($C_T < 35$), и *S100B*).

При этом характер влияния тетанизации на экспрессию гена должен существенно измениться по сравнению с тетанизацией в нормальном растворе, если вклад p53 в индуцируемые тетанизацией процессы в норме значителен. В предельном случае, если при формировании ДВП ген регулируется только фактором p53, тетанизация в присутствии нутлина-3 не должна изменять уровень мРНК гена.

Однако нутлин-3 уменьшал экспрессию только двух генов, репрессируемых p53, – *Bcl2* и *Prkca*, – тогда как уровень мРНК большинства генов в наборе увеличивался (таблица 5). Это свидетельствует о существенном p53-независимом влиянии убиквитинлигазы Mdm2, ингибитором которой является нутлин-3, на экспрессию, по крайней мере, некоторых из исследованных генов. Это влияние может реализовываться, в частности, через регуляцию стабильности мРНК (Biderman et al., 2012). Поэтому мы попытались количественно оценить вклад различных механизмов в регуляцию исследованных генов на основе модели, предполагающей участие в процессе не только нутлин-3-зависимого и -независимого транскрипционных факторов, активируемых при тетанизации, но и нутлин-3-зависимого фактора, не связанного с ДВП.

Модель описывается следующими уравнениями:

$$K1 = T_p/K_p = f_n \cdot f \quad (2),$$

$$K2 = K_n/K_p = f_n \cdot s \quad (3),$$

$$K3 = T_n/K_n = f \quad (4),$$

где T_p , K_p , T_n , K_n – уровни мРНК в тетанизованных (Т) и контрольных (К) срезах, инкубированные в растворителе (р) или нутлине-3 (н), f_n и f – эффекты нутлин-3-зависимого и -независимого транскрипционных факторов соответственно, s – эффект нутлин-3-зависимого фактора, не связанного с ДВП. Как видно из формул, равенство параметров f_n , f и s единице означает отсутствие эффекта, величины больше или меньше 1 свидетельствуют об

активирующем или репрессорном влиянии соответственно. Предполагается одинаковое влияние тетанизации и нутлина-3 на величину f_n .

Прежде всего, для дальнейшего анализа были отобраны гены, динамика экспрессии которых после тетанизации достоверно изменялась в присутствии нутлина-3. ANOVA (нутлин-3 (растворитель, нутлин-3) × тетанизация (контроль, тетанизация)) с повторными измерениями в факторе "тетанизация" выявил 33 гена (с учетом поправки на множественные сравнения – 25), экспрессия которых характеризовалась достоверным эффектом межфакторного взаимодействия (таблица 5), что может свидетельствовать о существенном вкладе нутлин-3-зависимого фактора в регуляцию этих генов при формировании ДВП.

Затем рассчитывались параметры f_n , f и s (таблица 6). В случае если тетанизация в присутствии нутлина-3 не оказывала достоверного влияния на уровень мРНК, величина f принималась равной 1, в остальных случаях вычислялась в соответствии с формулой (4):

$$f = K3 \quad (5).$$

Далее, в соответствии с уравнением (2), вычислялась величина f_n :

$$f_n = K1/K3 \quad (6),$$

после чего оценивалась значимость влияния нутлин-3-зависимого фактора, не связанного с ДВП. Для этого величины базального уровня мРНК в нормальных условиях (Kv) умножали на f_n и сравнивали полученные значения с базальным уровнем мРНК в присутствии нутлина-3 (Kn) с помощью t -критерия Стьюдента. При отсутствии достоверных различий величина s принималась равной 1, в остальных случаях вычислялась по формуле, следующей из уравнения (3):

$$s = K2 \cdot K3 / K1 \quad (7).$$

Таблица 6. Параметры модели влияния тетанизации и нутлина-3 на экспрессию генов.

| Ген | TP | K1 | K2 | K3 | f_n | s | f | Модель |
|-----------------|-----|------|------|------|-------|------|------|--------------|
| <i>Apex1</i> | | 1,11 | 1,29 | 1 | 1,11 | 1,16 | 1 | $+f_n s$ |
| <i>Atm</i> | | 1,27 | 1,37 | 1,08 | 1,18 | 1,17 | 1,08 | $+f_n s f$ |
| <i>(Bag1)</i> | | 1,13 | 1,3 | 1 | 1,13 | 1,15 | 1 | $+f_n s$ |
| <i>(Bax)</i> | + | 1,41 | 1,38 | 1 | 1,41 | 1 | 1 | $+f_n$ |
| <i>Bcl2</i> | - | 0,71 | 0,92 | 1 | 0,71 | 1,30 | 1 | $-f_n + s$ |
| <i>Brca2</i> | | 1,2 | 1,1 | 1,51 | 0,79 | 1,38 | 1,51 | $-f_n + s f$ |
| <i>Btg2</i> | + | 1,47 | 1,41 | 1,11 | 1,32 | 1 | 1,11 | $+f_n f$ |
| <i>(Casp2)</i> | (-) | 1,3 | 1,34 | 1,12 | 1,16 | 1 | 1,12 | $+f_n f$ |
| <i>(Casp9)</i> | | 1,14 | 1,28 | 1 | 1,14 | 1,12 | 1 | $+f_n s$ |
| <i>Ccnb1</i> | - | 1 | 1,12 | 1,18 | 0,85 | 1,32 | 1,18 | $-f_n + s f$ |
| <i>(Ccng1)</i> | + | 1,31 | 1,35 | 1,16 | 1,13 | 1,20 | 1,16 | $+f_n s f$ |
| <i>Cdc25a</i> | - | 1 | 1 | 1,31 | 0,76 | 1,31 | 1,31 | $-f_n + s f$ |
| <i>Cdk1</i> | - | 1 | 1 | 1,31 | 0,76 | 1,31 | 1,31 | $-f_n + s f$ |
| <i>Chek2</i> | - | 1 | 1 | 1,18 | 0,85 | 1,18 | 1,18 | $-f_n + s f$ |
| <i>(Cul9)</i> | | 1,2 | 1,35 | 1 | 1,20 | 1 | 1 | $+f_n$ |
| <i>Dapk1</i> | + | 1,34 | 1,41 | 0,9 | 1,49 | 1 | 0,9 | $+f_n - f$ |
| <i>E2f3</i> | | 1,62 | 1,78 | 0,76 | 2,13 | 0,84 | 0,76 | $+f_n - s f$ |
| <i>(Ep300)</i> | | 1,17 | 1,22 | 1 | 1,17 | 1 | 1 | $+f_n$ |
| <i>Fadd</i> | | 1,39 | 1,57 | 0,83 | 1,67 | 1 | 0,83 | $+f_n - f$ |
| <i>Foxo3</i> | | 1,49 | 1,69 | 0,79 | 1,89 | 1 | 0,79 | $+f_n - f$ |
| <i>Gadd45a</i> | + | 1,26 | 1,41 | 0,96 | 1,31 | 1 | 0,96 | $+f_n - f$ |
| <i>Hif1a</i> | | 1,3 | 1,46 | 1 | 1,30 | 1,12 | 1 | $+f_n s$ |
| <i>Nfkb1</i> | | 1,27 | 1,27 | 1,12 | 1,13 | 1,12 | 1,12 | $+f_n s f$ |
| <i>(Pmaip1)</i> | + | 1,55 | 1,47 | 1,16 | 1,34 | 1 | 1,16 | $+f_n f$ |
| <i>Prkca</i> | - | 1,3 | 0,92 | 1,58 | 0,82 | 1,12 | 1,58 | $-f_n + s f$ |
| <i>Pten</i> | + | 1,47 | 1,46 | 1 | 1,47 | 1 | 1 | $+f_n$ |
| <i>Pttg1</i> | - | 0,89 | 1 | 0,69 | 1,29 | 0,78 | 0,69 | $+f_n - s f$ |
| <i>Rela</i> | | 1,18 | 1,31 | 1 | 1,18 | 1,11 | 1 | $+f_n s$ |

Таблица 6. (Продолжение).

| Ген | ТР | K1 | K2 | K3 | f_n | s | f | Модель |
|---------------------|-----|------|------|------|-------|------|------|-----------|
| <i>Rprm</i> | + | 0,74 | 1 | 1,15 | 0,64 | 1,55 | 1,15 | $-f_n+sf$ |
| <i>Stat1</i> | | 1,24 | 1,36 | 1 | 1,24 | 1,10 | 1 | $+f_n s$ |
| <i>Tnf</i> | (+) | 1,28 | 1,25 | 1,13 | 1,13 | 1,10 | 1,13 | $+f_n sf$ |
| <i>Xrcc4</i> | | 1 | 1,14 | 1,15 | 0,87 | 1,31 | 1,15 | $-f_n+sf$ |
| <i>Zmat3</i> | + | 1 | 1 | 1,22 | 0,82 | 1,22 | 1,22 | $-f_n+sf$ |

ТР – тип p53-зависимой регуляции (прямой или косвенной, ссылки – в таблице 5). Подчеркнуты названия генов, для которых показана прямая регуляция со стороны p53. K1, K2 и K3 – значения, указанные в столбцах Tv/Kv, Kn/Kv и Tn/Kn таблицы 5 соответственно, в случае недостоверных отличий величина коэффициента принята за 1. f_n , s и f – расчетные величины параметров модели, заданной формулами (1-3), пояснения в тексте. Жирным шрифтом выделены названия генов, для которых вычисленный эффект фактора " f_n " не соответствует типу p53-зависимой регуляции гена. В скобки заключены названия генов, для которых значения p взаимодействия нутлина-3 и тетанизации оказались выше порога, скорректированного на множественные сравнения ($m=81$, 80 генов набора "p53 Signaling Pathway" и *S100B*).

На рисунках 19-21 в графическом виде представлены варианты поведения модели при различных сочетаниях f_n , f и s , позволяющие объяснить представленные в таблице 6 экспериментальные данные (К1-К3).

В обсуждаемой подгруппе оказалось 18 генов (с учетом поправки на множественные сравнения – 14), прямо или опосредованно регулируемых фактором p53. Интересно, что для большинства этих генов модели, позволяющие удовлетворительно объяснить характер зависимости гена от нутлина-3 и тетанизации, показали совпадение знака регуляции со стороны нутлин-3-зависимого фактора с известным из литературы типом p53-зависимой регуляции (таблица 6). Несоответствие предсказания модели знаку p53-зависимой регуляции генов может объясняться специфической зависимостью активности фактора f от сочетания эффектов нутлина-3 и тетанизации, что приводит к искажению оценки вклада фактора f_n . Кроме того, в культурах клеток, на которых до сих пор проводилась идентификация мишеней p53, как правило, изучают эффекты длительной активации p53. Например, развитие не прямой p53-зависимой репрессии *Casp2* требует более 24 ч (Baptiste-Okoh et al., 2008), поэтому вполне возможно, что краткосрочная активация p53 приводит к другому результату.

Таким образом, для 14-ти из 18-ти известных p53-зависимых генов, для которых ANOVA продемонстрировал значимое взаимодействие факторов "нутлин-3" и "тетанизация", проведенный анализ показал соответствие поведения экспрессии генов в экспериментах гипотезе об участии p53 в их регуляции при формировании ДВП. Среди них оказалось 11 генов, для которых показан прямой контроль со стороны p53. Этот результат косвенно подтверждает вовлечение p53 в регуляцию значительного количества генов при ДВП.

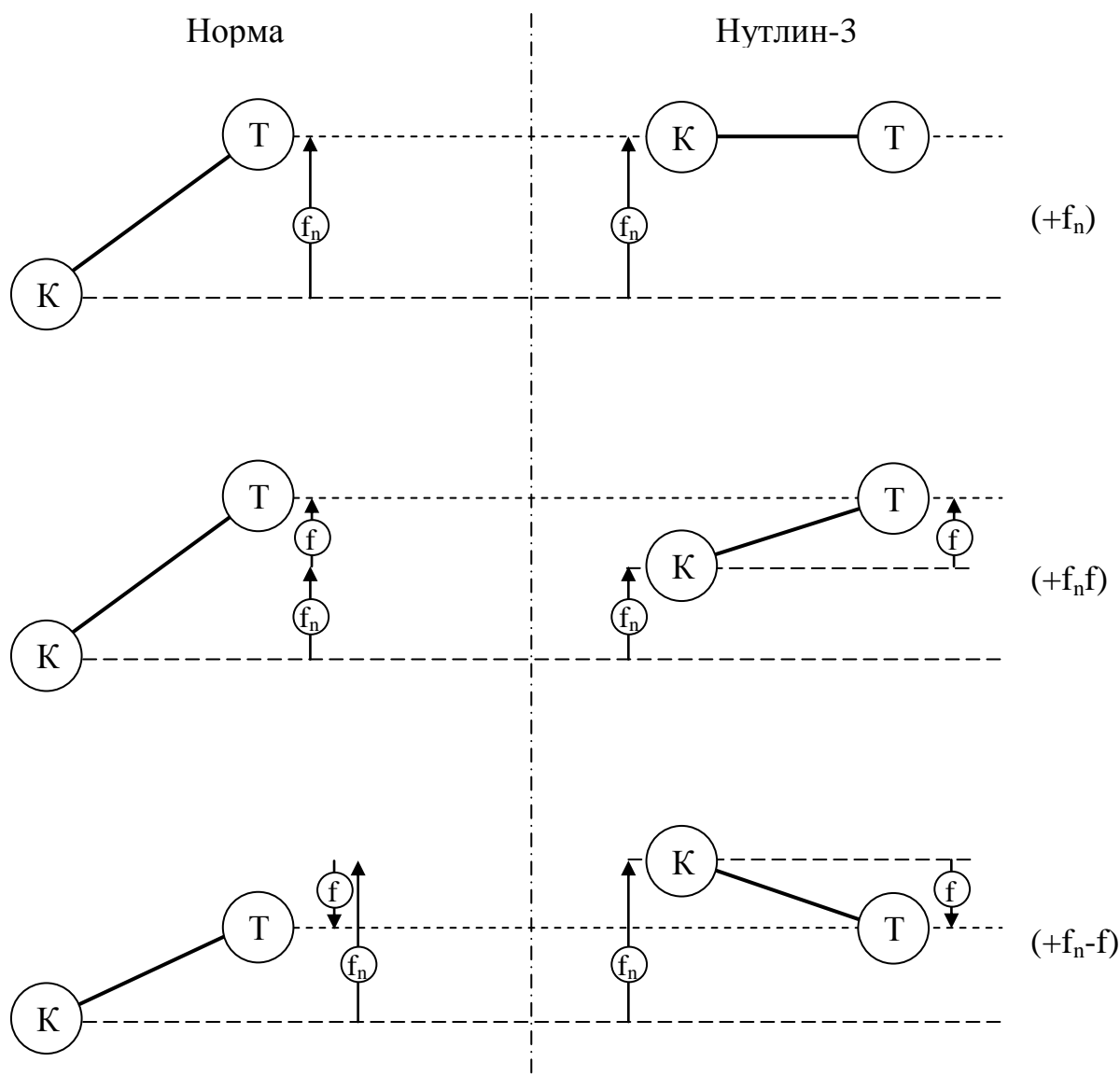


Рис. 19. Модели влияния нутлина-3 и тетанизации на экспрессию гена (активирующее действие фактора " f_n ", недостоверный эффект фактора " s ").

Графики "К–Т" характеризуют направление изменения уровней мРНК в тетанизированных срезах (Т) относительно соответствующих контролей (К). Слева – результаты экспериментов, проводившихся в нормальных условиях, справа – в присутствии нутлина-3. Стрелками показано влияние нутлин-3-зависимого (f_n) и -независимого (f) транскрипционных факторов, активируемых при тетанизации. Справа от моделей указаны их мнемонические коды, использованные в таблице 6.

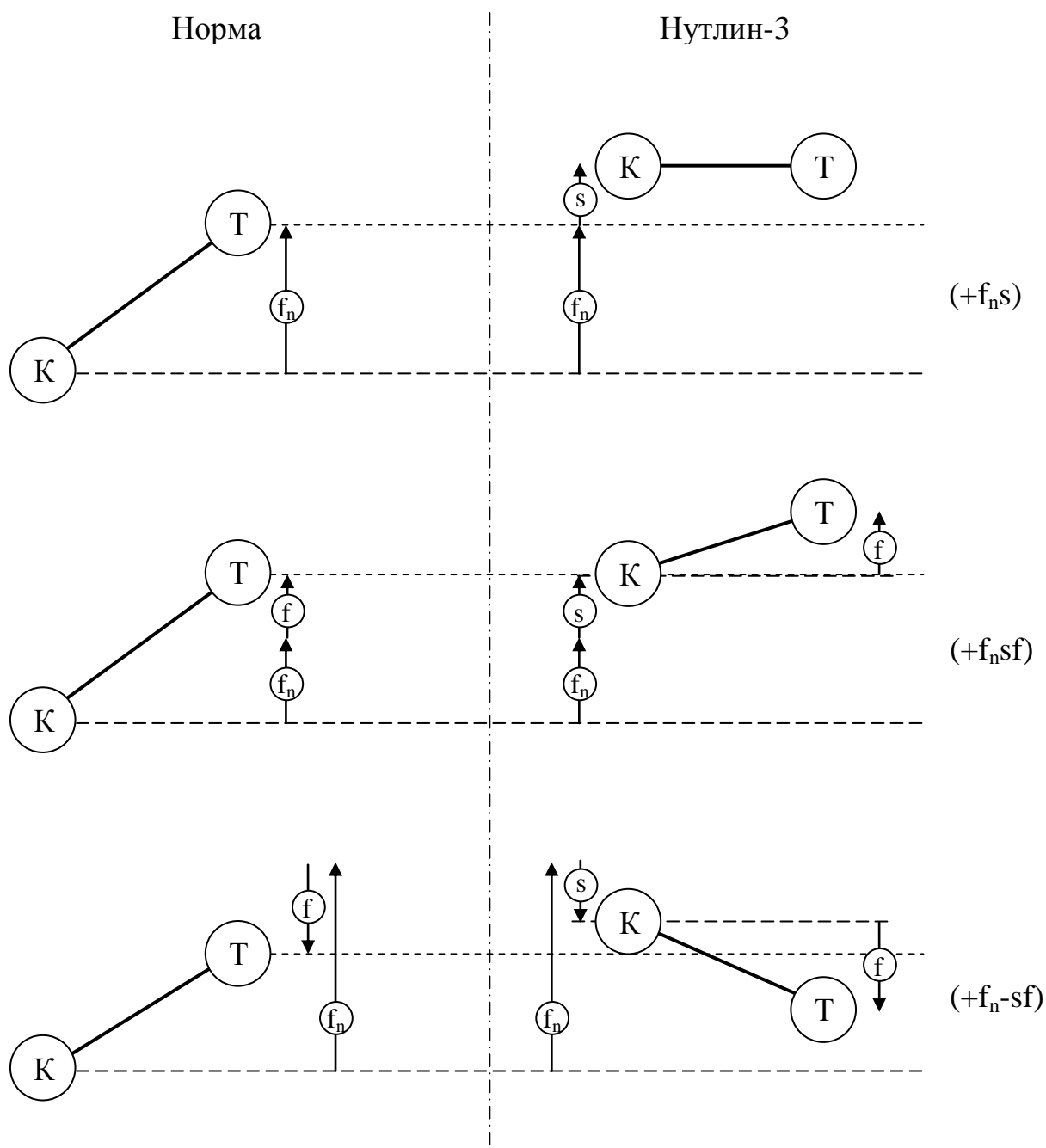


Рис. 20. Модели влияния нутлина-3 и тетанизации на экспрессию гена (активирующее действие фактора " f_n ", выраженный эффект фактора " s ").

Стрелкой " s " показан эффект нутлин-3-зависимого фактора, не связанного с ДВП. Остальные пояснения – в подписи к рисунку 19.

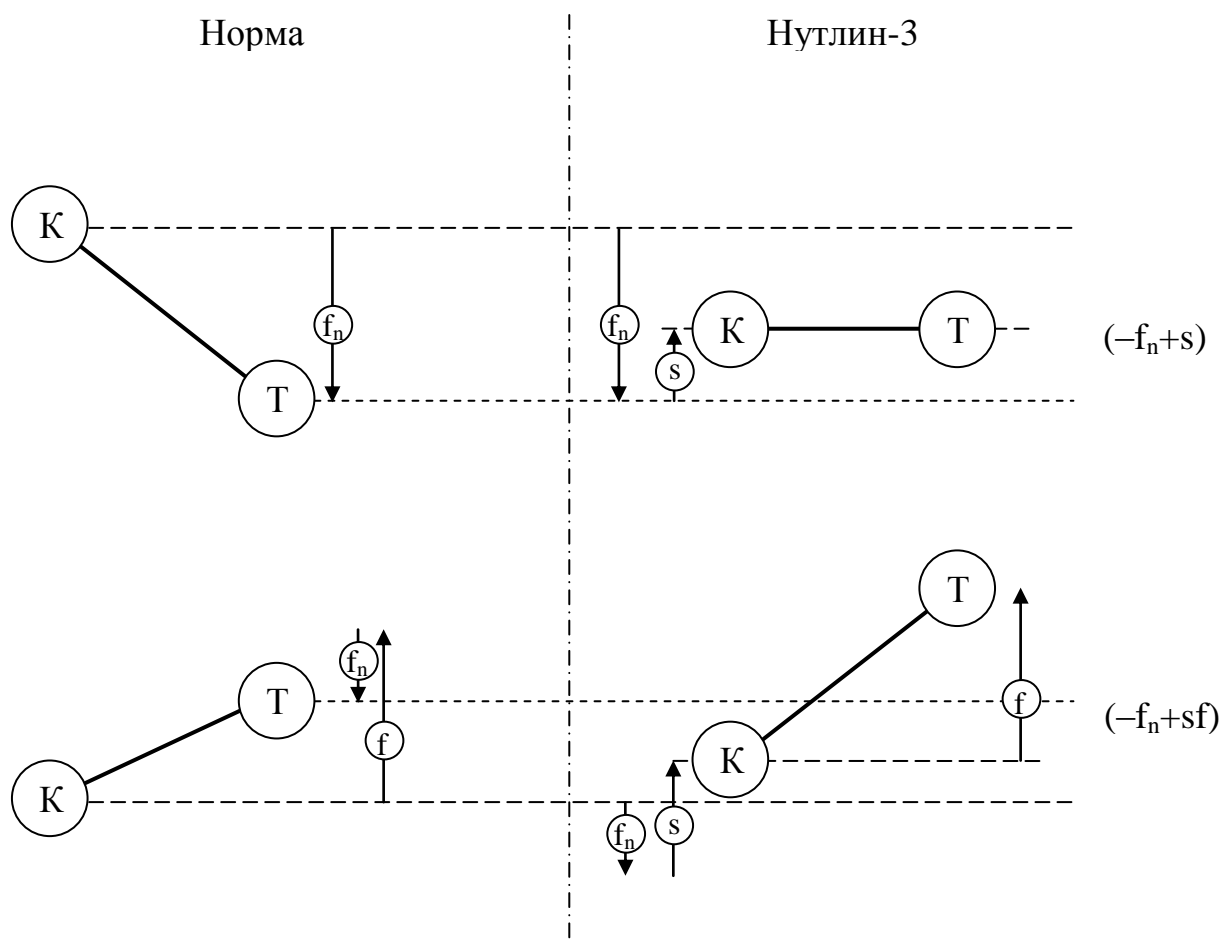


Рис. 21. Модели влияния нутлина-3 и тетанизации на экспрессию гена (репрессорное действие фактора " f_n ", выраженный эффект фактора " s ").

Пояснения – в подписях к рисункам 19-20.

Идентификация мишеней p53 до сих пор проводилась преимущественно на клетках человека или мышей. Однако сравнение идентифицированных сайтов связывания p53 в человеческих и мышинных генах, представленных в таблице 6, с гомологичными областями соответствующих генов крысы показало высокую степень консервативности данных сайтов (таблица 7), что позволяет ожидать их сходную функциональность у человека и/или мышей с одной стороны и у крыс с другой стороны, хотя, разумеется, не исключает необходимости экспериментальной проверки этого предположения. p53-зависимые гены *Ccnb1*, *Chek2* и *Prkca*, присутствующие в таблице 6, не приведены в таблице 7, поскольку репрессорное влияние p53 в этих случаях объясняется не связыванием с ДНК, а прямым взаимодействием с активаторами транскрипции Sp1 (*Ccnb1* и *Prkca*) или NF- Υ (*Chek2*).

Значительное количество совпадений предсказанных моделью типов p53-зависимой регуляции при формировании ДВП с экспериментальными данными, полученными в культурах клеток, наводит на мысль о том, что среди представленных в таблице 6 генов, для которых зависимость от p53 неизвестна, также имеются мишени p53. Чтобы оценить возможность прямой p53-зависимой регуляции указанных генов, мы изучили их последовательности и обнаружили в них потенциальные p53-респонсивные элементы (таблица 8).

В частности, такой сайт имеется вблизи старта транскрипции упоминавшейся выше каспазы-2 (*Casp2*), что дает основание предположить возможность прямой регуляции гена со стороны p53. Если к тому же p53 является активатором *Casp2*, это объясняло бы расхождение эффектов нутлина-3 с данными об опосредованной p53-зависимой репрессии гена (таблицы 5 и 6).

Таблица 7. Потенциальные p-53-связывающие сайты в генах крысы (r), гомологичные идентифицированным p53-респонсивным элементам в генах мыши (m) и/или человека (h).

| RefSeq | Символ | p53-PE | Положение |
|--------------|----------------|--|-------------|
| NM_017059 | <i>Bax</i> | GGGCAGGCCCGGGCTTGTCG (r) | 272/291 |
| NM_004324 | | GGGCAGGCCCGGGCTTGTCG (h) | 354/375 |
| NM_016993 | <i>Bcl2</i> | AAACTTGACA _{gaa} GATCATGCGG (r) | -309/-287 |
| NM_000633 | | AAACTTGACA _{gag} GATCATGCTG (h) | 169/191 |
| NM_017259 | <i>Btg2</i> | AGCCCGGGGA _a AGTCCGGGCA (r) | -20/1 |
| NM_006763 | | AGTCCGGGCA _g AGCCCGAGCA (h) | -25/-5 |
| NM_012923 | <i>Ccng1</i> | ACGCAAGCCCGGGCTAGTCT (r) | 277/296 |
| NM_004060 | | GCACAAGCCCGAGGCTAGTCC (h) | 356/375 |
| NM_001107335 | <i>Dapk1</i> | GGGCATGTCC _c TGGCTGGCCC (r) | 726/746 |
| NM_029653 | | GGGCATGTCC _c TGACTGGCCC (m) | 730/750 |
| NM_001288731 | | GAACTTGTT _{ctaa} TGGCATGTCT (h) | 10129/10131 |
| NM_024127 | <i>Gadd45a</i> | GCACTAGCTC _{gtg} TGACTAATTC (r) | 903/925 |
| NM_001924 | | GAACATGTCTAAGCATGCTG (h) | 1599/1618 |
| NM_001008385 | <i>Pmaip1</i> | CGGCTTGCCCCGGCAAGTTG (r) | -337/-318 |
| NM_021451 | | AGGCTTGCCCCGGCAAGTTG (m) | -174/-155 |
| NM_031606 | <i>Pten</i> | GAGCGAGCCG _{n10} GGGCATGCTC (r) | -1074/-1045 |
| NM_000314 | | GAGCAAGCC _{n14} GGGCATGCTC (h) | -117/-84 |

Ссылки на источники идентифицированных p53-PE – в таблице 5.
Подчеркнуты несоответствия канонической форме.

Таблица 8. Потенциальные p-53-респонсивные элементы в генах крысы, регулируемых нутлин-3-зависимым фактором при формировании ДВП.

| RefSeq | Символ | Потенциальные p53-PE | Положение |
|--------------|--------------|---|--|
| NM_024148 | <i>Apex1</i> | <u>CAGCTTGTAT</u> gtatgtGTGCAAGCTT, CTACTTGCTTaatatgGACCAAGTTA | -1048/-1023 417/442 |
| NM_001106821 | <i>Atm</i> | CCGCTAGCCTGAACTTGGAC | -947/-928 |
| NM_001106647 | <i>Bag1</i> | GGCCTTGTGCttcctAGGCAAGCGC | 2598/2622 |
| NM_031542 | <i>Brca2</i> | GCGCTTGCCTaggaaGCGCAAGGCC | 546/570 |
| NM_022522 | <i>Casp2</i> | GCGCATGTCCgggctggggtGGGCTTGCTG | -147/-117 |
| NM_031632 | <i>Casp9</i> | AAGCAAGCGTcTACTTGTAT | 2841/2861 |
| XM_006244518 | <i>Cul9</i> | GCGCTTGCCTAGCAAGCGG | -89/-71 |
| NM_001137626 | <i>E2f3</i> | AAACTTGCGCtccAGACTAGATC, AGCCTAGGTCaccccggtAACCATGGTG | -445/-423 -248/-221 |
| XM_008765878 | <i>Ep300</i> | CATCTTGTTTgtGTGCTAGCTT | -251/-230 |
| NM_152937 | <i>Fadd</i> | GCGCATGCGTgtgattAGACTTCTCG | -64/-38 |
| NM_001106395 | <i>Foxo3</i> | GGACCCGCCcgcctcAGCCTAGGTT, AGGCGAGCCCGGCCAAGCCC | -30/-4 1431/1450 |
| NM_024359 | <i>Hif1a</i> | GAAAATGTTTtaaagtGAGCATGCAA, AGACAAGTATaaATACTAGTTT | 1226/1251 2817/2838 |
| NM_001276711 | <i>Nfkb1</i> | ATGCATGCATgcATGCATGCAT CAGCATGCTActtcgtgtTGGCATGCAC, AGGCATGTCCcgctataccaGCACATGCTT, AGCCTAGTCTtaccagataGGACTTCCCT | 13356/13377 17365/17394 22148/22178 28739/28770 |
| NM_022391 | <i>Pttg1</i> | GAGCAGGGTCgGGA CTTGTGC | -159/-139 |
| NM_199267 | <i>Rela</i> | AGTCAAGCCTtgatgAAGCATGCTT | -601/-577 |
| NM_001044276 | <i>Rprm</i> | GAACATGCCcattgaagctagAGGCATGAGA, CATCAAGTCCgaAGGCATGATC | -1882/-1852 468/489 |
| NM_032612 | <i>Stat1</i> | GAAC TTGAGCgggaCCGCTTGCCC | 225/248 |
| NM_001006999 | <i>Xrcc4</i> | GAAC TTGTACaTAACAAGTAC, AAGCTTGTTAtttttGAACAAGTTA, GAACATGGCAgcatccaggcAGGCATGGTG | -1703/-1683 -1673/-1648 2028/2057 |
| NM_022548 | <i>Zmat3</i> | CAACAAGGTTggtttgAGTCTTGGTT, AAACAAGCCCAGGCATGTCT | -1918/-1893 1293/1312 |

Существенный интерес для оценки возможной р53-зависимой регуляции каспаз при формировании ДВП представляет динамика экспрессии генов семейства *Bcl2*. Используемый для определения мРНК набор позволял оценить экспрессию нескольких генов семейства *Bcl2* (рисунок 22). Содержание мРНК мишеней р53 *Bax*, *Bid* и *Pmaip1* увеличивалось, а *Bcl2* – уменьшалось через 30 мин после тетанизации. Как показал Вестерн блот анализ, динамика количества белков *Bax* и *Bcl2* соответствовала динамике мРНК, т.е. количество белка *Bax* увеличивалось, а *Bcl2* – уменьшалось после тетанизации (рисунок 23), что подтверждает функциональность изменений уровня мРНК.

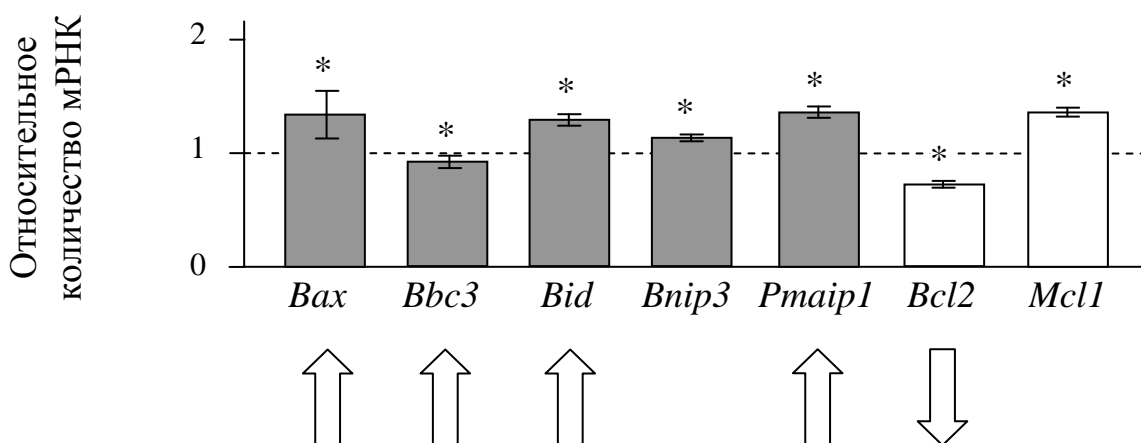


Рис. 22. Динамика мРНК генов семейства *Bcl2* в поле CA1 гиппокампа крысы через 30 мин после индукции долговременной потенциации.

Темные столбцы – проапоптозные белки, светлые – антиапоптозные. Стрелками показан характер регуляции гена со стороны р53 – позитивная (стрелка вверх) или негативная (стрелка вниз). Контроль (нететанизированные срезы) принят за 1. * – $p < 0,05$, относительно контроля, парный t-критерий, $n = 4$ (с учетом поправки на множественные сравнения, $m=81$). Результаты представлены в виде "среднее \pm стандартное отклонение".

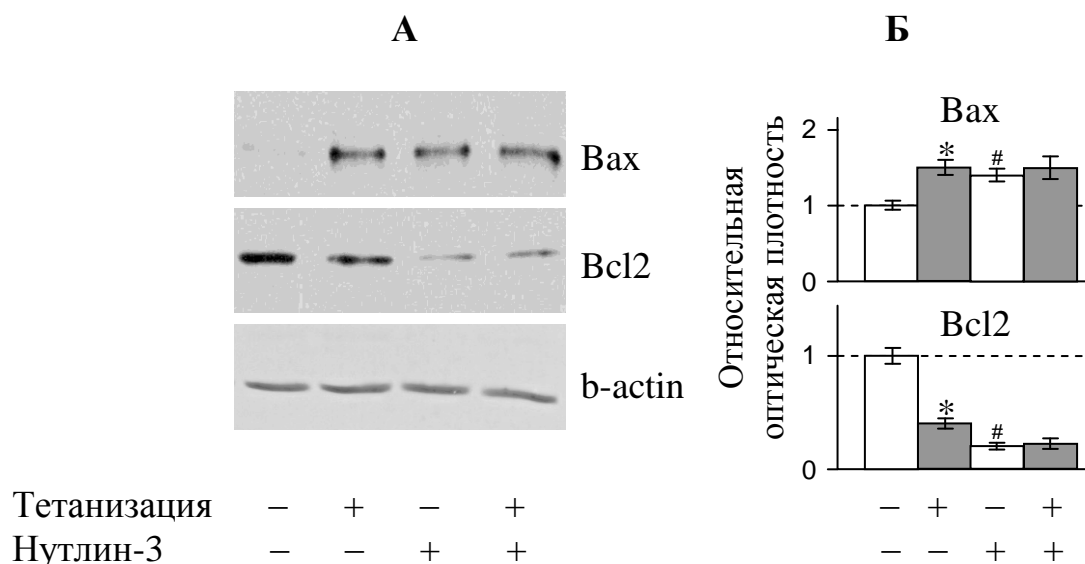


Рис. 23. Влияние тетанизации (30 мин после стимуляции) и нутлина-3 на уровень белков *Bax* и *Bcl2* в поле СА1 гиппокампа крысы.

А – Репрезентативные Вестерн блоты. Б – Данные денситометрического анализа Вестерн блотов. Контроль принят за 1. * – $p < 0,05$, относительно контроля, парный t-критерий, # – $p < 0,05$, относительно контроля, t-критерий, $n=4$. С учетом поправки на множественные сравнения ($m=8$). Результаты представлены в виде "среднее \pm стандартное отклонение".

Наблюдавшиеся изменения экспрессии *Bax*, *Bid*, *Pmaip1* и *Bcl2* согласуются с нашими данными об увеличении ДНК-связывающей активности p53 в ранней фазе ДВП, в то же время расширенный анализ с использованием нутлина-3 продемонстрировал ведущую роль p53 в регуляции *Bcl2*, но не *Bid* в данных условиях (таблица 5). Кроме того, наблюдалась тенденция к уменьшению уровня мРНК *Bbc3/Puma* (рисунок 22), транскрипция которого активируется фактором p53, что иллюстрирует сложный характер регуляции мишеней p53 при формировании ДВП. Для мРНК *Bax* и *Pmaip1* уровень значимости взаимодействия нутлина-3 и тетанизации оказался недостаточно высоким после коррекции на множественные сравнения, однако для белка *Bax* эффект взаимодействия

($F(1,6)=178$, $p=0,00001$) был достоверным и с учетом коррекции ($m=83$, 81 сравнение для мРНК и 2 для белков Вах и Bcl2).

Таким образом, после индукции ДВП в поле СА1 гиппокампа происходят значительные сдвиги в паттерне экспрессии белков семейства Bcl2, что может указывать на вероятное изменение характера регуляции активности каспаз при развитии долговременной потенциации.

4.9. Развитие долговременной потенциации в условиях ингибирования р53-зависимой транскрипции

Принимая во внимание вовлечение некоторых мишеней р53 в синаптическую пластичность, а именно – негативное влияние S100B на долговременную потенциацию и участие белков семейства Bcl2 и каспаз в NMDAR-зависимой депрессии, – интересно было проверить, изменится ли динамика ДВП при нарушении функции р53. Мы попытались ответить на этот вопрос с помощью ингибитора р53-зависимой транскрипции пифитрина-β. Поскольку максимальное увеличение ДНК-связывающей активности р53 приходится на двадцатую минуту после тетанизации, время инкубации с ингибитором было ограничено тридцатью минутами до и после тетанизации. В этих условиях пифитрин-β не оказывал влияния ни на амплитуду популяционных спайков, ни на популяционные возбуждающие постсинаптические потенциалы (рис. 24) в ходе всего эксперимента.

Таким образом, ингибирование р53-зависимой транскрипции не изменяло динамику долговременной потенциации в срезах гиппокампа, по крайней мере, в течение 4 ч после тетанизации.

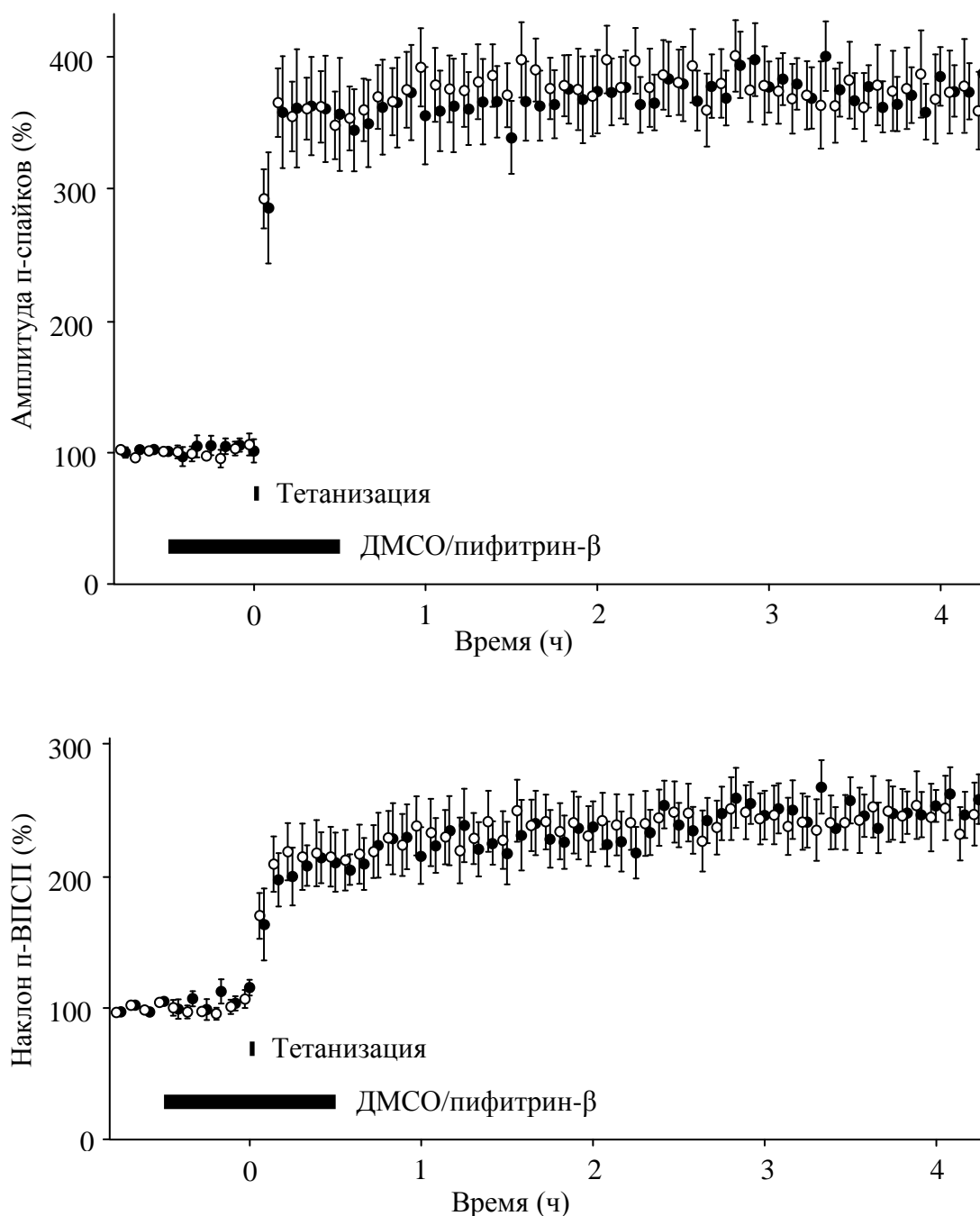


Рис. 24. Сохранение долговременной потенции в поле CA1 в присутствии пифитрина-β.

Абсцисса – время после начала тетанизации. Ординаты – величины указанных параметров, нормированные относительно средних значений в ответах на четыре первых стимула. Темными полосами в нижней части рисунка отмечены общее время тетанизации (включая интервалы между разрядами) и период инкубации с пифитрином-β (5 мкМ) или растворителем (0,1% ДМСО). Черные кружки – эксперименты с пифитрином-β (n=7), светлые – с ДМСО (n=8).

Глава 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Зависимость экспрессии *S100B* и *S100A1* от нейронной активности в срезах гиппокампа

Лежащая в основе обучения и памяти синаптическая пластичность и экспрессия генов тесно взаимосвязаны, однако транскрипционная программа, запускаемая в клетках мозга в ответ на нейронную активность, приводящую к модификации синаптических связей, остается малоизученной. Интересным примером влияния нейронной активности на экспрессию генов является увеличение уровня глиального белка *S100B* (а также, возможно, *S100A1*) в мозге при обучении. В то же время ранние работы не позволяли с уверенностью связать увеличение количества белков *S100* с трансактивацией генов.

S100B способен секретироваться в межклеточное пространство и обладает свойствами цитокина (Donato et al., 2009). Секретируемый *S100B* модулирует нейронную активность (Barger and Van Eldik, 1992; Sakatani et al., 2008) и синаптическую пластичность (Nishiyama et al., 2002). Для *S100B*-нокаутных мышей характерна улучшенная пространственная память и память на негативные эмоциональные стимулы (страх), а также повышенная ДВП в гиппокампе (Nishiyama et al., 2002). В то же время у таких животных быстрее развиваются судороги в модели киндлинга (Dyck et al., 2002). Вероятно, нормальная экспрессия *S100B* необходима для стабильного функционирования мозга.

Интерес к механизмам регуляции экспрессии *S100B* связан не только с его участием в нейропластичности в нормальных условиях, но и с вовлечением этого потенциально провоспалительного агента в патологические процессы (Sorci et al., 2010; Astrand et al., 2013). Уровень *S100B* в сыворотке положительно коррелирует с расстройствами настроения (Schroeter et al., 2013) и шизофренией (Yelmo-Cruz et al., 2013; Aleksovska et

al., 2014). Аллель *S100B*, характеризующийся более высоким уровнем транскрипции, является фактором риска развития биполярного расстройства (Dagdan et al., 2011). По-видимому, хроническое повышение экспрессии *S100B* даже в физиологических пределах может оказать негативное воздействие при неблагоприятном сочетании патогенных факторов.

В связи с этим изучение механизмов влияния нейронной активности на экспрессию *S100B* представляется актуальным для развития фундаментальных знаний о роли нейроглиальных взаимодействий в нейропластичности, а также может оказаться полезным для понимания патогенеза некоторых заболеваний. Для решения этого вопроса мы использовали модель долговременной потенциации – одного из ключевых физиологических механизмов памяти и обучения.

В своих экспериментах мы использовали протокол тетанизации (4 разряда с частотой 100 Гц длительностью 1 с, с интервалом 30 с), применявшийся ранее для изучения влияния тетанизации на динамику транскриптома в срезах зубчатой извилины мышей (Park et al., 2006). Преимуществом кратковременного режима стимуляции является сведение к минимуму интерференции волн экспрессии генов, запускаемых отдельными разрядами, что, из общих соображений, может облегчить анализ регуляторных молекулярных механизмов.

Тетанизация вызывала значительное увеличение амплитуды вызванных тестирующей стимуляцией п-спайков в поле CA1, которое сохранялось в течение всего времени наблюдения – 3 ч (рисунок 7). Это соответствует "поздней ДВП" (late-phase LTP), зависимой от белкового синтеза, в отличие от длящейся около 1 ч формы ДВП, индуцируемой в CA1 крыс одиночным тетанизирующим разрядом (Huang and Kandel, 1994).

Тетанизация коллатералей Шаффера достоверно увеличивала содержание мРНК как *S100B*, так и *S100A1* в поле CA1, по сравнению с контрольными интактными срезами, находившимися в той же камере, что и стимулированные срезы (рисунки 9, 12). При этом низкочастотная

стимуляция не влияла на экспрессию *S100* (рисунок 9), следовательно, наблюдаемые после индукции ДВП изменения экспрессии *S100B* и *S100A1* не связаны с механическим повреждением срезов электродами или неспецифическими эффектами электростимуляции, а зависят от определенного паттерна нейронной активности, необходимого для запуска процессов нейропластичности.

Таким образом, нам удалось получить модель ассоциированного с нейропластичностью изменения экспрессии генов *S100*, которая согласуется с неоднократно продемонстрированным эффектом увеличения количества белков *S100* в мозге при обучении (Hydén and Lange, 1970; Алексидзе и др., 1982; Громов и др., 1991; Шерстнев и др., 2001).

Отличие наших результатов от данных авторов, показавших снижение уровня мРНК *S100B* в срезах зубчатой извилины мышей через 30-120 мин после тетанизации перфорантного пути (Park et al., 2006) и в зубчатой извилине крыс через 6 часов после индуцированной каинатом судорожной активности (Nevroni et al., 1998), может свидетельствовать об особой регуляции гена *S100B* в зубчатой извилине, отличающейся как от CA1, так и от других отделов мозга, в которых наблюдается увеличение количества белка *S100B* не только после обучения, но и в активном контроле (Шерстнев и др., 2001).

Кроме того, эксперименты Park et al. (2006) проводились при пониженной (комнатной) температуре, что могло исказить динамику регуляторных процессов, а в экспериментах Nevroni et al. (1998) судорожная активность, в сочетании с действием каината, могла приводить к чрезмерно интенсивной, нефизиологичной активации глутаматных рецепторов, что, теоретически, также могло оказать негативное влияние на экспрессию *S100B*, поскольку зависимость физиологических процессов от интенсивности регулирующих воздействий часто имеет инвертированную U-образную форму. Например, деполяризация культивируемых нейронов с помощью добавления в среду KCl в концентрации 25-50 мМ увеличивает экспрессию

Bdnf, тогда как более высокие концентрации неэффективны (Tabuchi et al., 2000).

5.2. Экспрессия ранних генов как характеристика экспериментальной модели

На следующем этапе исследования мы попытались оценить возможный вклад в индукцию экспрессии генов *S100* транскрипционного фактора *Egr1* и комплекса AP-1, поскольку в гене *S100A1* крысы есть потенциальная AP-1-связывающая последовательность, а в промоторе *S100B* крысы – потенциальные сайты связывания *Egr1*. Активность этих транскрипционных факторов в значительной мере определяется уровнем их экспрессии, поэтому для оценки возможности участия транскрипционных факторов комплекса AP-1 (*Fos*, *Jun*, *JunB*) и *Egr1* в индукции экспрессии *S100* было проведено сравнение динамики мРНК указанных ранних генов и *S100*. При интерпретации полученных результатов необходима осторожность, поскольку динамика мРНК может не вполне соответствовать динамике белка. Кроме того, активность *Jun* зависит не только от количества белка, но и от его фосфорилирования (Турпаев, 2006).

Сходство динамики экспрессии *S100A1* и *JunB* (рисунок 11) указывает на перспективность более детального изучения роли *JunB* в регуляции гена *S100A1* при формировании ДВП. Участие *Fos* также представляется возможным, поскольку его белковый продукт, по-видимому, менее лабилен, чем мРНК, и характер их динамики может различаться. Kasahara et al. (2001), проводившие эксперименты в условиях, сходных с нашими (температура 30 °C, тетанизация: 2 серии стимулов (100 Гц, 1 с) с интервалом 20 с) наблюдали увеличение количества белка *Fos* в интервале от 30 до 60 мин после тетанизации.

Проведенное исследование экспрессии ранних генов может быть интересно также для оценки динамики регуляторных процессов. Учитывая

большое разнообразие экспериментальных протоколов, используемых для изучения ДВП, представляется актуальным поиск неких интегральных характеристик моделей, которые позволяли бы как-то оценивать возможность сопоставления результатов, получаемых разными авторами. Создание своеобразного "генетического паспорта" экспериментальной модели, содержащего информацию о динамике мРНК некоторых ключевых генов, выглядит перспективным подходом для решения этой задачи.

Fos, широко используемый в различных приложениях, в частности, как индикатор интенсивности нейронной активности, безусловно, относится к таким генам. Например, двухфазное изменение уровня мРНК *Fos* в наших экспериментах может быть связано с соответствующей динамикой фосфорилирования транскрипционного фактора CREB, являющегося активатором транскрипции *Fos* (Турпаев, 2006).

Было показано, что индукция ДВП в зубчатой извилине крыс *in vivo* сопровождается двухфазной активацией CREB (Schulz et al., 1999). Первый пик фосфорилирования CREB выявлялся иммуногистохимически в зубчатой извилине и СА1 через 30 мин после тетанизации перфорантного пути, общая продолжительность которой, как и в наших экспериментах, была около 2 мин. Через 1 ч pCREB почти полностью исчезал, а вторая волна фосфорилирования CREB начиналась через 2 ч. Аналогичное явление наблюдалось в срезах гиппокампа после тетанизации коллатералей Шаффера (Ahmed and Frey, 2005), хотя и с другими временными параметрами, что могло быть связано с различиями в продолжительности тетанизации. Поздняя фаза активации CREB зависит от белкового синтеза в фазе индукции ДВП (Ahmed and Frey, 2005), поэтому было бы интересно проверить, обладает ли таким же свойством вторая волна увеличения уровня мРНК *Fos*.

Высокая степень лабильности мРНК *Fos* (Турпаев, 2006), подтверждаемая и нашими экспериментами, указывает на важность детальной временной характеристики экспрессии генов при ДВП. Небольшая продолжительность первой волны увеличения экспрессии *Fos* может

объяснить некоторые кажущиеся противоречия в литературных данных. Так, например, Roberts et al. (1996) не выявили изменения уровня мРНК *Fos* через 45 мин после индукции ДВП в CA1, тогда как Kasahara et al. (2001) обнаружили увеличение количества белка Fos через 30 мин после тетанизации коллатералей Шаффера. По-видимому, отсутствие изменений экспрессии *Fos* в экспериментах Roberts et al. (1996) связано с "неудачным" выбором временной точки, а не является особенностью протокола стимуляции, как предположили авторы.

Увеличение экспрессии *Fos* (по крайней мере, первая волна) не проявляет критической зависимости от температуры срезов, поскольку наблюдается и при 26 °C (Park et al., 2006). В отличие от *Fos*, трансактивация *Egr1* демонстрирует температурную зависимость – экспрессия *Egr1* не изменялась после индукции ДВП в срезах при комнатной температуре (French et al., 2001a; Park et al., 2006), однако увеличивалась в экспериментах, проводившихся при температуре выше 30 °C (Mackler et al., 1992; Roberts et al., 1996; рисунок 10) или *in vivo* (Hevroni et al., 1998; Matsuo et al., 2000; French et al., 2001a; Ploski et al., 2010; Ryan et al., 2011).

Наконец, изменения экспрессии ранних генов зависят от интенсивности стимуляции и коррелируют с длительностью сохранения ДВП (Abraham et al., 1993), что также дает основание использовать их в качестве интегральной характеристики экспериментальных моделей ДВП.

5.3. Транскрипционный фактор p53 участвует в регуляции генов при формировании долговременной потенции

Дальнейший анализ экспрессии *S100* мы ограничили геном *S100B*, поскольку он является основным белком семейства S100 в мозге крыс (Baudier et al., 1985; Kuwano et al., 1987). Детальное изучение его экспрессии при формировании ДВП показало, что ключевые регуляторные события, определяющие ее динамику, приходятся на первые 40 мин после стимуляции.

Обращает на себя внимание тенденция к росту содержания мРНК *S100B* в интервале от 40 до 60 мин после тетанизации. Оценки уровня мРНК для этих временных точек, полученные в независимых экспериментах, достоверно не отличались, поэтому пока с большей уверенностью можно говорить скорее о некоторой задержке восстановления уровня, чем о двухфазном увеличении. Однако в любом случае это отклонение от экспоненциального снижения может свидетельствовать о включении разных механизмов регуляции экспрессии *S100B* на разных этапах потенциации. В качестве косвенного аргумента в пользу этого предположения можно рассматривать существование двух транскриптов крысиного *S100B*, не различаемых нашими праймерами, – NM_013191.1 и XM_008772868.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25742>), – синтез которых, по-видимому, управляется разными промоторами. В своей работе мы сконцентрировались на изучении ранней фазы индуцированной тетанизацией регуляции *S100B*.

Известно, что человеческий ген *S100B* активируется транскрипционным фактором p53 (Lin et al., 2004). Анализ последовательности промотора гена *S100B* крысы также показал наличие потенциальных p53-респонсивных элементов. Была проведена оценка ДНК-связывающей активности p53 при ДВП с помощью хроматиновой иммунопреципитации, и оказалось, что способность p53 связываться с промотором *S100B* значительно увеличивается после тетанизации (рисунок 13), причем с той же динамикой, что и увеличение уровня мРНК *S100B*.

Эксперименты с использованием ингибитора p53 пифитрина-β и активаторов p53 нутлина-3 и EX-527 подтвердили функциональность связывания p53 с промотором *S100B*. В то же время их результаты указывают на то, что p53 – не единственный фактор, отвечающий за усиление синтеза *S100B* при ДВП. Действительно, оба активатора p53 увеличивали уровень мРНК *S100B*, частично имитируя эффект тетанизации, однако тетанизация в их присутствии приводила к его дальнейшему значительному росту, а

ингибирование p53 сопровождалось неполной блокадой индуцированного тетанизацией увеличения экспрессии *S100B* (рисунок 14).

Таким образом, ДВП сопровождается временным увеличением активности транскрипционного фактора p53, что является одной из причин усиления синтеза *S100B*. Насколько нам известно, это первое прямое доказательство вовлечения p53 в регуляцию экспрессии генов при ДВП.

5.4. Молекулярная сеть, регулирующая активность p53 и экспрессию *S100B* при формировании ДВП

Анализ литературы показал, что, теоретически, существует масса возможностей контроля активности p53 со стороны молекулярной сети, вовлеченной в регуляцию процессов, связанных с формированием ДВП (рисунок 1).

Чтобы более детально выяснить механизмы регуляции *S100B*, мы изучили влияние ингибиторов различных элементов внутриклеточных регуляторных каскадов на индуцированную тетанизацией экспрессию *S100B*.

Оказалось, что Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые киназы играют ключевую роль в регуляции экспрессии *S100B* при ДВП. CaMK вовлечены в регуляцию транскрипции многими путями (Mellström et al., 2008; рисунок 6). Они стимулируют экспорт деацетилаз из ядра (Chawla et al., 2003), активируют протеинкиназу Akt (Yano et al., 1998) и MAP-киназные каскады (Takeda et al., 2002; Schmitt et al., 2005), регулирующие активность многих транскрипционных факторов, включая p53 (Zarubin and Han, 2005; Cho et al., 2005; Nayak and Cooper, 2012), а также непосредственно фосфорилируют транскрипционные факторы, в частности, CREB, играющий важную роль в индукции экспрессии генов при долговременной потенциации (Miyamoto, 2006). В культурах клеток было показано, что CREB, фосфорилированный кальмодулин-киназой IV в положении S133, может напрямую взаимодействовать с p53, увеличивая при этом его транскрипционную

активность (Arnould et al., 2002). Также в культурах клеток показано, что кальмодулин-киназы CHEK1 и DAPK1 активируют p53, фосфорилируя его в положении S20 (Craig et al., 2007).

Ингибирование MAP/ERK-киназного каскада, играющего важную роль в регуляции нейронных генов при ДВП, не влияло на уровень мРНК *S100B* (рисунок 17). Нельзя исключить, что блокада процесса активации MEK1 компенсировалась киназой MEK2, которая ингибируется более высокими концентрациями PD 98059 (IC_{50} 50 мкМ). Однако полученный результат согласуется с данными Kurino et al. (1995), показавшими, что аппликация глутамата не оказывает влияния на активность MAP/ERK киназ в культивируемых астроцитах, в отличие от нейронов.

Полученные результаты суммированы на рисунке 25. Глутаматные рецепторы NMDA-типа и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы играют ключевую роль в регуляции экспрессии *S100B*, индуцированной нейронной активностью, хотя вклад отдельных CaMK остается неясным. Локализация NMDAR также неясна. Присутствие в астроцитах функциональных NMDAR остается предметом дискуссий, и не исключено опосредованное влияние нейронных NMDAR на глию через секрецию ретроградных мессенджеров, например, BDNF. Кроме того, активация постсинаптических нейронных NMDAR приводит к увеличению внеклеточной концентрации калия и, как следствие, деполяризации пресинаптических терминалей и усилению выброса глутамата (Shih et al., 2013), что, в конечном счете, может приводить к увеличению внутриклеточной концентрации кальция в астроцитах, например, благодаря активности метаботропных рецепторов глутамата.

Еще одним источником кальция, активирующего синтез *S100B*, могут быть кальций-проводящие AMPA-рецепторы в нейро-глиальных синапсах (Bergles et al., 2010). Активность именно этих рецепторов опосредует формирование долговременной потенциации в синапсах между

коллатералиями Шаффера и глиальными клетками NG2-типа (Ge et al., 2006), в которых также экспрессируется *S100B*.

Протеинкиназы MAPK p38 и RSK2 также могут быть вовлечены в индукцию экспрессии *S100B*, тогда как участие MAPK/ERK киназы MEK1 представляется маловероятным, что ставит вопрос о путях активации RSK2, поскольку «типичный» путь предполагает посредничество именно MAPK/ERK (Romeo et al., 2012).

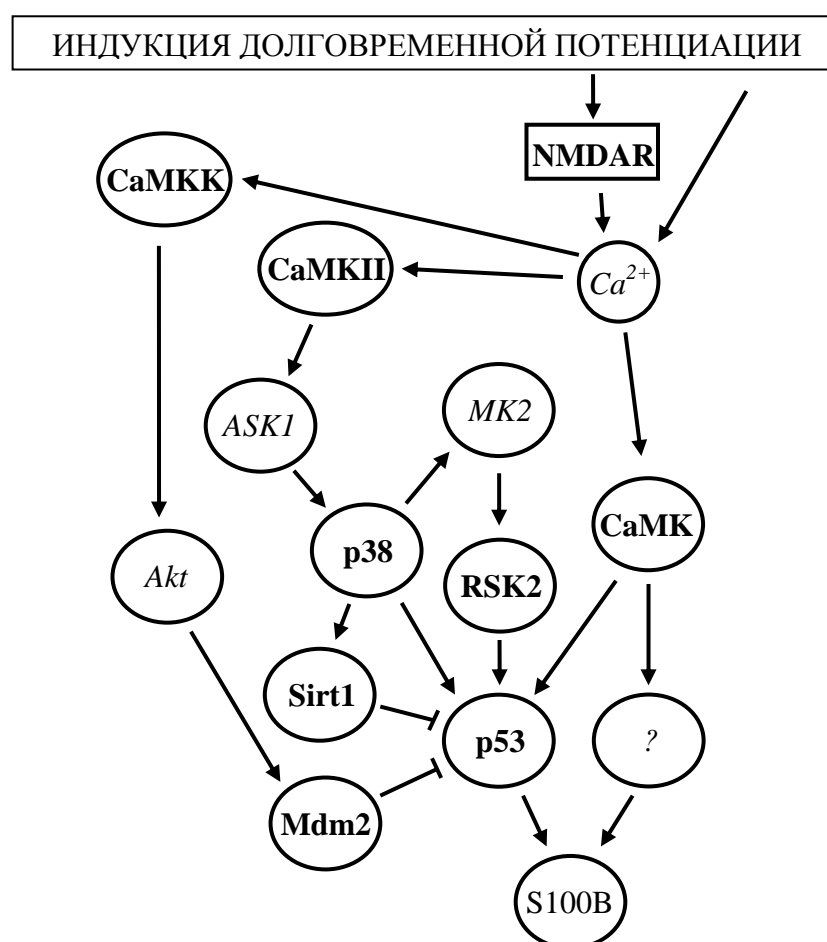


Рис. 25. Индукция экспрессии *S100B* при формировании ДВП.

Жирным шрифтом выделены факторы, ингибирование которых влияет на уровень мРНК *S100B*. Курсивом выделены предполагаемые посредники. MK2 – MAPK-activated protein kinase 2. Остальные обозначения, как на рисунке 6.

Существуют альтернативные пути регуляции RSK, например, в дендритных клетках RSK может активироваться через p38–MK2/3 (Romeo et al., 2012). Протеинкиназа MK2 экспрессируется также в микроглии, нейронах и астроцитах (Ghasemlou et al., 2010), поэтому можно предположить следующую последовательность регуляторных событий, приводящих к кальций-зависимой трансактивации гена *S100B*: CaMK–ASK1–p38–MK2–RSK2–p53–*S100B*. В то же время нельзя исключить, что влияние p38 и RSK на экспрессию *S100B* опосредуется не через p53, а через другие транскрипционные факторы.

Увеличение ДНК-связанной фракции p53 после тетанизации сопровождалось уменьшением его общего количества, хотя содержание мРНК *p53* в срезах не изменялось (рисунок 14), что может свидетельствовать о снижении скорости трансляции мРНК и/или ускоренной деградации белка p53 при формировании потенциации.

В культуре нейронов было показано, что синаптическая активность ведет к снижению уровней мРНК и белка *p53* (Lau and Bading, 2009), на основании чего авторы предположили, что уменьшение количества белка p53 вторично по отношению к изменению уровня мРНК. Нейронная активность в этих экспериментах индуцировалась блокадой рецепторов ГАМК_A в течение 30 мин, а первая исследованная временная точка приходилась на 2 ч после стимуляции. Наши результаты свидетельствуют о том, что уменьшение количества белка p53 может происходить уже через 20 мин после эпизода повышенной синаптической активности, возможно, в результате ускоренной деградации.

К важнейшим регуляторам p53 относятся убиквитинлигаза Mdm2 и деацетилазы, в частности, Sirt1. Mdm2 негативно модулирует транскрипционную активность, стабильность белка и трансляцию мРНК *p53* (Nag et al., 2013). Деацетилирование лизиновых остатков молекулы p53 снижает его активность и делает лизиновые остатки доступными для

убиквитинилирования, что приводит к экспорту p53 из ядра и последующей его деградации в протеасомах (Kuribayashi and El-Deiry, 2008).

В полном соответствии с этими данными, ингибирование Mdm2 или Sirt1 полностью предотвращало индуцированное тетанизацией снижение уровня белка p53 (рисунок 18). Таким образом, тандем Sirt1/Mdm2 играет ключевую роль в уменьшении количества белка p53 при индукции ДВП.

5.5. На пороге расшифровки p53-зависимого компонента транскрипционной программы ДВП

Увеличение активности p53 после индукции ДВП закономерно порождает ряд вопросов, решение которых может представлять существенный интерес для понимания транскрипционной программы нейропластичности. Происходит ли активация p53 только в астроцитах или также в нейронах, экспрессию каких генов успевают изменить p53, и какое влияние оказывают эти изменения на функционирование мозга? Мы попытались ответить на часть этих вопросов, а именно – оценить масштаб влияния p53 на динамику транскриптома при формировании ДВП. Для этой цели был использован набор праймеров "p53 Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array" (PARN-027Z; "Qiagen"), позволяющий измерять уровень мРНК 84-х генов, функционально связанных с p53, в том числе 50-ти генов, прямо или опосредованно регулируемых p53.

Результаты проведенного анализа согласуются с предположением о вовлечении p53 в регуляцию значительного количества генов при ДВП. В то же время необходимо принимать во внимание, что p53 – не единственная мишень Mdm2, ингибитором которой является использовавшийся для активации p53 нутлин-3. Mdm2 влияет также на активность других транскрипционных факторов (Biderman et al., 2012), например, p73, который является структурно-функциональным гомологом p53, причем некоторые гены регулируются обоими этими факторами (Yu et al., 2007). Как видно из

таблицы 5, уровень мРНК *Trp73* значительно увеличивается после тетанизации, что может указывать на его участие в контроле экспрессии генов при ДВП.

Следовательно, для подтверждения участия p53 в регуляции исследованных генов необходимы дополнительные исследования, включающие прямую оценку связывания p53 с респонсивными элементами с помощью хроматиновой иммунопреципитации. Необходимо также подтверждение функциональности обнаруженных изменений уровней мРНК с помощью анализа динамики количества соответствующих белковых продуктов.

Особое внимание в таблице 6 привлекает ген *Btg2*, продукт которого обладает нейропротекторными свойствами (Lau and Bading, 2009). Увеличение уровня его мРНК с редким постоянством воспроизводится в моделях ДВП (Park et al., 2006; Ploski et al., 2010; Ryan et al., 2011) и других моделях зависимой от нейронной активности экспрессии генов (Lau and Bading, 2009). При этом, поскольку данный ген регулируется транскрипционным фактором CREB, играющим важную роль в нейропластичности, увеличение экспрессии *Btg2* при ДВП *a priori* связывают именно с активностью CREB. Однако наши результаты свидетельствуют о сложной регуляции *Btg2* в ранней фазе ДВП, и существенным компонентом этой регуляции может являться p53.

Значительное количество совпадений предсказанных моделью типов p53-зависимой регуляции при формировании ДВП с экспериментальными данными, полученными в культурах клеток, наводит на мысль о том, что среди представленных в таблице 6 генов, для которых зависимость от p53 неизвестна, также имеются мишени p53. Чтобы оценить возможность прямой p53-зависимой регуляции указанных генов, мы изучили их последовательности и обнаружили в них потенциальные p53-респонсивные элементы (таблица 8).

В частности, такой сайт имеется в гене каспазы-9. Возможно, список напрямую активируемых фактором p53 генов каспаз, включающий на данный момент каспазы 1, 6 и 10 (Riley et al., 2008), со временем будет пополнен каспазой-9 – ключевым регулятором апоптоза (Kuribayashi and El-Deiry, 2008) и NMDA-зависимой синаптической депрессии (Li and Sheng, 2012).

Интересно, что каспаза-1 вовлечена в механизмы ДВП в поле CA1 гиппокампа в качестве фактора, ограничивающего рост синаптической эффективности (Lu et al., 2006). Как и в случае с каспазой-9 при депрессии, активность каспазы-1 при формировании ДВП уменьшает AMPAR-зависимый компонент постсинаптических токов.

Однако еще предстоит выяснить, зависит ли базальный уровень каспазы-1 в гиппокампе от p53 и меняется ли он после индукции ДВП. Park et al. (2006) сообщали о снижении количества мРНК *Casp1* в срезах зубчатой извилины гиппокампа мышей после тетанизации перфорантного пути, но наши результаты во многом расходятся с полученными ими данными. Например, ДВП в зубчатой извилине мышей сопровождалась уменьшением уровня мРНК *S100B*, *Casp2*, *Cdc25a*, *Cdkn2a*, *Dnmt1*, *Mdm4*, *Sirt1*, тогда как в наших экспериментах их количество увеличивалось.

Существенный интерес для оценки p53-зависимой регуляции каспаз при формировании ДВП представляет динамика экспрессии генов семейства *Bcl2*. Белки семейства *Bcl2* принимают участие в регуляции многих клеточных функций, включая апоптоз, дифференцировку, пролиферацию и синаптическую пластичность (Беляева и др., 2013; Kuribayashi and El-Deiry, 2008; Solá et al., 2012). В этом семействе более 20 белков, которые разделяются на две основные группы – проапоптозные (Bax, Bcl3/Puma, Pmaip1/Noxa и др.) и антиапоптозные (Bcl2, Mcl1 и др.) (Aouacheria et al., 2005). Они способны взаимодействовать друг с другом и с p53, регулируя проницаемость митохондриальной мембраны для цитохрома c и, как следствие, активность протеолитических ферментов, каспаз (Kuribayashi and

El-Deiry, 2008; Vaseva and Moll, 2009). Таким образом, баланс членов семейства Bcl2 в значительной мере определяет их активность.

Показано вовлечение белков семейства Bcl2 в механизмы долговременной синаптической депрессии, зависимой от рецепторов NMDA-типа (Li and Sheng, 2012). Кальций, входящий в постсинаптические нейроны, стимулирует протеинфосфатазы, что приводит к последовательной активации проапоптозных белков семейства Bcl2 – Bad и Bax. Последующая кратковременная активация каспаз, в конечном счете, вызывает эндоцитоз глутаматных рецепторов AMPA-типа и, как следствие, снижение эффективности синаптической передачи.

p53 может регулировать активность белков этого семейства как за счет прямых белок-белковых взаимодействий, так и благодаря своему влиянию на транскрипцию их генов. В частности, p53 активирует *Bax*, *Bbc3/Puma*, *Bid*, *Pmaip1/Noxa* и является репрессором для *Bcl2*.

Проведенный анализ показал, что после индукции ДВП происходят значительные сдвиги в паттерне экспрессии белков семейства Bcl2 (рисунки 22, 23), что может указывать на вероятное изменение характера регуляции активности каспаз при развитии долговременной потенциации. Сдвиг баланса белков в сторону проапоптозных представителей семейства, наряду с увеличением экспрессии каспазы-9, являющейся ключевым посредником между цитохромом с и эффекторными каспазами, может свидетельствовать об увеличении "предрасположенности" к индукции синаптической депрессии. То есть изменения экспрессии мишеней p53 могут интерпретироваться как проявление отрицательной обратной связи, предотвращающей чрезмерное усиление возбуждающих синапсов.

В то же время, происходившее после тетанизации увеличение уровня мРНК *Tnf* (таблицы 5 и 6), которое также частично было обусловлено влиянием нутлин-3-зависимого фактора, не вписывается в эту концепцию, поскольку секретируемый астроцитами TNF α усиливает возбуждающую

синаптическую передачу и ослабляет тормозную (Stellwagen and Malenka, 2006).

Физиологические последствия активации p53 при ДВП, равно как и воспроизводимость этого явления в условиях *in vivo*, ещё предстоит выяснить. В наших экспериментах ингибирование p53-зависимой транскрипции пифитрином- β не влияло на динамику ДВП в течение 4 ч после тетанизации. Возможно, изменение экспрессии мишеней p53 имеет более отдаленные последствия или же модулирует другие аспекты синаптической функции, например, кратковременную пластичность, которая коррелирует с активностью каспаз (Кудряшова и др., 2005). Секреция S100B влияет также на развитие гамма-осцилляций (Sakatani et al., 2008). Кроме того, многие мишени p53, включая S100B, регулируются при ДВП и другими факторами, которые, вероятно, способны достаточно эффективно компенсировать ингибирование p53. Наконец, необходимо принимать во внимание, что использованный нами подход позволял вести мониторинг эффективности только тех синапсов, которые участвовали в индукции потенциации. Между тем, индукция ДВП в одних синапсах пирамидного нейрона может снижать способность к потенциации других его синапсов. Причем важную роль в реализации этого явления, называемого гетеродендритной метапластичностью, по-видимому, играют астроциты (Jones, 2015), что позволяет предположить связь данного типа пластичности с увеличением уровня S100B, снижающего стабильность ДВП (Gerlai et al., 1995; Nishiyama et al., 2002).

Очевидно, роль p53 как собственно в синаптической пластичности, так и в "сопутствующих" процессах, например, в регуляции энергетического метаболизма и жизнеспособности клеток мозга, крайне сложна и многогранна, и для ее адекватного понимания еще предстоит проделать огромную работу. Индукция долговременной потенциации изменяет экспрессию широкого спектра p53-зависимых генов, однако вклад p53 в эти изменения значительно варьирует для разных мишеней. Одной из вероятных

причин такой избирательности мог бы являться специфический набор посттрансляционных модификаций p53 (в первую очередь, фосфорилирования и ацетилирования), приводящих к его активации при ДВП, поскольку взаимодействие p53 с разными промоторами в разной степени зависит от его конкретных модификаций (Lohrum and Scheidtmann, 1996).

Для установления профиля посттрансляционных модификаций p53 при формировании ДВП можно провести скрининг антител к различным фосфорилированным или ацетилированным формам p53. Такая работа проводится в настоящее время и, можно надеяться, позволит не только уточнить молекулярные механизмы зависимой от нейронной активности регуляции p53, но и выяснить клеточную локализацию активных форм p53.

Эта информация крайне важна, поскольку, как видно из предшествующего анализа, интерпретация результатов критически зависит от места происходящих при ДВП сдвигов экспрессии генов. Возможное ослабляющее действие регулируемых белками семейства Bcl2 каспаз на глутаматэргическую передачу предполагает их нахождение в постсинаптическом нейроне, тогда как TNF α -зависимое гомеостатическое усиление возбуждающей синаптической передачи в условиях пониженной нейронной активности обеспечивается глиальным пулом TNF α . В то же время пока можно с уверенностью говорить об активации p53 только в S100B-продуцирующих глиальных клетках, что, однако, еще не гарантирует увеличения экспрессии *Tnf* в этих же клетках. Таким образом, для оценки роли p53 необходимо изучение локализации не только активных форм p53, но также изменений экспрессии его конкретных мишеней.

Результаты экспериментов, проведенных на ограниченном наборе генов, свидетельствуют о том, что вклад p53 в регуляцию экспрессии генов при формировании ДВП может быть достаточно существенным. Поэтому было бы очень интересно продолжить исследование с использованием более мощного современного метода анализа транскриптома —

высокопроизводительного секвенирования, которое позволяет оценить количество всех имеющихся в образце транскриптов, а не заранее определенного набора, как в случае использования ПЦР или ДНК-микрочипов. Это позволило бы получить максимально полную картину вовлечения p53 и его мишеней в транскрипционную программу нейропластичности.

Более того, реализованный нами подход, по-видимому, перспективен для предварительной идентификации еще неизвестных мишеней p53, что может оказаться полезно не только для нейрофизиологии, но и для других областей биологии, изучающих p53-зависимые процессы, такие как канцерогенез, клеточное деление и дифференцировку, репарацию ДНК. Действительно, отдельное действие тетанизации или активатора p53 – нутлина-3 – на экспрессию генов крайне слабо коррелировало с известными типами зависимости генов от p53. Однако сравнение действия этих двух относительно неспецифичных активаторов экспрессии генов, несмотря на очевидную упрощенность проведенного анализа, позволило выявить в их эффектах общий компонент, который с высокой степенью вероятности связан с активацией p53. При этом некоторые гены, экспрессия которых при ДВП регулировалась нутлин-3-зависимым фактором, не идентифицированы как p53-зависимые, но в их последовательности присутствуют потенциальные p53-связывающие сайты, что может указывать на перспективность дальнейшего исследования связи этих генов с p53.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия генов играет важную роль в нейропластичности. Обычно рассмотрение этого вопроса ограничивается процессами, происходящими в нейронах. Между тем, выделяющиеся при активации синапсов нейромедиаторы изменяют секрецию многих глиальных продуктов, модулирующих синаптическую передачу, включая не только низкомолекулярные транмиттеры, но и белковые молекулы, такие как цитокины и ростовые факторы, однако роль генетического аппарата глии в этих изменениях практически неизвестна.

В частности, обучение у крыс сопровождается увеличением содержания в гиппокампе белков *S100*, участвующих в регуляции многих клеточных функций, включая синаптическую передачу. Механизм этого явления оставался неисследованным. Особый интерес к физиологической регуляции экспрессии *S100B*, синтезирующегося преимущественно в астроцитах, связан с его вовлечением в некоторые заболевания мозга.

Нам удалось воспроизвести эффект ассоциированного с нейропластичностью увеличения экспрессии генов *S100B/A1* на модели долговременной потенциации, которая считается физиологическим механизмом, лежащим в основе обучения и памяти. Тесная связь между индукцией ДВП и экспрессией *S100B/A1* подтверждается отсутствием увеличения уровня их мРНК после низкочастотной стимуляции, не вызывавшей изменений синаптической эффективности.

Впервые был представлен достаточно широкий набор экспериментальных доказательств, позволяющий с уверенностью говорить о том, что регуляция экспрессии специфичного для глии гена *S100B* при формировании ДВП осуществляется на уровне транскрипции. Количество белка *S100B* следовало динамике его мРНК, а содержание мРНК *S100B* изменялось синхронно со связыванием транскрипционного фактора p53 с промотором *S100B*. Кроме того, ингибитор p53-зависимой транскрипции

пифитрин- β существенно подавлял рост уровня мРНК *S100B* после тетанизации. Таким образом, индукция долговременной посттетанической потенциации способна динамически изменять активность глиальных генов и, тем самым, уровень секреции глиальных белковых факторов, которые в режиме обратной связи модулируют нейронные функции.

Проведенные исследования позволяют дополнить имеющиеся представления об экспрессии генов при формировании ДВП изображенной на рис. 26 схемой. Вызванное тетанизацией увеличение содержания мРНК *S100B* зависит от глутаматных рецепторов NMDA-типа и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ. В то же время MAP/ERK-киназный каскад, играющий важную роль в регуляции нейронных генов при потенциации, не влияет на динамику мРНК *S100B* в этих условиях.

Одним из транскрипционных факторов, определяющих динамику увеличения содержания мРНК *S100B*, оказался p53, широко известный в качестве ключевого регулятора системы апоптоза. Это первое свидетельство вовлечения p53 в контроль транскрипции при индукции долговременной потенциации. Таким образом, полученные результаты поддерживают наметившуюся в последнее десятилетие тенденцию к переоценке роли p53 как гораздо более универсального фактора, вовлеченного в регуляцию разнообразных клеточных функций (Vousden and Prives, 2009; Maddocks and Vousden, 2011; Itahana et al., 2015), к числу которых, по-видимому, следует отнести и организацию нейроглиального взаимодействия в рамках нейропластических процессов взрослого организма.

Следует подчеркнуть, что при проведении биохимических анализов поле CA1 отделялось от зубчатой извилины, для которой поддержание баланса между делением нейронных стволовых клеток и апоптозом остается актуальным в постнатальном онтогенезе. Следовательно, обнаруженные закономерности действительно не связаны с апоптозом или дифференцировкой стволовых клеток, а представляют собой достаточно

универсальный механизм контроля генетической экспрессии со стороны нейронной активности.

Роль p53 в процессах, сопровождающих формирование ДВП, по-видимому, не ограничивается трансактивацией *S100B*, изменяется также экспрессия некоторых других мишеней p53. Результаты анализа взаимодействия влияний активатора p53 нутлина-3 и тетанизации на экспрессию генов (раздел 4.8) указывают на существенный вклад p53 в динамику экспрессии, по крайней мере, некоторых его мишеней при формировании ДВП.

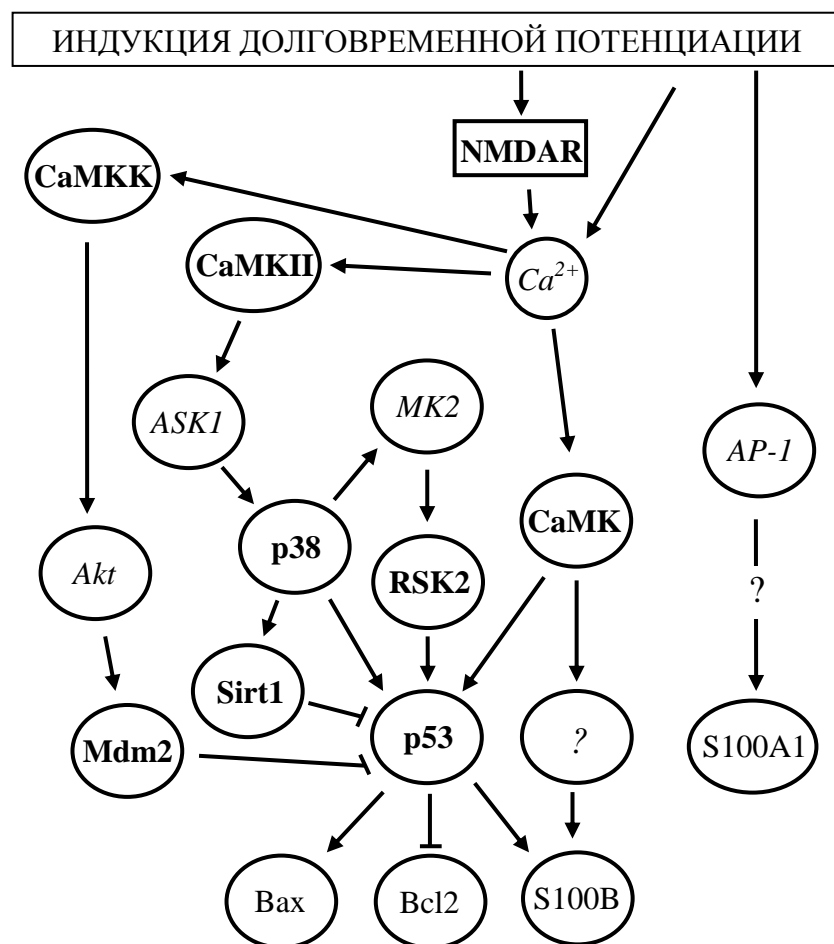


Рис. 26. Регуляция экспрессии генов семейств *S100* и *Bcl2* при формировании долговременной потенции в поле CA1 гиппокампа.

Жирным шрифтом выделены факторы, ингибиторы которых использовались в экспериментах, курсивом – вероятные посредники.

Интересный результат проведенного анализа – выявление скрытой регуляции генов: уровень мРНК некоторых генов не изменялся после индукции ДВП в нормальном физиологическом растворе, однако в присутствии нутлина-3 тетанизация существенно меняла экспрессию этих генов. Следовательно, постоянство экспрессии в норме может быть обусловлено балансом разнонаправленных влияний, индуцируемых тетанизацией. Таким образом, обычно реализуемый в исследованиях динамики транскриптома при ДВП подход, при котором анализ мРНК проводится без манипулирования активностью транскрипционных факторов, не дает полной картины регуляторных процессов, запускаемых при формировании ДВП.

В контексте нейропластичности существенный интерес представляет выявленная динамика экспрессии генов семейства *Bcl2*. Если обнаруженные сдвиги происходят не только в глии, но и в нейронах, то, принимая во внимание известную роль элементов системы апоптоза (каспаз, белков семейства *Bcl2*) в долговременной синаптической депрессии (Li and Sheng, 2012), можно предположить, что в данной ситуации система апоптоза выступает в качестве элемента механизма синаптического шкалирования (Балашова и др., 2013), назначение которого – предотвратить предельное увеличение эффективности возбуждающих синаптических связей, ведущее к ограничению дальнейшего участия синапсов в сохранении новой информации и повышению риска развития судорожной активности. Одним из проявлений работы этого механизма может быть гетеродендритная метапластичность – явление, при котором потенциация одних синапсов нейрона препятствует последующей потенциации других (Jones, 2015).

Возможно, S100B в нормальных условиях также вовлечен в подобный механизм стабилизации работы нервной системы. Кроме того, в физиологических концентрациях S100B обладает трофическими свойствами. Позитивное влияние на жизнеспособность нейронов может оказывать и продукт гена *Btg2* (Lau and Bading, 2009), экспрессия которого также увеличивается при ДВП, по-видимому, отчасти p53-зависимым путем. Таким

образом, происходящее при ДВП увеличение экспрессии мишеней p53, таких как *S100B* и *Btg2*, наряду с уменьшением количества самого белка p53, может опосредовать нейропротекторные и трофические эффекты нейронной активности.

Среди перспектив дальнейшей разработки проблемы связи нейропластичности и генной экспрессии можно выделить несколько направлений. Во-первых, необходимо выяснить, в какой мере выявленные закономерности относятся к условиям *in vivo*. Происходит ли активация p53 в мозге при обучении или каких-либо других формах функциональной нагрузки? Какова динамика этого процесса, как быстро восстанавливается уровень белка p53 после ускоренной деградации? Насколько существенна при этом роль p53 в увеличении содержания S100B в мозге?

Важным представляется вопрос о клеточной специфичности активации p53 при ДВП. Является ли этот феномен особенностью S100B-продуцирующих глиальных клеток или имеет место также в нейронах и микроглии? Для решения как этого, так и части вопросов первой группы необходимо изучить характер посттрансляционных модификаций p53 в ранней фазе ДВП, что могло бы дать возможность иммуногистохимической визуализации активных форм p53.

Наконец, проведенный анализ указывает на перспективность более детального исследования вклада p53 в транскрипционную программу ДВП, что подразумевает уточнение роли p53 (с помощью хроматиновой иммунопреципитации и манипуляций с активностью p53) и более полный охват транскриптома (например, с использованием высокопроизводительного секвенирования). Дальнейшее изучение роли p53 и его мишеней в нейропластичности может стать важным вкладом в расшифровку молекулярных основ памяти и предложить новые пути для разработки средств адресного управления пластичностью и сопряженными с ней метаболическими и трофическими процессами как в исследовательских, так и терапевтических целях.

ВЫВОДЫ

1. Разработана и охарактеризована экспериментальная модель ассоциированного с нейропластичностью увеличения экспрессии специфичного для глии гена *S100B* и гена *S100A1* в условиях *in vitro*. Индукция ДВП в поле CA1 срезов гиппокампа крыс сопровождается увеличением количества мРНК и белка *S100B* и мРНК *S100A1*.
2. Экспрессия *S100B* и *S100A1* избирательно модулируется паттерном нейронных разрядов. Показана ее зависимость от частотных характеристик нейронной активности: высокочастотная стимуляция изменяет уровень мРНК *S100B* и *S100A1*, тогда как низкочастотная не оказывает влияния.
3. Связанная с индукцией ДВП экспрессия *S100B* контролируется глутаматными рецепторами NMDA-типа, Ca²⁺/кальмодулин-зависимыми протеинкиназами, протеинкиназами RSK и MAPK p38 и не зависит от активности MAP/ERK-киназного каскада. Базальный уровень мРНК *S100B* ограничивается деацетилазой Sirt1 и убиквитинлигазой Mdm2.
4. Впервые показано участие p53 в регуляции транскрипции при индукции долговременной потенциации: связывание p53 с промотором гена *S100B* является одним из факторов, определяющих динамику мРНК *S100B* в ранней фазе потенциации.
5. Активация p53 при ДВП сопровождается уменьшением количества белка p53. Тандем Sirt1/Mdm2 играет ключевую роль в деградации p53 при ДВП.
6. В ранней фазе долговременной потенциации экспрессия генов-мишеней p53 *Bax*, *Bcl2*, *Btg2*, *Ccnb1*, *Check2*, *Dapk1*, *Gadd45a*, *Prkca* и *Pten* регулируется нутлин-3-зависимым фактором (предположительно – p53).
7. Избирательность вызванных тетанизацией сдвигов экспрессии генов-мишеней p53 обеспечивается многообразием вовлеченных в процесс факторов. Гены *Apa1*, *Bbc3*, *Bid*, *Cdkn1a*, *Dnmt1*, *Egfr*, *Egr1*, *Mdm2*, *Mlh1*, *Pcna* и *Trp73* регулируются преимущественно p53-независимым путем. *Ccnb1*, *Check2*, *Dapk1* и *Prkca* находятся под разнонаправленным, а *S100B* и

Btg2 – однонаправленным контролем со стороны нутлин-3-зависимого и -независимого факторов.

8. Увеличение экспрессии *S100B* и *Btg2* указывает на вероятное нейротрофическое и нейропротекторное значение кратковременной активации p53 при индукции ДВП. Рост уровня S100B, наряду с изменением баланса Вах и Bcl2, возможно, обеспечивает также развитие метапластичности, предотвращающей чрезмерное усиление возбуждающих синапсов.
9. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что при формировании долговременной потенциации синаптической передачи генетический аппарат астроцитов оказывается вовлеченным в механизм нейроглиального взаимодействия, отвечающего за тонкую настройку синаптических связей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ДВП – долговременная потенция
- ДМСО – диметилсульфоксид
- НС – низкочастотная стимуляция
- пВПСП – полевой возбуждающий постсинаптический потенциал
- п-спайк – популяционный спайк
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РАГ – регулируемые активностью гены
- РЕ – респонсивный элемент
- ЦНС – центральная нервная система
- АМРА – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
- AMPA – глутаматные рецепторы AMPA-типа
- AP-1 – activating protein-1
- Arc – activity-regulated cytoskeleton-associated protein
- BDNF – brain-derived neurotrophic factor
- CaMK – Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase
- CaMKK – CaMK kinase
- CaRE – calcium-responsive element
- CaRF – calcium-response factor
- CBP – CREB-binding protein
- C/EBP – CCAAT/enhancer binding protein
- Chk1 – checkpoint kinase 1
- CRE – cAMP-responsive element
- CREB – cAMP-responsive element binding protein
- CREM – cAMP-responsive element modulator
- Dapk1 – death-associated protein kinase 1
- DRE – downstream regulatory element
- DREAM – downstream regulatory element antagonist modulator
- Egr – early growth response
- ERK – extracellular signal-regulated kinase

FAK – focal adhesion kinase
GSK3 – glycogen synthase kinase-3
IL-1 β – interleukin 1 β
IL-1ra – IL-1 receptor antagonist
IL-6 – interleukin 6
KChIP3 – K-channel-interacting protein 3
MAPK – mitogen-activated protein kinase
Mdm2 – murine double minute 2
MEK – MAPK/ERK kinase
MK – MAPK-activated protein kinase
MLCK – myosin light chain kinase
MSK – mitogen- and stress-activated kinase
NF κ B – nuclear factor κ B
NMDA – N-метил-D-аспаратат
NMDAR – глутаматные рецепторы NMDA-типа
pCREB – фосфо-CREB
PEA-15 – phosphoprotein enriched in astrocytes, 15 kDa
PKA – протеинкиназа А
PKC – протеинкиназа С
p53-PE – p53-респонсивный элемент
RAGE – receptor for advanced glycation endproducts
RSK – 90 kDa ribosomal S6 kinase
SOX9 – SRY (sex determining region Y)-box 9
TNF α – tumour necrosis factor α
Trk – тирозинкиназные рецепторы нейротрофинов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексидзе, Н.Г. К вопросу о специфичности белка S-100 в процессах обучения и памяти / Н.Г. Алексидзе, Г.А. Бережной, В.О. Никурадзе // Нейрохимия. – 1982. – Т. 1. – № 1. – С. 43-50.
2. Анохин, К.В. Молекулярная генетика памяти: когнитивная регуляция экспрессии генов в мозге при обучении // В книге: Успехи функциональной нейрохимии: сборник статей / К.В. Анохин; под ред. С.А. Дамбиновой, А.В. Арутюняна. – СПб.: Изд-во С.-Петербургского университета, 2003. – С. 33-45.
3. Анохин, К.В. Обучение и память в молекулярно-генетической перспективе // В книге: Двенадцатые сеченовские чтения / К.В. Анохин. – М.: Диалог-МГУ, 1996. – С. 23-65.
4. Анохин, К.В. Психофизиология и молекулярная генетика мозга // В книге: Психофизиология: учебник для вузов / К.В. Анохин; под ред. Ю.И. Александрова. – 2-е изд., доп. – СПб.: Питер, 2001. – С. 407-427.
5. Балашова, А.Н. Формы и механизмы гомеостатической синаптической пластичности / А.Н. Балашова, А.Э. Дитятев, И.В. Мухина // Современные технологии в медицине. – 2013. – Т. 5. – № 2. С. – 98-107.
6. Беляева, Ю.С. Ингибирование Vcl-2 стимулирует пролиферацию нейрональных клеток-предшественников в органотипической культуре гиппокампа мышей / Ю.С. Беляева, Л.С. Никитина, Е.В. Черниговская, М.В. Глазова // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99. – № 8. – С. 976-983.
7. Бериташвили, И.С. Память позвоночных животных, ее характеристика и происхождение / И.С. Бериташвили. – М.: Наука, 1974. – 212 с.
8. Виноградова, О.С. Нейронаука конца второго тысячелетия: смена парадигм / О.С. Виноградова // Журн. высш. нервн. деят. – 2000. – Т. 50. – № 5. – С. 743-774.

9. Годухин, О.В. Клеточно-молекулярные механизмы киндинга / О.В. Годухин // Усп. физиол. наук. – 2005. – Т. 36. – № 2. – С. 41-54.
10. Гринкевич, Л.Н., Васильев, Г.В. Возможные молекулярно-клеточные механизмы регуляции экспрессии генов при обучении / Л.Н. Гринкевич, Г.В. Васильев // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1999. – Т. 85. – № 1. – С. 48-66.
11. Громов, Л.А. Функциональная роль нейроспецифического белка S-100 в процессах памяти / Л.А. Громов, Л.П. Сыроватская, Г.В. Овинова // Журн. высш. нервн. деят. – 1991. – Т. 41. – № 1. – С. 60-65.
12. Гуляева, Н.В. "Апоптотические" ферменты в пластичности нормального мозга: каспаза-3 и длительная потенция / Н.В. Гуляева // Журн. высш. нервн. деят. – 2004. – Т. 54. – № 4. – С. 437-447.
13. Данилова, А.Б. Сравнительные исследования MAPK/ERK-зависимого ацетилирования белков в ЦНС взрослых и ювенильных *Helix* при формировании долговременной памяти / А.Б. Данилова, П.Д. Лисачев, Л.Н. Гринкевич // Информационный вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14. – № 2. – С. 312-319.
14. Капай, Н.А. Донепезил устраняет ингибирующее влияние β -амилоидного пептида (1-42) на длительную потенцию в гиппокампе / Н.А. Капай, Е.И. Солнцева, В.Г. Скребицкий // Бюл. эксп. биол. и мед. 2010. – Т. 149. – № 1. – С. 38-41.
15. Кичигина, В.Ф. Функциональные характеристики коллатералей Шаффера в экспериментах *in vivo* и *in vitro* / В.Ф. Кичигина // Нейрофизиология (Киев). – 1979. – Т. 11. – № 3. – С. 208-217.
16. Клементьев, Б.И. Выработка условного рефлекса пассивного избегания и обновления белков 14-3-2 и S-100 в гиппокампе крыс / Б.И. Клементьев, Л.Н. Гринкевич, Т.С. Глущенко, В.С. Репин, Л.З. Певзнер // Докл. АН СССР. – 1975. – Т. 221. – № 1. – С. 243-246.
17. Кудряшова, И.В. Длительная потенция в гиппокампе при ингибировании каспазы-3: анализ фасилитации при парной стимуляции /

- И.В. Кудряшова, И.Е. Кудряшов, Н.В. Гуляева // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2005. – Т. 91. – № 8. – С. 915-926.
18. Меркулова, Т.И. Регуляторные коды транскрипции геномов эукариот / Т.И. Меркулова, Е.А. Ананько, Е.В. Игнатьева, Н.А. Колчанов // Генетика. – 2013. – Т. 49. – № 1. – С. 37-54.
19. Митюшов, М.И. Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрхимического исследования / М.И. Митюшов, Н.А. Емельянов, А.А. Мокрушин, И.А. Войнер, Т.Р. Багаева; под ред. М.И. Митюшова. – Л.: Наука, 1986. – 127 с.
20. Мотин, В.Г. Влияние антител против белка S100B на синаптическую передачу и долговременную потенциацию нейронов области СА1 гиппокампа крысы / В.Г. Мотин, В.П. Никитин, В.В. Шерстнев // Бюл. экп. биол. и мед. – 2002. – Т. 133. – № 2. – С. 132-135.
21. Скребицкий, В.Г., Чепкова, А.Н. Синаптическая пластичность в аспекте обучения и памяти / В.Г. Скребицкий, А.Н. Чепкова // Усп. физиол. наук. – 1999. – Т. 30. – № 4. – С. 3-13.
22. Скребицкий В.Г., Штарк М.Б. Фундаментальные основы пластичности нервной системы / В.Г. Скребицкий, М.Б. Штарк // Вестник РАМН. – 2012. – № 9. – С. 39-44.
23. Соколов, Е.Н. Механизмы памяти / Е.Н. Соколов. – М.: Изд-во Московского университета, 1969. – 176 с.
24. Старостина, М.В., Свиридов, С.М. Взаимодействие различных фракций нейроспецифического белка S-100 с кальцием / М.В. Старостина, С.М. Свиридов // Мол. биол. (Москва). – 1978. – Т. 12. – № 2. – С. 372-376.
25. Траилин, А.В., Левада, О.А. Белок S100B: нейробиология, значение при неврологической и психиатрической патологии / А.В. Траилин, О.А. Левада // Международный неврологический журнал. – 2009. – № 1. – С. 166-175.

26. Турпаев, К.Т. Роль фактора транскрипции AP-1 в интеграции внутриклеточных сигнальных систем / К.Т. Турпаев // Молекулярная биологии. – 2006. – Т. 40. – № 6. – С. 945-961.
27. Чепкова, А.Н. Фрагмент аргинин-вазопрессина АВП4-9 облегчает индукцию длительной потенциации в гиппокампе / А.Н. Чепкова, Н.А. Капай, В.Г. Скребницкий // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2001. – Т. 131. – № 2. – С. 167-169.
28. Черноризов, А.М. Глия: морфология, физиология и функции // В книге: НЕЙРОН: Обработка сигналов, Пластичность. Моделирование : фундаментальное руководство / А.М. Черноризов; под ред. Е.Н. Соколова, В.А. Филиппова, А.М. Черноризова. – Тюмень: Компания Мир, Тюменский государственный университет, 2008. – С. 433-467.
29. Шерстнев, В.В. Гетерохрония участия нейротрофических факторов в нейрхимической организации процессов обучения и памяти в зрелом организме / В.В. Шерстнев, М.А. Грудень, З.И. Сторожева, А.Т. Прошин // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87. – № 6. – С. 752-761.
30. Штарк, М.Б. Мозгоспецифические белки (антигены) и функции нейрона / М.Б. Штарк. – М.: Медицина, 1985. – 310 с.
31. Abraham, W.C. The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation / W.C. Abraham, M. Dragunow, W.P. Tate // Mol. Neurobiol. – 1991. – V. 5. – N 2-4. – P. 297-314.
32. Abraham, W.C. Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation / W.C. Abraham, S.E. Mason, J. Demmer, J.M. Williams, C.L. Richardson, W.P. Tate, P.A. Lawlor, M. Dragunow // Neuroscience. – 1993. – V. 56. – N 3. – P. 717-727.
33. Abraham, W.C., Williams, J.M. LTP maintenance and its protein synthesis-dependence / W.C. Abraham, J.M. Williams // Neurobiol. Learn. Mem. – 2008. – V. 89. – P. 260-268.
34. Abraham, W.C., Williams, J.M. Properties and mechanisms of LTP maintenance / W.C. Abraham, J.M. Williams // Neuroscientist. – 2003. – V. 9. – P. 463-474.

35. Ackermann, G.E. S100A1-deficient male mice exhibit increased exploratory activity and reduced anxiety-related responses / G.E. Ackermann, I. Marenholz, D.P. Wolfer, W.Y. Chan, B. Schäfer, P. Erne, C.W. Heizmann // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1763. – N 11. – P. 1307-1319.
36. Adachi, M. Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer / M. Adachi, M. Fukuda, E. Nishida // *EMBO J.* – 1999. – V. 18. – P. 5347-5358.
37. Adami, C. S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain / C. Adami, R. Bianchi, G. Pula, R. Donato // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1742. – P. 169-177.
38. Adami, C. S100B expression in and effects on microglia / C. Adami, G. Sorci, E. Blasi, A.L. Agneletti, F. Bistoni, R. Donato // *Glia.* – 2001. – V. 33. – P. 131-142.
39. Agranoff, B.W. Agents that block memory. In: *The Neurosciences: A Study Program* (G.C. Quarton, T. Melnechuk, F.O. Schmitt, eds.) / B.W. Agranoff. – New York: Rockefeller Univ. Press, 1967. – P. 756-764.
40. Ahmed, T., Frey, J.U. Plasticity-specific phosphorylation of CaMKII, MAP-kinases and CREB during late-LTP in rat hippocampal slices in vitro / T. Ahmed, J.U. Frey // *Neuropharmacology.* – 2005. – V. 49. – N 4. – P. 477-492.
41. Aicardi, G. Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor / G. Aicardi, E. Argilli, S. Cappello, S. Santi, M. Riccio, H. Thoenen, M. Canossa // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101. – P. 15788-15792.
42. Aid, T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited / T. Aid, A. Kazantseva, M. Piirsoo, K. Palm, T. Timmusk // *J. Neurosci. Res.* – 2007. – V. 85. – P. 525-535.
43. Albenis, B.C., Mattson, M.P. Evidence for the involvement of TNF and NF- κ B in hippocampal synaptic plasticity / B.C. Albenis, M.P. Mattson // *Synapse.* – 2000. – V. 35. – N 2. – P. 151-159.

44. Alberini, C.M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? / C.M. Alberini // *Trends Neurosci.* – 2005. – V. 28. – P. 51-56.
45. Alberini, C.M. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism / C.M. Alberini // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2008. – V. 89. – P. 234-246.
46. Alberini, C.M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity / C.M. Alberini // *Physiol. Rev.* – 2009. – V. 89. – P. 121-145.
47. Alberini, C.M., Kandel, E.R. The regulation of transcription in memory consolidation / C.M. Alberini, E.R. Kandel // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2014. V. 7. – N 1. – a021741.
48. Aleksovskaja, K. Systematic review and meta-analysis of circulating S100B blood levels in schizophrenia / K. Aleksovskaja, E. Leoncini, S. Bonassi, A. Cesario, S. Boccia, A. Frustaci // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – N 9. – e106342.
49. Alessi, D.R. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo / D.R. Alessi, A. Cuenda, P. Cohen, D.T. Dudley, A.R. Saltiel // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – N 46. – P. 27489-27494.
50. Alger, B.E., Teyler, T.J. Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3, and dentate regions of the rat hippocampal slice / B.E. Alger, T.J. Teyler // *Brain Res.* – 1976. – V. 110. – N 3. – P. 463-480.
51. Allore, R.J. Cloning and expression of the human S100 β gene / R.J. Allore, W.C. Friend, D. O'Hanlon, K.M. Neilson, R. Baumal, R.J. Dunn, A. Marks // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V. 265. – P. 15537-15543.
52. Altar, C.A. Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways / C.A. Altar, P. Laeng, L.W. Jurata, J.A. Brockman, A. Lemire, J. Bullard, Y.V. Bukhman, T.A. Young, V. Charles, M.G. Palfreyman // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – P. 2667-2677.

53. Angel, P., Karin, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation / P. Angel, M. Karin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – V. 1072. – P. 129-157.
54. Angeloni, S.V. Regulation of estrogen receptor-alpha expression by the tumor suppressor gene p53 in MCF-7 cells / S.V. Angeloni, M.B. Martin, P. Garcia-Morales, M.D. Castro-Galache, J.A. Ferragut, M. Saceda // *J. Endocrinol.* – 2004. – V. 180. – P. 497-504.
55. Anokhin, K.V. Effects of early experience on c-fos gene expression in the chick forebrain / K.V. Anokhin, R. Mileusnic, I.Y. Shamakina, S.P. Rose // *Brain Res.* – 1991. – V. 544. – P. 101-107.
56. Aouacheria, A. Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators / A. Aouacheria, F. Brunet, M. Gouy // *Mol. Biol. Evol.* – 2005. – V. 22. – N 12. – P. 2395-2416.
57. Araque, A. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner / A. Araque, V. Parpura, R.P. Sanzgiri, P.G. Haydon // *Trends Neurosci.* – 1999. – V. 22. – N 5. – P. 208-215.
58. Arnould, T. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation / T. Arnould, S. Vankoningsloo, P. Renard, A. Houbion, N. Ninane, C. Demazy, J. Remacle, M. Raes // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – N 1-2. – P. 53-63.
59. Astrand, R. Clinical use of the calcium-binding S100B protein / R. Astrand, J. Undén, B. Romner // *Methods Mol Biol.* – 2013. – V. 963. – P. 373-384.
60. Badie, C. Repression of CDK1 and other genes with CDE and CHR promoter elements during DNA damage-induced G(2)/M arrest in human cells / C. Badie, J.E. Itzhaki, M.J. Sullivan, A.J. Carpenter, A.C. Porter // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – V. 20. – P. 2358-2366.
61. Bading, H. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways / H. Bading, D.D. Ginty, M.E. Greenberg // *Science.* – 1993. – V. 260. – P. 181-186.

62. Bain, J. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update / J. Bain, L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C.J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klevernic, J.S. Arthur, D.R. Alessi, P. Cohen // *Biochem. J.* – 2007. – V. 408. – N 3. – P. 297-315.
63. Balkowiec, A., Katz, D.M. Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons / A. Balkowiec, D.M. Katz // *J. Neurosci.* – 2002. – V. 22. – P. 10399-10407.
64. Balschun, D. Interleukin-6: a cytokine to forget / D. Balschun, W. Wetzel, A. del Rey, F. Pitossi, H. Schneider, W. Zuschratter, H.O. Besedovsky // *FASEB J.* – 2004. – V. 18. – N 14. – P. 1788-1790.
65. Balschun, D. Does cAMP response element-binding protein have a pivotal role in hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory? / D. Balschun, D.P. Wolfer, P. Gass, T. Mantamadiotis, H. Welzl, G. Schutz, J.U. Frey, H.P. Lipp // *J. Neurosci.* – 2003. – V. 23. – P. 6304-6314.
66. Baptiste-Okoh, N. Caspase 2 is both required for p53-mediated apoptosis and downregulated by p53 in a p21-dependent manner / N. Baptiste-Okoh, A.M. Barsotti, C. Prives // *Cell Cycle.* – 2008. – V. 7. – N 9. – P. 1133-1138.
67. Barco, A. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture / A. Barco, J.M. Alarcon, E.R. Kandel // *Cell.* – 2002. – V. 108. – P. 689-703.
68. Barco, A. Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture / A. Barco, S. Patterson, J.M. Alarcon, P. Gromova, M. Mata-Roig, A. Morozov, E.R. Kandel // *Neuron.* – 2005. – V. 48. – P. 123-137.
69. Barger, S.W., Van Eldik, L.J. S100 β stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells / S.W. Barger, L.J. Van Eldik // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – N 14. – P. 9689-9694.
70. Baudier, J. Rat brain S-100b protein: purification, characterization, and ion binding properties. A comparison with bovine S-100b protein / J. Baudier, G. Labourdette, D. Gerard // *J. Neurochem.* – 1985. – V. 44. – P. 76-84.

71. Bellinger, F.P. Interleukin 1 β inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus / F.P. Bellinger, S. Madamba, G.R. Siggins // *Brain Res.* – 1993. – V. 628. – N 1-2. – P. 227-234.
72. Benfenati, F. S100A1 codistributes with synapsin I in discrete brain areas and inhibits the F-actin-bundling activity of synapsin I / F. Benfenati, R. Ferrari, F. Onofri, C. Arcuri, I. Giambanco, R. Donato // *J. Neurochem.* – 2004. – V. 89. – P. 1260-1270.
73. Berg, M.M. K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity / M.M. Berg, D.W. Sternberg, L.F. Parada, M.V. Chao // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – N 1. – P. 13-16.
74. Bergami, M. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes / M. Bergami, S. Santi, E. Formaggio, C. Cagnoli, C. Verderio, R. Blum, B. Berninger, M. Matteoli, M. Canossa // *J. Cell Biol.* – 2008. – V. 183. – N 2. – P. 213-221.
75. Bergles, D.E. Neuron-glia synapses in the brain / D.E. Bergles, R. Jabs, C. Steinhäuser // *Brain Res. Rev.* – 2010. – V. 63. – P. 130-137.
76. Bhala, U.S. MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network / U.S. Bhala, P.T. Ram, R. Iyengar // *Science.* – 2002. – V. 297. – P. 1018-1023.
77. Bianchi, R. The S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression / R. Bianchi, C. Adami, I. Giambanco, R. Donato // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – V. 81. – P. 108-118.
78. Bianchi, R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- κ B and AP-1. Co-regulation of COX-2 expression by S100B and IL-1 β and TNF- α / R. Bianchi, I. Giambanco, R. Donato // *Neurobiol. Aging.* – 2010. – V. 31. – P. 665-677.
79. Bianchi, R. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent upregulation of chemokine expression and release / R. Bianchi, E. Kastrisianaki, I. Giambanco, R. Donato // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – P. 7214-7226.

80. Biderman, L. Mdm2 and MdmX as regulators of gene expression / L. Biderman, J.L. Manley, C. Prives // *Genes Cancer*. – 2012. – V. 3. – P. 264-273.
81. Blendy, J.A. Targeting of the CREB gene leads to up-regulation of a novel CREB mRNA isoform / J.A. Blendy, K.H. Kaestner, W. Schmid, P. Gass, G. Schutz // *EMBO J*. – 1996. – V. 15. – P. 1098-1106.
82. Bliss, T.V, Gardner-Medwin, A.R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path / T.V. Bliss, A.R. Gardner-Medwin // *J. Physiol*. – 1973. – V. 232. – N 2. – P. 357-374.
83. Bliss, T.V., Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path / T.V. Bliss, T. Lomo // *J. Physiol*. – 1973. – V. 232. – N 2. – P. 331-356.
84. Bonhoeffer, T., Yuste, R. Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function / T. Bonhoeffer, R. Yuste // *Neuron*. – 2002. – V. 35. – N 6. – P. 1019-1027.
85. Bosch-Presegué, L. Stabilization of Suv39H1 by SirT1 is part of oxidative stress response and ensures genome protection / L. Bosch-Presegué, H. Raurell-Vila, A. Marazuela-Duque, N. Kane-Goldsmith, A. Valle, J. Oliver, L. Serrano, A. Vaquero // *Mol. Cell*. – 2011. – V. 42. – N 2. – P. 210-223.
86. Bozon, B. A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval / B. Bozon, S. Davis, S. Laroche // *Neuron*. – 2003. – V. 40. – N 4. – P. 695-701.
87. Braidă, D. Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice / D. Braidă, P. Sacerdote, A.E. Panerai, M. Bianchi, A.M. Aloisi, S. Iosùè, M. Sala // *Behav. Brain Res*. – 2004. – V. 153. – N 2. – P. 423-429.
88. Bravarenko, N.I. Caspase-like activity is essential for long-term synaptic plasticity in the terrestrial snail *Helix* / N.I. Bravarenko, M.V. Onufriev, M.Y. Stepanichev, V.N. Ierusalimsky, P.M. Balaban, N.V. Gulyaeva // *Eur. J. Neurosci*. – 2006. – V. 23. – N 1. – P. 129-140.

89. Brown, L. CDIP, a novel pro-apoptotic gene, regulates TNF α -mediated apoptosis in a p53-dependent manner / L. Brown, P.P. Ongusaha, H.G. Kim, S. Nuti, A. Mandinova, J.W. Lee, R. Khosravi-Far, S.A. Aaronson, S.W. Lee // *EMBO J.* – 2007. – V. 26. – N 14. – P. 3410-3422.
90. Budanov, A.V., Karin, M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling / A.V. Budanov, M. Karin // *Cell.* – 2008. – V. 134. – P. 451-460.
91. Budhram-Mahadeo, V. p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor / V. Budhram-Mahadeo, P.J. Morris, M.D. Smith, C.A. Midgley, L.M. Boxer, D.S. Latchman // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – N 21. – P. 15237-15244.
92. Calissano, P. Interaction of S-100 protein with cations and liposomes / P. Calissano, S. Alemà, P. Fasella // *Biochemistry.* – 1974. – V. 13. – N 22. – P. 4553-4560.
93. Carafoli, E. Generation, control, and processing of cellular calcium signals / E. Carafoli, L. Santella, D. Branca, M. Brini // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2001. – V. 36. – N 2. – P. 107-260.
94. Carrion, A.M. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor / A.M. Carrion, W.A. Link, F. Ledo, B. Mellström, J.R. Naranjo // *Nature.* – 1999. – V. 398. – P. 80-84.
95. Carvajal, L.A. E2F7, a novel target, is up-regulated by p53 and mediates DNA damage-dependent transcriptional repression / L.A. Carvajal, P.-J. Hamard, C. Tonnessen, J.J. Manfredi // *Genes Dev.* – 2012. – V. 26. – N 14. – P. 1533-1545.
96. Casar, B. Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes / B. Casar, A. Pinto, P. Crespo // *Mol. Cell.* – 2008. – V. 31. – P. 708-721.
97. Castets, F. Transcriptional regulation of the human S100 β gene / F. Castets, W.S. Griffin, A. Marks, L.J. Van Eldik // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1997. – V. 46. – P. 208-216.

98. Cavallaro, S. Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus / S. Cavallaro, V. D'Agata, P. Manickam, F. Dufour, D.L. Alkon // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – P. 16279-16284.
99. Charvet, C. Phosphorylation of Tip60 by GSK-3 determines the induction of PUMA and apoptosis by p53 / C. Charvet, M. Wissler, P. Brauns-Schubert, S.J. Wang, Y. Tang, F.C. Sigloch, H. Mellert, M. Brandenburg, S.E. Lindner, B. Breit, D.R. Green, S.B. McMahon, C. Borner, W. Gu, U. Maurer // *Mol. Cell.* – 2011. – V. 42. – N 5. – P. 584-596.
100. Chawla, S. Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5 / S. Chawla, P. Vanhoutte, F.J. Arnold, C.L. Huang, H. Bading // *J. Neurochem.* – 2003. – V. 85. – P. 151-159.
101. Cho, Y.Y. The p53 protein is a novel substrate of ribosomal S6 kinase 2 and a critical intermediary for ribosomal S6 kinase 2 and histone H3 interaction / Y.Y. Cho, Z. He, Y. Zhang, H.S. Choi, F. Zhu, B.Y. Choi, B.S. Kang, W.Y. Ma, A.M. Bode, Z. Dong // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – N 9. – P. 3596-3603.
102. Chowdhury, S. Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking / S. Chowdhury, J.D. Shepherd, H. Okuno, G. Lyford, R.S. Petralia, N. Plath, D. Kuhl, R.L. Huganir, P.F. Worley // *Neuron.* – 2006. – V. 52. – N 3. – P. 445-459.
103. Ciccarelli, R. Activation of A1 adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of Nerve Growth Factor and S100 β protein from cultured astrocytes / R. Ciccarelli, P. Di Iorio, V. Bruno, G. Battaglia, I. D'Alimonte, M. D'Onofrio, F. Nicoletti, F. Caciagli // *Glia.* – 1999. – V. 27. – P. 275-281.
104. Clayton, D.F. The genomic action potential / D.F. Clayton // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2000. – V. 74. – N 3. – P. 185-216.
105. Condon, J.C. Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase / J.C. Condon, V. Pezzi, B.M. Drummond, S. Yin, W.E. Rainey // *Endocrinology.* – 2002. – V. 143. – N 9. – P. 3651-3657.

106. Condorelli, D.F. Induction of primary response genes by excitatory amino acid receptor agonists in primary astroglial cultures / D.F. Condorelli, P. Dell'Albani, C. Amico, L. Kaczmarek, F. Nicoletti, K. Lukasiuk, A.M. Stella // *J. Neurochem.* – 1993. – V. 60. – N 3. – P. 877-885.
107. Conkright, M.D. TORCs: transducers of regulated CREB activity / M.D. Conkright, G. Canettieri, R. Screaton, E. Guzman, L. Miraglia, J.B. Hogenesch, M. Montminy // *Mol. Cell.* – 2003. – V. 12. – P. 413-423.
108. Conner, J.M. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport / J.M. Conner, J.C. Lauterborn, Q. Yan, C.M. Gall, S. Varon // *J. Neurosci.* – 1997. – V. 17. – N 7. – P. 2295-2313.
109. Coogan, A. The p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 antagonizes the inhibitory effects of interleukin-1 β on long term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro / A. Coogan, L.A.J. O'Neil, V. O'Connor // *Neuroscience.* – 1999. – V. 93. – P. 57-69.
110. Craig, A.L. The MDM2 ubiquitination signal in the DNA-binding domain of p53 forms a docking site for calcium calmodulin kinase superfamily members / A.L. Craig, J.A. Chrystal, J.A. Fraser, N. Sphyris, Y. Lin, B.J. Harrison, M.T. Scott, I. Dornreiter, T.R. Hupp // *Mol. Cell. Biol.* – 2007. – V. 27. – P. 3542-3555.
111. Cross, D.A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B / D.A. Cross, D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, B.A. Hemmings // *Nature.* – 1995. – V. 378. – N 6559. – P. 785-789.
112. Dagdan, E. Functional assessment of a promoter polymorphism in S100B, a putative risk variant for bipolar disorder / E. Dagdan, D.W. Morris, M. Campbell, M. Hill, M. Rothermundt, F. Kästner, C. Hohoff, C. von Eiff, P. Krakowitzky, M. Gill, P. McKeon, S. Roche // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* – 2011. – V. 156B. – N 6. – P. 691-699.
113. Da Pozzo, E. p53 functional inhibitors behaving like pifithrin- β counteract the Alzheimer peptide non- β -amyloid component effects in human SH-SY5Y cells /

- E. Da Pozzo, V. La Pietra, B. Cosimelli, F. Da Settimo, C. Giacomelli, L. Marinelli, C. Martini, E. Novellino, S. Taliani, G. Greco // *ACS Chem. Neurosci.* – 2014. – V. 5. – N 5. – P. 390-399.
114. Davis, S. How necessary is the activation of the immediate early gene *zif268* in synaptic plasticity and learning? / S. Davis, B. Bozon, S. Laroche // *Behav. Brain. Res.* – 2003. – V. 142. – P. 17-30.
115. Davis, H.P., Squire, L.R. Protein synthesis and memory: a review / H.P. Davis, L.R. Squire // *Psychol. Bull.* – 1984. – V. 96. – P. 518-559.
116. De Belle, I. p53 and Egr-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells but Egr-1 counteracts p53-dependent apoptosis / I. De Belle, R.P. Huang, Y. Fan, C. Liu, D. Mercola, E.D. Adamson // *Oncogene.* – 1999. – V. 18. – P. 3633-3642.
117. Del Rey, A. A cytokine network involving brain-borne IL-1 β , IL-1ra, IL-18, IL-6, and TNF α operates during long-term potentiation and learning / A. Del Rey, D. Balschun, W. Wetzell, A. Randolph, H.O. Besedovsky // *Brain. Behav. Immun.* – 2013. – V. 33. – P. 15-23.
118. Djalali, S. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development / S. Djalali, M. Hölte, G. Grosse, T. Rothe, T. Stroh, J. Grosse, D.R. Deng, R. Hellweg, R. Grantyn, H. Hörtnagl, G. Ahnert-Hilger // *J. Neurochem.* – 2005. – V. 92. – P. 616-627.
119. Donato, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles / R. Donato // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2001. – V. 33. – P. 637-638.
120. Donato, R. Functions of S100 proteins / R. Donato, B.R. Cannon, G. Sorci, F. Riuzzi, K. Hsu, D.J. Weber, C.L. Geczy // *Curr. Mol. Med.* – 2013. – V. 13. – N 1. – P. 24-57.
121. Donato, R. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal / R. Donato, G. Sorci, F. Riuzzi, C. Arcuri, R. Bianchi, F. Brozzi, C. Tubaro, I. Giambanco // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1793. – P. 1008-1022.

122. Dragunow, M. Long-term potentiation and the induction of c-fos mRNA and proteins in the dentate gyrus of unanesthetized rats / M. Dragunow, W.C. Abraham, M. Goulding, S.E. Mason, H.A. Robertson, R.L. Faull // *Neurosci. Lett.* – 1989. – V. 101. – N 3. – P. 274-280.
123. Dragunow, M., Robertson, H.A. Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus / M. Dragunow, H.A. Robertson // *Nature.* – 1987. – V. 329. – P. 441-442.
124. Dudai, Y., Eisenberg, M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis / Y. Dudai, M. Eisenberg // *Neuron.* – 2004. – V. 44. – P. 93-100.
125. Dyakonova, V. Effects of naloxone on c-jun/AP-1 in met-enkephalin-and FMRFamide-immunoreactive neurons of a gastropod snail / V. Dyakonova, R. Elofsson, M. Carlberg, D.A. Sakharov // *Acta Biol. Hung.* – 1999. – V. 50. – N 1-3. – P. 43-54.
126. Dyck, R.H. Enhanced epileptogenesis in S100B knockout mice / R.H. Dyck, I.I. Bogoch, A. Marks, N.R. Melvin, G.C. Teskey // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2002. – V. 106. – N 1-2. – P. 22-29.
127. Edling, Y. Glutamate activates c-fos in glial cells via a novel mechanism involving the glutamate receptor subtype mGlu5 and the transcriptional repressor DREAM / Y. Edling, M. Ingelman-Sundberg, A. Simi // *Glia.* – 2007. – V. 55. – N 3. – P. 328-340.
128. Edwards, M.M., Robinson, S.R. TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease / M.M. Edwards, S.R. Robinson // *J. Neural. Transm.* – 2006. – V. 113. – P. 1709-1715.
129. Ellis, E.F. S100B protein is released from rat neonatal neurons, astrocytes, and microglia by in vitro trauma and anti-S100 increases trauma-induced delayed neuronal injury and negates the protective effect of exogenous S100B on neurons / E.F. Ellis, K.A. Willoughby, S.A. Sparks, T. Chen // *J. Neurochem.* – 2007. – V. 101. – P. 1463-1470.

130. Fiory, F. Frontiers: PED/PEA-15, a multifunctional protein controlling cell survival and glucose metabolism / F. Fiory, P. Formisano, G. Perruolo, F. Beguinot // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2009. – V. 297. – N 3. – P. E592-E601.
131. Fiscella, M. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner / M. Fiscella, H. Zhang, S. Fan, K. Sakaguchi, S. Shen, W.E. Mercer, G.F. Vande Woude, P.M. O'Connor, E. Appella // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – N 12. – P. 6048-6053.
132. Fleischmann, A. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS / A. Fleischmann, O. Hvalby, V. Jensen, T. Strekalova, C. Zacher, L.E. Layer, A. Kvello, M. Reschke, R. Spanagel, R. Sprengel, E.F. Wagner, P. Gass // *J. Neurosci.* – 2003. – V. 23. – P. 9116-9122.
133. Fomina-Yadlin, D. Small-molecule inducers of insulin expression in pancreatic alpha-cells / D. Fomina-Yadlin, S. Kubicek, D. Walpita, V. Dancik, J. Hecksher-Sørensen, J.A. Bittker, T. Sharifnia, A. Shamji, P.A. Clemons, B.K. Wagner, S.L. Schreiber // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – V. 107. – N 34. – P. 15099-15104.
134. Freedman, D.A. Functions of the MDM2 oncoprotein / D.A. Freedman, L. Wu, A.J. Levine // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1999. – V. 55. – N 1. – P. 96-107.
135. French, P.J. Subfield-specific immediate early gene expression associated with hippocampal long-term potentiation in vivo / P.J. French, V. O'Connor, M.W. Jones, S. Davis, M.L. Errington, K. Voss, B. Truchet, C. Wotjak, T. Stean, V. Doyère, M. Maroun, S. Laroche, T.V.P. Bliss // *Eur. J. Neurosci.* – 2001a. – V. 13. – P. 968-976.
136. French, P.J. Seizure-induced gene expression in area CA1 of the mouse hippocampus / P.J. French, V. O'Connor, K. Voss, T. Stean, S.P. Hunt, T.V. Bliss // *Eur. J. Neurosci.* – 2001b. – V. 14. – N 12. – P. 2037-2041.

137. Frey, U. Long-term potentiation induced in dendrites separated from rat's CA1 pyramidal soma does not establish a late phase / U. Frey, M. Krug, R. Brödemann, K. Reymann, H. Matthies // *Neurosci. Lett.* – 1989. – V. 97. – P. 135-139.
138. Frödin, M. A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1 / M. Frödin, C.J. Jensen, K. Merienne, S. Gammeltoft // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – N 12. – P. 2924-2934.
139. Fukazawa, T. Differential involvement of the CD95 (Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells / T. Fukazawa, T. Fujiwara, Y. Morimoto, J. Shao, M. Nishizaki, Y. Kadowaki, A. Hizuta, L.B. Owen-Schaub, J.A. Roth, N. Tanaka // *Oncogene.* – 1999. – V. 18. – P. 2189-2199.
140. Gao, L. CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels / L. Gao, L.A. Blair, J. Marshall // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – V. 345. – N 4. – P. 1606-1610.
141. Gartner, A., Staiger, V. Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns / A. Gartner, V. Staiger // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – P. 6386-6391.
142. Gary, R.K., Jensen, D.A. The p53 inhibitor pifithrin-alpha forms a sparingly soluble derivative via intramolecular cyclization under physiological conditions / R.K. Gary, D.A. Jensen // *Mol. Pharm.* – 2005. – V. 2. – N 6. – P. 462-474.
143. Gass, P. Deficits in memory tasks of mice with CREB mutations depend on gene dosage / P. Gass, D.P. Wolfer, D. Balschun, D. Rudolph, U. Frey, H.P. Lipp, G. Schutz // *Learn Mem.* – 1998. – V. 5. – P. 274-288.
144. Ge, W.P. Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca²⁺-permeable AMPA receptors / W.P. Ge, X.J. Yang, Z. Zhang, H.K. Wang, W. Shen, Q.D. Deng, S. Duan // *Science.* – 2006. – V. 312. – P. 1533-1537.
145. Gerlai, R. Overexpression of a calcium-binding protein, S100 beta, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic

- mice / R. Gerlai, J.M. Wojtowicz, A. Marks, J. Roder // *Learn. Mem.* – 1995. – V. 2. – N 1. – P. 26-39.
146. Ghasemlou, N. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK2) contributes to secondary damage after spinal cord injury / N. Ghasemlou, R. Lopez-Vales, C. Lachance, T. Thuraisingam, M. Gaestel, D. Radzioch, S. David // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30. – N 41. – P. 13750-13759.
147. Gold, P.E. Protein synthesis inhibition and memory: formation vs. amnesia / P.E. Gold // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2008. – V. 89. – P. 201-211.
148. Golubovskaya, V.M. Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials / V.M. Golubovskaya // *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*. – 2014. – V. 19. – P. 687-706.
149. Gonfloni, S. P53 and Sirt1: routes of metabolism and genome stability / S. Gonfloni, V. Iannizzotto, E. Maiani, G. Bellusci, S. Ciccone, M. Diederich // *Biochem. Pharmacol.* – 2014. – V. 92. – N 1. – P. 149-156.
150. Gonzalez-Guerrico, A.M. Molecular mechanisms of protein kinase C-induced apoptosis in prostate cancer cells / A.M. Gonzalez-Guerrico, J. Meshki, L. Xiao, F. Benavides, C.J. Conti, M.G. Kazanietz // *J. Biochem. Mol. Biol.* – 2005. – V. 38. – N 6. – P. 639-645.
151. Gottlieb, T.M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis / T.M. Gottlieb, J.F. Leal, R. Seger, Y. Taya, M. Oren // *Oncogene.* – 2002. – V. 21. – P. 1299-1303.
152. Graef, I.A. L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons / I.A. Graef, P.G. Mermelstein, K. Stankunas, J.R. Neilson, K. Deisseroth, R.W. Tsien, G.R. Crabtree // *Nature.* – 1999. – V. 401. – P. 703-708.
153. Greer, P.L., Greenberg, M.E. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function / P.L. Greer, M.E. Greenberg // *Neuron.* – 2008. – V. 59. – P. 846-860.

154. Grover, L.M., Yan, C. Blockade of GABA_A receptors facilitates induction of NMDA receptor-independent long-term potentiation / L.M. Grover, C. Yan // *J. Neurophysiol.* – 1999. – V. 81. – P. 2814-2822.
155. Guerrini, L. Synaptic activation of NF- κ B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro / L. Guerrini, F. Blasi, S. Denis-Donini // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92. – P. 9077-9081.
156. Guzowski, J.F. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches / J.F. Guzowski // *Hippocampus.* – 2002. – V. 12. – N 1. – P. 86-104.
157. Guzowski, J.F. 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.F. Guzowski, G.L. Lyford, G.D. Stevenson, F.P. Houston, J.L. McGaugh, P.F. Worley, C.A. Barnes // *J. Neurosci.* – 2000. – V. 20. – P. 3993-4001.
158. Guzowski, J.F. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268 / J.F. Guzowski, B. Setlow, E.K. Wagner, J.L. McGaugh // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21. – P. 5089-5097.
159. Hagiwara, N., Sueoka, N. Regulation of the rat S100 β gene expression: the role of the 2 kb 5'-upstream sequence in glial specific expression / N. Hagiwara, N. Sueoka // *J. Neurosci. Res.* – 1995. – V. 42. – P. 603-612.
160. Hall, J. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories / J. Hall, K.L. Thomas, B.J. Everitt // *J. Neurosci.* – 2001a. – V. 21. – P. 2186-2193.
161. Hall, J. Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala / J. Hall, K.L. Thomas, B.J. Everitt // *Eur. J. Neurosci.* – 2001b. – V. 13. – N 7. – P. 1453-1458.

162. Hardingham, G.E., Bading, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders / G.E. Hardingham, H. Bading // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2010. – V. 11. – N 10. – P. 682-696.
163. Hartmann, M. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses / M. Hartmann, R. Heumann, V. Lessmann // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – P. 5887-5897.
164. Hashimoto, Y. Potent and preferential inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by K252a and its derivative, KT5926 / Y. Hashimoto, T. Nakayama, T. Teramoto, H. Kato, T. Watanabe, M. Kinoshita, K. Tsukamoto, K. Tokunaga, K. Kurokawa, S. Nakanishi, Y. Matsuda, Y. Nonomura // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1991. – V. 181. – N 1. – P. 423-429.
165. Håvik, B. Synaptic activity-induced global gene expression patterns in the dentate gyrus of adult behaving rats: induction of immunity-linked genes / B. Håvik, H. Røkke, G. Dągęte, A.K. Stavrum, C.R. Bramham, V.M. Steen // *Neuroscience.* – 2007. – V. 148. – N 4. – P. 925-936.
166. Hayden, M.S., Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling / M.S. Hayden, S. Ghosh // *Cell.* 2008. – V. 132. – P. 344-362.
167. Helmstetter, F.J. Macromolecular synthesis, distributed synaptic plasticity, and fear conditioning / F.J. Helmstetter, R.G. Parsons, G.M. Gafford // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2008. – V. 89. – P. 324-337.
168. Hering, H., Sheng, M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation / H. Hering, M. Sheng // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2001. – V. 2. – P. 880-888.
169. Hernandez, P.J., Abel, T. The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate / P.J. Hernandez, T. Abel // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2008. – V. 89. – P. 293-311.
170. Hernandez-Ochoa, E.O. Augmentation of Cav1 channel current and action potential duration after uptake of S100A1 in sympathetic ganglion neurons / E.O. Hernandez-Ochoa, B.L. Prosser, N.T. Wright, M. Contreras, D.J. Weber, M.F. Schneider // *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* – 2009. – V. 297. – P. C955-C970.

171. Herskovits, A.Z., Guarente, L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence / A.Z. Herskovits, L. Guarente // *Neuron*. – 2014. – V. 81. – N 3. – P. 471-483.
172. Hevroni, D. Hippocampal plasticity involves extensive gene induction and multiple cellular mechanisms / D. Hevroni, A. Rattner, M. Bundman, D. Lederfein, A. Gabarah, M. Mangelus, M.A. Silverman, H. Kedar, C. Naor, M. Kornuc, T. Hanoch, R. Seger, L.E. Theill, E. Nedivi, G. Richter-Levin, Y. Citri // *J. Mol. Neurosci*. – 1998. – V. 10. – N 2. – P. 75-98.
173. Hindupur, S.K. Identification of a novel AMPK-PEA15 axis in the anoikis-resistant growth of mammary cells / S.K. Hindupur, S.A. Balaji, M. Saxena, S. Pandey, G.S. Sravan, N. Heda, M.V. Kumar, G. Mukherjee, D. Dey, A. Rangarajan // *Breast Cancer Res*. – 2014. – V. 16. – N 4. – Article ID: 420.
174. Hong, E.H. Ionizing radiation induces cellular senescence of articular chondrocytes via negative regulation of SIRT1 by p38 kinase / E.H. Hong, S.J. Lee, J.S. Kim, K.H. Lee, H.D. Um, J.H. Kim, S.J. Kim, J.I. Kim, S.G. Hwang // *J. Biol. Chem*. – 2010. – V. 285. – N 2. – P. 1283-1295.
175. Hong, E.H. Nicotinamide phosphoribosyltransferase is essential for interleukin-1 β -mediated dedifferentiation of articular chondrocytes via SIRT1 and extracellular signal-regulated kinase (ERK) complex signaling / E.H. Hong, H.S. Yun, J. Kim, H.D. Um, K.H. Lee, C.M. Kang, S.J. Lee, J.S. Chun, S.G. Hwang // *J. Biol. Chem*. – 2011. – V. 286. – N 32. – P. 28619-28631.
176. Hong, S.J. Identification and analysis of plasticity-induced late-response genes / S.J. Hong, H. Li, K.G. Becker, V.L. Dawson, T.M. Dawson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – V. 101. – P. 2145-2150.
177. Hope, B. Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine / B. Hope, B. Kosofsky, S.E. Hyman, E.J. Nestler // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – V. 89. – P. 5764-5768.

178. Hryniwicz, A. Impairment of recognition memory in interleukin-6 knock-out mice / A. Hryniwicz, I. Bialuk, K.A. Kamiński, M.M. Winnicka // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – V. 577. – N 1-3. – P. 219-220.
179. Huang, C. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389 / C. Huang, W.Y. Ma, A. Maxiner, Y. Sun, Z. Dong // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 12229-12235.
180. Huang, Y.Y., Kandel, E.R. Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization / Y.Y. Huang, E.R. Kandel // *Learn. Mem.* – 1994. – V. 1. – P. 74–82.
181. Huang, Y.Y., Kandel, E.R. Theta frequency stimulation induces a late phase LTP in the CA1 region of the hippocampus / Y.Y. Huang, E.R. Kandel // *Learn. Mem.* – 2005. – V. 12. – P. 587-593.
182. Huang, Y.Y. A form of longlasting, learning-related synaptic plasticity in the hippocampus induced by heterosynaptic low-frequency pairing / Y.Y. Huang, C. Pittenger, E.R. Kandel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101. – P. 859-864.
183. Hummler, E. Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors / E. Hummler, T.J. Cole, J.A. Blendy, R. Ganss, A. Aguzzi, W. Schmid, F. Beermann, G. Schutz // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – V. 91. – P. 5647-5651.
184. Hydén, H., Lange, P.W. S100 brain protein: correlation with behavior / H. Hydén, P.W. Lange // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1970. – Vol. 67. – N 4. – P. 1959-1966.
185. Impey, S. Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV / S. Impey, A.L. Fong, Y. Wang, J.R. Cardinaux, D.M. Fass, K. Obrietan, G.A. Wayman, D.R. Storm, T.R. Soderling, R.H. Goodman // *Neuron.* – 2002. – V. 34. – P. 235-244.
186. Impey, S. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions / S. Impey, S.R. McCorkle, H. Cha-

- Molstad, J.M. Dwyer, G.S. Yochum, J.M. Boss, S. McWeeney, J.J. Dunn, G. Mandel, R.H. Goodman // *Cell*. – 2004. – V. 119. – N 7. – P. 1041-1054.
187. Innocente, S.A., Lee, J.M. p53 is a NF-Y- and p21-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription / S.A. Innocente, J.M. Lee // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – N 5. – P. 1001-1007.
188. Ishizuka, N. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat / N. Ishizuka, J. Weber, D.G. Amaral // *J. Comp. Neurol.* – 1990. – V. 295. – N 4. – P. 580-623.
189. Israeli, D. A novel p53-inducible gene, PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis / D. Israeli, E. Tessler, Y. Haupt, A. Elkeles, S. Wilder, R. Amson, A. Telerman, M. Oren // *EMBO J.* – 1997. – V. 16. – P. 4384-4392.
190. Itahana, Y. The uric acid transporter SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53 contributing to antioxidant defense / Y. Itahana, R. Han, S. Barbier, Z. Lei, S. Rozen, K. Itahana // *Oncogene*. – 2015. – V. 34. – N 14. – P. 1799-1810.
191. Iuvone, T. Cannabinoid CB1 receptor stimulation affords neuroprotection in MPTP-induced neurotoxicity by attenuating S100B up-regulation in vitro / T. Iuvone, G. Esposito, D. De Filippis, T. Bisogno, S. Petrosino, C. Scuderi, V. Di Marzo, L. Steardo // *J. Mol. Med.* – 2007. – V. 85. – P. 1379-1392.
192. Jamieson, A.C. Drug discovery with engineered zinc-finger proteins / A.C. Jamieson, J.C. Miller, C.O. Pabo // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2003. – V. 2. – P. 361-368.
193. Jankowsky, J.L. Cytokine responses to LTP induction in the rat hippocampus: a comparison of in vitro and in vivo techniques / J.L. Jankowsky, B.E. Derrick, P.H. Patterson // *Learn. Mem.* – 2000. – V. 7. – N 6. – P. 400-412.
194. Jiang, H. Organization, sequence, and expression of the murine S100 β gene. Transcriptional regulation by cell type-specific cis-acting regulatory elements / H. Jiang, S. Shah, D.C. Hilt // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 20502-20511.

195. Jing, W. Arginine vasopressin prevents amyloid beta protein-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampus in vivo / W. Jing, F. Guo, L. Cheng, J.F. Zhang, J.S. Qi // *Neurosci. Lett.* – 2009. – V. 450. – N 3. – P. 306-310.
196. Ju, W. Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors / W. Ju, W. Morishita, J. Tsui, G. Gaietta, T.J. Deerinck, S.R. Adams, C.C. Garner, R.Y. Tsien, M.H. Ellisman, R.C. Malenka // *Nat. Neurosci.* – 2004. – V. 7. – P. 244-253.
197. Jones, O.D. Astrocyte mediated metaplasticity in the hippocampus: Help or hindrance? / O.D. Jones // *Neuroscience.* – 2015. – V. 309. – P. 113-124.
198. Jones, M.W. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories / M.W. Jones, M.L. Errington, P.J. French, A. Fine, T.V. Bliss, S. Garel, P. Charnay, B. Bozon, S. Laroche, S. Davis // *Nat. Neurosci.* – 2001. – V. 4. – N 3. – P. 289-296.
199. Kaltschmidt, C. Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF- κ B in primary neurons / C. Kaltschmidt, B. Kaltschmidt, P.A. Baeuerle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92. – P. 9618-9622.
200. Kandel, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses / E.R. Kandel // *Science.* – 2001. – V. 294. – P. 1030-1038.
201. Kang, H., Schuman, E.M. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus / H. Kang, E.M. Schuman // *Science.* – 1995. – V. 267. – P. 1658-1662.
202. Karpiak, S.E. Effects of antisera to S-100 protein and to synaptic membrane fraction on maze performance and EEG / S.E. Karpiak, M. Serokosz, M.M. Rapport // *Brain Res.* – 1976. – V. 102. – P. 313-321.
203. Karpova, A. Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses / A. Karpova, M. Mikhaylova, U. Thomas, T. Knöpfel, T. Behnisch // *J. Neurosci.* – 2006. – V. 26. – N 18. – P. 4949-4955.

204. Kasahara, J. Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region / J. Kasahara, K. Fukunaga, E. Miyamoto // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 24044-24050.
205. Kase, H. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases / H. Kase, K. Iwahashi, S. Nakanishi, Y. Matsuda, K. Yamada, M. Takahashi, C. Murakata, A. Sato, M. Kaneko // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1987. – V. 142. – N 2. – P. 436-440.
206. Kho, P.S. p53-regulated transcriptional program associated with genotoxic stress-induced apoptosis / P.S. Kho, Z. Wang, L. Zhuang, Y. Li, J.L. Chew, H.H. Ng, E.T. Liu, Q. Yu // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – N 20. – P. 21183-21192.
207. Kiewitz, R. Transcriptional regulation of S100A1 and expression during mouse heart development / R. Kiewitz, G.E. Lyons, B.W. Schäfer, C.W. Heizmann // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – V. 1498. – N 2-3. – P. 207-219.
208. Kingsbury, T.J. Calcineurin activity is required for depolarization-induced, CREB-dependent gene transcription in cortical neurons / T.J. Kingsbury, L.L. Bambrick, C.D. Roby, B.K. Krueger // *J. Neurochem.* – 2007. – V. 103. – N 2. – P. 761-770.
209. Klann, E., Sweatt, J.D. Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation / E. Klann, J.D. Sweatt // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2008. – V. 89. – P. 247-259.
210. Kleindienst, A. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications / A. Kleindienst, F. Hesse, M.R. Bullock, M. Buchfelder // *Prog. Brain Res.* – 2007. – V. 161. – P. 317-325.
211. Kleindienst, A. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury / A. Kleindienst, M.J. McGinn, H.B. Harvey, R.J. Colello, R.J. Hamm, M.R. Bullock // *J. Neurotrauma.* – 2005. – V. 22. – P. 645-655.

212. Knapska, E., Kaczmarek, L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? / E. Knapska, L. Kaczmarek // *Prog. Neurobiol.* – 2004. – V. 74. – P. 183-211.
213. Komarov, P.G. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy / P.G. Komarov, E.A. Komarova, R.V. Kondratov, K. Christov-Tselkov, J.S. Coon, M.V. Chernov, A.V. Gudkov // *Science.* – 1999. – V. 285. – N 5434. – P. 1733-1737.
214. Kornhauser, J.M. CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events / J.M. Kornhauser, C.W. Cowan, A.J. Shaywitz, R.E. Dolmetsch, E.C. Griffith, L.S. Hu, C. Haddad, Z. Xia, M.E. Greenberg // *Neuron.* – 2002. – V. 34. – P. 221-233.
215. Kovács, K.A. TORC1 is a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector involved in hippocampal long-term synaptic plasticity / K.A. Kovács, P. Steullet, M. Steinmann, K.Q. Do, P.J. Magistretti, O. Halfon, J.R. Cardinaux // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V. 104. – N 11. – P. 4700-4705.
216. Krug, M. Anisomyicin blocks the late-phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats / M. Krug, B. Lossner, T. Ott // *Brain Res. Bull.* – 1984. – V. 13. – P. 39-42.
217. Kuribayashi, K., El-Deiry, W.S. Regulation of programmed cell death by the p53 pathway / K. Kuribayashi, W.S. El-Deiry // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2008. – V. 615. – P. 201-221.
218. Kurino, M. Activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons by stimulation of glutamate receptors / M. Kurino, K. Fukunaga, Y. Ushio, E. Miyamoto // *J. Neurochem.* – 1995. – V. 65. – P. 1282-1289.
219. Kuwano, R. Tissue distribution of rat S-100 α and β subunit mRNAs / R. Kuwano, H. Usui, T. Maeda, K. Araki, T. Yamakuni, T. Kurihara, Y. Takahashi // *Brain Res.* – 1987. – V. 388. – N 1. – P. 79-82.
220. Kwok, R.P.S. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB / R.P.S. Kwok, J.R. Lundblad, J.C. Chrivia, J.P. Richards, H.P. Bachinger,

- R.G. Brennan, S.G. Roberts, M.R. Green, R.H. Goodman // *Nature*. – 1994. – V. 379. – P. 223-226.
221. Lalo, U. NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes / U. Lalo, Y. Pankratov, F. Kirchhoff, R.A. North, A. Verkhratsky // *J. Neurosci.* – 2006. – V. 26. – P. 2673–2683.
222. Lalo, U. Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: what is the role of "excitable" molecules in non-excitable cells / U. Lalo, Y. Pankratov, V. Parpura, A. Verkhratsky // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1813. – N 5. – P. 992-1002.
223. Lanahan, A., Worley, P. Immediate-early genes and synaptic function / A. Lanahan, P. Worley // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 1998. – V. 70. – N 1-2. – P. 37-43.
224. Lau, D., Bading, H. Synaptic activity-mediated suppression of p53 and induction of nuclear calcium-regulated neuroprotective genes promote survival through inhibition of mitochondrial permeability transition / D. Lau, H. Bading // *J. Neurosci.* – 2009. – V. 29. – N 14. – P. 4420-4429.
225. Lauterborn, J.C. Differential effects of protein synthesis inhibition on the activity-dependent expression of BDNF transcripts: evidence for immediate-early gene responses from specific promoters / J.C. Lauterborn, S. Rivera, C.T. Stinis, V.Y. Hayes, P.J. Isackson, C.M. Gall // *J. Neurosci.* – 1996. – V. 16. – P. 7428-7436.
226. Lavin, M.F., Gueven, N. The complexity of p53 stabilization and activation / M.F. Lavin, N. Gueven // *Cell. Death Differ.* – 2006. – V. 13. – N 6. – P. 941-950.
227. Leclerc, E. S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains / E. Leclerc, G. Fritz, M. Weibel, C.W. Heizmann, A. Galichet // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – P. 31317-31331.

228. Lee, J.L.C. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation / J.L.C. Lee, B.J. Everitt, K.L. Thomas // *Science*. – 2004. – V. 304. – P. 839-843.
229. Lee, M. Mechanisms of GABA release from human astrocytes / M. Lee, E.G. McGeer, P.L. McGeer // *Glia*. – 2011. – V. 59. – N 11. – P. 1600-1611.
230. Lee, P.R. Gene expression in the conversion of early-phase to late-phase long-term potentiation / P.R. Lee, J.E. Cohen, K.G. Becker, R.D. Fields // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2005. – V. 1048. – P. 259-271.
231. Leil, T.A. Genes regulated by learning in the hippocampus / T.A. Leil, A. Ossadtchi, T.E. Nichols, R.M. Leahy, D.J. Smith // *J. Neurosci. Res.* – 2003. – V. 71. – N 6. – P. 763-768.
232. Lein, E.S. Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput *in situ* hybridization / E.S. Lein, X. Zhao, F.H. Gage // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – N 15. – P. 3879-3889.
233. Leslie, J.H., Nedivi, E. Activity-regulated genes as mediators of neural circuit plasticity / J.H. Leslie, E. Nedivi // *Prog. Neurobiol.* – 2011. – V. 94. – N 3. – P. 223-237.
234. Leßmann, V. The expression mechanism of the residual LTP in the CA1 region of BDNF k. o. mice is insensitive to NO synthase inhibition / V. Leßmann, S. Stroh-Kaffe, V. Steinbrecher, E. Edelman, T. Brigadski, W. Kilb, H.J. Luhmann // *Brain Res.* – 2011. – V. 1391. – P. 14-23.
235. Levenson, J.M. A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-Rel / J.M. Levenson, S. Choi, S.Y. Lee, Y.A. Cao, H.J. Ahn, K.C. Worley, M. Pizzi, H.C. Liou, J.D. Sweatt // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – P. 3933-3943.
236. Lever, I.J. Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation / I.J. Lever, E.J. Bradbury, J.R. Cunningham, D.W. Adelson, M.G. Jones, S.B. McMahon, J.C. Marvizon, M. Malcangio // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21. – P. 4469-4477.

237. Lewis, D., Teyler, T.J. Anti-S-100 serum blocks long- term potentiation in the hippocampal slice / D. Lewis, T.J. Teyler // *Brain Res.* – 1986. – V. 383. – P. 159-164.
238. Li, A.J. Interleukin-6 inhibits long-term potentiation in rat hippocampal slice / A.J. Li, T. Katafuchi, S. Oda, T. Hori, Y. Oomura // *Brain Res.* – 1997. – V. 748. – P. 30-38.
239. Li, C. Identification of PRC1 as the p53 target gene uncovers a novel function of p53 in the regulation of cytokinesis / C. Li, M. Lin, J. Liu // *Oncogene.* – 2004a. – V. 23. – N 58. – P. 9336-9347.
240. Li, H. Identification of calcium- and nitric oxide-regulated genes by differential analysis of library expression (DAzLE) / H. Li, X. Gu, V.L. Dawson, T.M. Dawson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004b. – V. 101. – P. 647-652.
241. Li, Q. Ubiquitin-proteasome system inhibition promotes long-term depression and synaptic tagging/capture / Q. Li, M. Korte, S. Sajikumar // *Cereb. Cortex.* – 2015. – bhv084.
242. Li, Z., Sheng, M. Caspases in synaptic plasticity / Z. Li, M. Sheng // *Mol. Brain.* – 2012. – V. 5. – Article ID: 15.
243. Lin, A.W. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling / A.W. Lin, M. Barradas, J.C. Stone, L. van Aelst, M. Serrano, S.W. Lowe // *Genes Dev.* – 1998. – V. 12. – N 19. – P. 3008-3019.
244. Lin, J. Inhibiting S100B restores p53 levels in primary malignant melanoma cancer cells / J. Lin, Q. Yang, Z. Yan, J. Markowitz, P.T. Wilder, F. Carrier, D.J. Weber // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – N 32. – P. 34071-34077.
245. Ling, S., Lin, W.C. EDD inhibits ATM-mediated phosphorylation of p53 / S. Ling, W.C. Lin // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – N 17. – P. 14972-14982.
246. Link, W. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity / W. Link, U. Konietzko, G. Kauselmann, M. Krug, B. Schwanke, U. Frey, D. Kuhl // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92. – P. 5734-5738.

247. 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 / J.E. Lisman, A.M. Zhabotinsky // *Neuron*. – 2001. – V. 31. – P. 191-201.
248. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – V. 25. – P. 402-408.
249. Loebrich, S., Nedivi, E. The function of activity-regulated genes in the nervous system / S. Loebrich, E. Nedivi // *Physiol. Rev.* – 2009. – V. 89. – N 4. – P. 1079-1103.
250. Lohrum, M., Scheidtmann, K.H. Differential effects of phosphorylation of rat p53 on transactivation of promoters derived from different p53 responsive genes / M. Lohrum, K.H. Scheidtmann // *Oncogene*. – 1996. – V. 13. – N 12. – P. 2527-2539.
251. Lonze, B.V., Ginty, D.D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system / B.V. Lonze, D.D. Ginty // *Neuron*. – 2002. – V. 35. – P. 605-623.
252. Lopez, C.D. Proapoptotic p53-interacting protein 53BP2 is induced by UV irradiation but suppressed by p53 / C.D. Lopez, Y. Ao, L.H. Rohde, T.D. Perez, D.J. O'Connor, X. Lu, J.M. Ford, L. Naumovski // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – V. 20. – N 21. – P. 8018-8025.
253. Lopez de Armentia, M. cAMP response element-binding protein-mediated gene expression increases the intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurons / M. Lopez de Armentia, D. Jancic, R. Olivares, J.M. Alarcon, E.R. Kandel, A. Barco // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – P. 13909-13918.
254. Losi, G. The role of astroglia in the epileptic brain / G. Losi, M. Cammarota, G. Carmignoto // *Front. Pharmacol.* – 2012. – V. 3. – Article ID: 132.
255. Lu, C. Evidence that caspase-1 is a negative regulator of AMPA receptor-mediated long-term potentiation at hippocampal synapses / C. Lu, Y. Wang, K.

- Furukawa, W. Fu, X. Ouyang, M.P. Mattson // *J. Neurochem.* – 2006. – V. 97. – N 4. – P. 1104-1110.
256. Lu, Y. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? / Y. Lu, K. Christian, B. Lu // *Neurobiol Learn Mem.* – 2008. – V. 89. – N 3. – P.312-323.
257. Lyford, G.L. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites / G.L. Lyford, K. Yamagata, W.E. Kaufmann, C.A. Barnes, L.K. Sanders, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, A.A. Lanahan, P.F. Worley // *Neuron.* – 1995. – V. 14. – N 2. – P. 433-445.
258. Lynch, M.A. Increase in synaptic vesicle protein accompanies long-term potentiation in the dentate gyrus / M.A. Lynch // *Neuroscience.* – 1994. – V. 60. – P. 1-5.
259. Lynch, M.A. Long-term potentiation and memory / M.A. Lynch // *Physiol. Rev.* – 2004. – V. 84. – P. 87-136.
260. Mackler, S.A. Stimulus-induced coordinate changes in mRNA abundance in single postsynaptic hippocampal CA1 neurons / S.A. Mackler, B.P. Brooks, J.H. Eberwine // *Neuron.* – 1992. – V. 9. – P. 539-548.
261. Malenka, R.C., Bear, M.F. LTP and LTD: an embarrassment of riches / R.C. Malenka, M.F. Bear // *Neuron.* – 2004. – V. 44. – N 1. – P. 5-21.
262. Madara, J.C., Levine, E.S. Presynaptic and postsynaptic NMDA receptors mediate distinct effects of brain-derived neurotrophic factor on synaptic transmission / J.C. Madara, E.S. Levine // *J. Neurophysiol.* – 2008. – V. 100. – P. 3175-3184.
263. Maddocks, O.D., Vousden, K.H. Metabolic regulation by p53 / O.D. Maddocks, K.H. Vousden // *J. Mol. Med. (Berl).* – 2011. – V. 89. – N 3. – P. 237-245.
264. Maher, P. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory / P. Maher, T. Akaishi, K. Abe // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103. – N 44. – P. 16568-16573.

265. Marie, H. Generation of silent synapses by acute in vivo expression of CaMKIV and CREB / H. Marie, W. Morishita, X. Yu, N. Calakos, R.C. Malenka // *Neuron*. – 2005. – V. 45. – P. 741-752.
266. Maroney, A.C. K-252a induces tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase and neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells / A.C. Maroney, L. Lipfert, M.E. Forbes, M.A. Glicksman, N.T. Neff, R. Siman, C.A. Dionne // *J. Neurochem.* – 1995. – V. 64. – N 2. – P. 540-549.
267. Martin, J.L., Finsterwald, C. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development / J.L. Martin, C. Finsterwald // *Commun. Integr. Biol.* – 2011. – V. 4. – N 1. – P. 14-16.
268. Martiny-Baron, G. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976 / G. Martiny-Baron, M.G. Kazanietz, H. Mischak, P.M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marmé, C. Schächtele // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – N 13. – P. 9194-9197.
269. Martoriati, A. Dapk1, encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic checkpoint, is a transcription target of p53 / A. Martoriati, G. Doumont, M. Alcalay, E. Bellefroid, P.G. Pelicci, J.C. Marine // *Oncogene*. – 2005. – V. 24. – N 8. – P. 1461-1466.
270. Matsui, T. Negative regulation of Chk2 expression by p53 is dependent on the CCAAT-binding transcription factor NF-Y / T. Matsui, Y. Katsuno, T. Inoue, F. Fujita, T. Joh, H. Niida, H. Murakami, M. Itoh, M. Nakanishi // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – N 24. – P. 25093-25100.
271. Matsuo, R. Identification and cataloging of genes induced by long-lasting long-term potentiation in awake rats / R. Matsuo, A. Murayama, Y. Saitoh, Y. Sakaki, K. Inokuchi // *J. Neurochem.* – 2000. – V. 74. – N 6. – P. 2239-2249.
272. Matsuzaki, M. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines / M. Matsuzaki, N. Honkura, G.C. Ellis-Davies, H. Kasai // *Nature*. – 2004. – V. 429. – P. 761-766.

273. Mayr, B., Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB / B. Mayr, M. Montminy // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – V. 2. – N 8. – P. 599-609.
274. McAfoose, J., Baune, B.T. Evidence for a cytokine model of cognitive function / J. McAfoose, B.T. Baune // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2009. – V. 33. – P. 355-366.
275. McConnell, J.L., Wadzinski, B.E. Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development / J.L. McConnell, B.E. Wadzinski // *Mol. Pharmacol.* – 2009. – V. 75. – P. 1249-1261.
276. McGaugh, J.L. Memory – a century of consolidation / J.L. McGaugh // *Science.* – 2000. – V. 287. – P. 248-251.
277. Meberg, P.J. Gene expression of the transcription factor NF- κ B in hippocampus: regulation by synaptic activity / P.J. Meberg, W.R. Kinney, E.G. Valcourt, A. Routtenberg // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1996. – V. 38. – P. 179-190.
278. Mellström, B., Naranjo, J.R. Mechanisms of Ca²⁺-dependent transcription / B. Mellström, J.R. Naranjo // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2001. – V. 11. – P. 312-319.
279. Mellström, B. Ca²⁺-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models / B. Mellström, M. Savignac, R. Gomez-Villafuertes, J.R. Naranjo // *Physiol. Rev.* – 2008. – V. 88. – N 2. – P. 421-449.
280. Metz, R., Ziff, E. cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription / R. Metz, E. Ziff // *Genes Dev.* – 1991. – V. 5. – P. 1754-1766.
281. Michán, S. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity / S. Michán, Y. Li, M.M. Chou, E. Parrella, H. Ge, J.M. Long, J.S. Allard, K. Lewis, M. Miller, W. Xu, R.F. Mervis, J. Chen, K.I. Guerin, L.E.H. Smith, M.W. McBurney, D.A. Sinclair, M. Baudry, R. de Cabo, V.D. Longo // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30. – P. 9695-9707.

282. Miller, P. The stability of stochastic CaMKII switch: dependence on the number of enzyme molecules and protein turnover / P. Miller, A.M. Zhabotinsky, J.E. Lisman, X.J. Wang // *PLoS Biol.* – 2005. – V. 3. – P. e107-e120.
283. Miyamoto, E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus / E. Miyamoto // *J. Pharmacol. Sci.* – 2006. – V. 100. – P. 433-442.
284. Miyashita, T. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo / T. Miyashita, S. Krajewski, M. Krajewska, H.G. Wang, H.K. Lin, D.A. Liebermann, B. Hoffman, J.C. Reed // *Oncogene.* – 1994. – V. 9. – N 6. – P. 1799-1805.
285. Miyazawa, K. Regulation of interleukin-1 β -induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase / K. Miyazawa, A. Mori, H. Miyata, M. Akahane, Y. Ajisawa, H. Okudaira // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 24832-24838.
286. Moberg, K.H. Wild-type murine p53 represses transcription from the murine c-myc promoter in a human glial cell line / K.H. Moberg, W.A. Tyndall, D.J. Hall // *J. Cell. Biochem.* – 1992. – V. 49. – N 2. – P. 208-215.
287. Morgan, J.I. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure / J.I. Morgan, D.R. Cohen, J.L. Hempstead, T. Curran // *Science.* – 1987. – V. 237. – P. 192-197.
288. Morrison, D.K. KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? / D.K. Morrison // *J. Cell Sci.* – 2001. – V. 114. – P. 1609-1612.
289. Murphy, T.H. Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons / T.H. Murphy, P.F. Worley, Y. Nakabeppu, B. Christy, J. Gastel, J.M. Baraban // *J. Neurochem.* – 1991. – V. 57. – N 6. – P. 1862-1872.
290. Nader, K. The labile nature of consolidation theory / K. Nader, G.E. Schafe, J.E. LeDoux // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2000. – V. 1. – P. 216-219.

291. Nag, S. The MDM2-p53 pathway revisited / S. Nag, J. Qin, K.S. Srivenugopal, M. Wang, R. Zhang // *J. Biomed. Res.* – 2013. – V. 27. – P. 254-271.
292. Nakanishi, S. K-252a, a novel microbial product, inhibits smooth muscle myosin light chain kinase / S. Nakanishi, K. Yamada, H. Kase, S. Nakamura, Y. Nonomura // *J. Biol. Chem.* – 1988. – V. 263. – N 13. – P. 6215-6219.
293. Nayak, G., Cooper, G.M. p53 is a major component of the transcriptional and apoptotic program regulated by PI 3-kinase-Akt-GSK3 signaling / G. Nayak, G.M. Cooper // *Cell Death Dis.* – 2012. – V. 3. – Article ID: e400.
294. Neale, J.H. Camptothecin blocks memory of conditioned avoidance in the goldfish / J.H. Neale, P.D. Klinger, B.W. Agranoff // *Science.* – 1973. – V. 179. – P. 1243-1246.
295. Nishiyama, H. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity / H. Nishiyama, T. Knopfel, S. Endo, S. Itohara // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – P. 4037-4042.
296. Oda, E. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis / E. Oda, R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, N. Tanaka // *Science.* – 2000. – V. 288. – N 5468. – P. 1053-1058.
297. O'Dowd, B.S. Chicks injected with antisera to either S-100 α or S-100 β protein develop amnesia for a passive avoidance task / B.S. O'Dowd, W.Q. Zhao, K.T. Ng, S.R. Robinson // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 1997. – V. 67. – N 3. – P. 197-206.
298. Ogawara, Y. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53 / Y. Ogawara, S. Kishishita, T. Obata, Y. Isazawa, T. Suzuki, K. Tanaka, N. Masuyama, Y. Gotoh // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – N 24. – P. 21843-21850.
299. Ohki, R. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase / R. Ohki, J. Nemoto, H. Murasawa, E. Oda, J. Inazawa, N.

- Tanaka, T. Taniguchi // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – N 30. – P. 22627-22630.
300. Osawa, M. Calcium-regulated DNA binding and oligomerization of the neuronal calcium-sensing protein, calsenilin/DREAM/KChIP3 / M. Osawa, K.I. Tong, C. Lilliehook, W. Wasco, J.D. Buxbaum, H.-Y. M. Cheng, J.M. Penninger, M. Ikura, J.B. Ames // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 41005-41013.
301. Oses, J.P. Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylenetetrazol / J.P. Oses, R. Leke, L.V. Portela, D.R. Lara, A.P. Schmidt, E.A. Casali, S. Wofchuk, D.O. Souza, J.J. Sarkis // *Brain Res. Bull.* – 2004. – V. 64. – P. 237-242.
302. Osten, P. Protein synthesis-dependent formation of protein kinase M ζ in long-term potentiation / P. Osten, L. Valsamis, A. Harris, T.C. Sacktor // *J. Neurosci.* – 1996. – V. 16. – N 8. – P. 2444-2451.
303. Ota, Y. The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation / Y. Ota, A.T. Zanetti, R.M. Hallock // *Neural Plast.* – 2013. – V. 2013. – Article ID: 185463.
304. Otani, S., Abraham, W.C. Inhibition of protein synthesis in the dentate gyrus, but not in the entorhial cortex, blocks maintenance of long-term potentiation in rats / S. Otani, W.C. Abraham // *Neurosci. Lett.* – 1989. – V. 106. – P. 175-180.
305. Palygin, O. Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes / O. Palygin, U. Lalo, Y. Pankratov // *Br. J. Pharmacol.* – 2011. – V. 163. – N 8. – P. 1755-1766.
306. Park, C.S. Molecular network and chromosomal clustering of genes involved in synaptic plasticity in the hippocampus / C.S. Park, R. Gong, J. Stuart, S.-J. Tang // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – P. 30195-30211.
307. Parker, D. Analysis of an activator:coactivator complex reveals an essential role for secondary structure in transcriptional activation / D. Parker, U.S. Jhala, I. Radhakrishnan, M.B. Yaffe, C. Reyes, A.I. Shulman, L.C. Cantley, P.E. Wright, M. Montminy // *Mol. Cell.* – 1998. – V. 2. – N 3. – P. 353-359.

308. Parpura, V. Ca^{2+} sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes / V. Parpura, V. Grubišić, A. Verkhratsky // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1813. – N 5. – P. 984-991.
309. Patterson, S.L. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase / S.L. Patterson, C. Pittenger, A. Morozov, K.C. Martin, H. Scanlin, C. Drake, E.R. Kandel // *Neuron.* – 2001. – V. 32. – P. 123-140.
310. Peck, B. SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2 / B. Peck, C.Y. Chen, K.K. Ho, P. Di Fruscia, S.S. Myatt, R.C. Coombes, M.J. Fuchter, C.D. Hsiao, E.W. Lam // *Mol. Cancer Ther.* – 2010. – V. 9. – N 4. – P. 844-855.
311. Pedreira, M.E. Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus* / M.E. Pedreira, B. Dimant, H. Maldonado // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1996. – V. 54. – P. 611-617.
312. Perea, G., Araque, A. GLIA modulates synaptic transmission / G. Perea, A. Araque // *Brain Res. Rev.* – 2010. – V. 63. – P. 93-102.
313. Perry, R.L.S. Direct interaction between myocyte enhancer factor 2 (MEF2) and protein phosphatase 1 α represses MEF2-dependent gene expression / R.L.S. Perry, C. Yang, N. Soora, J. Salma, M. Marback, L. Naghibi, H. Ilyas, J. Chan, J.W. Gordon, J.C. McDermott // *Mol. Cell. Biol.* – 2009. – V. 29. – N 12. – P. 3355-3366.
314. Petrova V., Hu J., Van Eldik L.J. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures / V. Petrova, J. Hu, L.J. Van Eldik // *Brain Res.* – 2000. – V. 853. – P. 74-80.
315. Pfenning, A.R. A comparative genomics approach to identifying the plasticity transcriptome / A.R. Pfenning, R. Schwartz, A.L. Barth // *BMC Neuroscience.* – 2007. – V. 8. – Article ID: 20.
316. Phillips, A.C., Vousden, K.H. Acetyltransferases and tumour suppression / A.C. Phillips, K.H. Vousden // *Breast Cancer Res.* – 2000. – V. 2. – P. 244-246.

317. Pignatelli, M. The transcription factor early growth response factor-1 (EGR-1) promotes apoptosis of neuroblastoma cells / M. Pignatelli, R. Luna-Medina, A. Perez-Rendon, A. Santos, A. Perez-Castillo // *Biochem. J.* – 2003. – V. 373. – P. 739-746.
318. Pita-Almenar, J.D. Relationship between increase in astrocytic GLT-1 glutamate transport and late-LTP / J.D. Pita-Almenar, S. Zou, C.M. Colbert, A. Eskin // *Learn Mem.* – 2012. – V. 19. – N 12. – P. 615-626.
319. Pittenger, C. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory / C. Pittenger, Y.Y. Huang, R.F. Paletzki, R. Bourtchouladze, H. Scanlin, S. Vronskaya, E.R. Kandel // *Neuron.* – 2002. – V. 34. – P. 447-462.
320. Plath, N. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories / N. Plath, O. Ohana, B. Dammermann, M.L. Errington, D. Schmitz, C. Gross, X. Mao, A. Engelsberg, C. Mahlke, H. Welzl, U. Kobalz, A. Stawrakakis, E. Fernandez, R. Waltereit, A. Bick-Sander, E. Therstappen, S.F. Cooke, V. Blanquet, W. Wurst, B. Salmen, M.R. Bosl, H.P. Lipp, G.S. Grant, T.V. Bliss, D.P. Wolfer, D. Kuhl // *Neuron.* – 2006. – V. 52. – N 3. – P. 437-444.
321. Ploski, J.E. Identification of plasticity-associated genes regulated by Pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala / J.E. Ploski, K.W. Park, J. Ping, M.S. Monsey, G.E. Schafe // *J. Neurochem.* – 2010. – V. 112. – P. 636-650.
322. Popov, N. Alterations in calmodulin and S-100 protein content of hippocampal slices during long-term potentiation / N. Popov, S. Schulzeck, T.M. Pankova, A.S. Ratushnyak, M.V. Starostina, M.B. Shtark, H. Matthies // *Biomed. Biochim. Acta.* – 1988. – V. 47. – N 2. – P. 189-195.
323. Qin, C. Estrogen up-regulation of p53 gene expression in MCF-7 breast cancer cells is mediated by calmodulin kinase IV-dependent activation of a nuclear factor κ B/CCAAT-binding transcription factor-1 complex / C. Qin, T. Nguyen, J. Stewart, I. Samudio, R. Burghardt, S. Safe // *Mol. Endocrinol.* – 2002. – V. 16. – N 8. – P. 1793-1809.

324. Quinones, A. The *egr-1* gene is induced by DNA-damaging agents and non-genotoxic drugs in both normal and neoplastic human cells / A. Quinones, K.U. Dobberstein, N.G. Rainov // *Life Sci.* – 2003. – V. 72. – P. 2975-2992.
325. Rainbow, T.C. Role of RNA and protein synthesis in memory formation / T.C. Rainbow // *Neurochem. Res.* – 1979. – V. 4. – P. 297-312.
326. Ramos, J.W. Deletion of PEA-15 in mice is associated with specific impairments of spatial learning abilities / J.W. Ramos, D.A. Townsend, D. Piarulli, S. Kolata, K. Light, G. Hale, L.D. Matzel // *BMC Neurosci.* – 2009. – V. 10. – Article ID: 134.
327. Reali, C. S100B counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia / C. Reali, F. Scintu, R. Pillai, R. Donato, F. Michetti, V. Sogos // *J. Neurosci. Res.* – 2005. – V. 81. – P. 677-686.
328. Rebaudo, R. Antiserum against S-100 protein prevents long term potentiation through a cAMP-related mechanism / R. Rebaudo, R. Melani, M. Balestrino, A. Cupello, K. Haglid, H. Hydèn // *Neurochem. Res.* – 2000. – V. 25. – N 4. – P. 541-545.
329. Reppel, M. S100A1 enhances the L-type Ca^{2+} current in embryonic mouse and neonatal rat ventricular cardiomyocytes / M. Reppel, P. Sasse, R. Piekorz, M. Tang, W. Roell, Y. Duan, A. Kletke, J. Hescheler, B. Nürnberg, B.K. Fleischmann // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P. 36019-36028.
330. Reymann, K.G., Frey, J.U. The late maintenance of hippocampal LTP: Requirements, phases, ‘synaptic tagging’, ‘late-associativity’ and implications / K.G. Reymann, J.U. Frey // *Neuropharmacology.* – 2007. – V. 52. – P. 24-40.
331. Riley, T. Transcriptional control of human p53-regulated genes / T. Riley, E. Sontag, P. Chen, A. Levine // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – V. 9. – P. 402-412.
332. Roberts, L.A. Changes in hippocampal gene expression associated with the induction of long-term potentiation / L.A. Roberts, M.J. Higgins, C.T. O’Shaughnessy, T.W. Stone, B.J. Morris // *Mol. Brain Res.* – 1996. – V. 42. – P. 123-127.

333. Rodriguez, J.J. Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia / J.J. Rodriguez, H.A. Davies, A.T. Silva, I.E. De Souza, C.J. Peddie, F.M. Colyer, C.L. Lancashire, A. Fine, M.L. Errington, T.V. Bliss, M.G. Stewart // *Eur. J. Neurosci.* – 2005. – V. 21. – P. 2384-2396.
334. Rohde, D. S100A1 is released from ischemic cardiomyocytes and signals myocardial damage via Toll-like receptor 4 / D. Rohde, C. Schön, M. Boerries, I. Didrihsone, J. Ritterhoff, K.F. Kubatzky, M. Völkers, N. Herzog, M. Mähler, J.N. Tsoporis, T.G. Parker, B. Linke, E. Giannitsis, E. Gao, K. Peppel, H.A. Katus, P. Most // *EMBO Mol. Med.* – 2014. – V. 6. – N 6. – P. 778-794.
335. Romeo, Y. Regulation and function of the RSK family of protein kinases / Y. Romeo, X. Zhang, P.P. Roux // *Biochem. J.* – 2012. – V. 441. – N 2. – P. 553-569.
336. Ropireddy, D., Ascoli, G.A. Potential synaptic connectivity of different neurons onto pyramidal cells in a 3D reconstruction of the rat hippocampus / D. Ropireddy, G.A. Ascoli // *Front. Neuroinform.* – 2011. – V. 5. – 5.
337. Ross, F.M. A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices / F.M. Ross, S.M. Allan, N.J. Rothwell, A. Verkhratsky // *J. Neuroimmunol.* – 2003. – V. 144. – N 1-2. – P. 61-67.
338. Rother, K. p53 downregulates expression of the G1/S cell cycle phosphatase Cdc25A / K. Rother, R. Kirschner, K. Sanger, L. Bohlig, J. Mossner, K. Engeland // *Oncogene.* – 2007. – V. 26. – P. 1949-1953.
339. Rusak, B. Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus / B. Rusak, H.A. Robertson, W. Wisden, S.P. Hunt // *Science.* – 1990. – V. 248. – P. 1237-1240.
340. Ryan, M.M. Rapidly induced gene networks following induction of long-term potentiation at perforant path synapses in vivo / M.M. Ryan, S.E. Mason-Parker, W.P. Tate, W.C. Abraham, J.M. Williams // *Hippocampus.* – 2011. – V. 21. – P. 541-553.

341. Ryan, M.M. Temporal profiling of gene networks associated with the late phase of long-term potentiation in vivo / M.M. Ryan, B. Ryan, M. Kyrke-Smith, B. Logan, W.P. Tate, W.C. Abraham, J.M. Williams // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – Article ID: e40538.
342. Saito, T. S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes / T. Saito, T. Ikeda, K. Nakamura, U.I. Chung, H. Kawaguchi // *EMBO Rep*. – 2007. – V. 8. – N 5. – P. 504-509.
343. Sajikumar, S. Protein synthesis-dependent long-term functional plasticity: methods and techniques / S. Sajikumar, S. Navakkode, J.U. Frey // *Curr. Opin. Neurobiol*. – 2005. – V. 15. – P. 607-613.
344. Sakatani, S. Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo / S. Sakatani, A. Seto-Ohshima, Y. Shinohara, Y. Yamamoto, H. Yamamoto, S. Itohara, H. Hirase // *J. Neurosci*. – 2008. – V. 28. – N 43. – P. 10928-10936.
345. Santhanam, U. Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product / U. Santhanam, A. Ray, P.B. Sehgal // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1991. – V. 88. – N 17. – P. 7605-7609.
346. Sara, S.J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering / S.J. Sara // *Learn. Mem*. – 2000. – V. 7. – P. 73-84.
347. Schaeffer, H.J. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade / H.J. Schaeffer, A.D. Catling, S.T. Eblen, L.S. Collier, A. Krauss, M.J. Weber // *Science*. – 1998. – V. 281. – P. 1668-1671.
348. Schmitt, J.M. Calmodulin-dependent kinase kinase/calmodulin kinase I activity gates extracellular-regulated kinase-dependent long-term potentiation / J.M. Schmitt, E.S. Guire, T. Saneyoshi, T.R. Soderling // *J. Neurosci*. – 2005. – V. 25. – N 5. – P. 1281-1290.
349. Schmittgen, T.D., Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method / T.D. Schmittgen, K.J. Livak // *Nat. Protoc*. – 2008. – V. 3. – N 6. – P. 1101-1108.

350. Schneider, H. A neuromodulatory role of interleukin-1 β in the hippocampus / H. Schneider, F. Pitossi, D. Balschun, A. Wagner, A. del Rey, H.O. Besedovsky // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95. – N 13. – P. 7778-7783.
351. Schroeter, M.L. Serum S100B represents a new biomarker for mood disorders / M.L. Schroeter, J. Sacher, J. Steiner, P. Schoenknecht, K. Mueller // *Curr. Drug Targets.* – 2013. – V. 14. – N 11. – P. 1237-1248.
352. Schulz, S. Direct evidence for biphasic cAMP responsive element-binding protein phosphorylation during long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo / S. Schulz, H. Siemer, M. Krug, V. Höllt // *J. Neurosci.* – 1999. – V. 19. – N 13. – P. 5683-5692.
353. Schwechter, B., Tolia, K.F. Cytoskeletal mechanisms for synaptic potentiation / B. Schwechter, K.F. Tolia // *Commun. Integr. Biol.* – 2013. – V. 6. – N 6. – e27343.
354. Shashoua, V.E. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein / V.E. Shashoua, G.W. Hesse, B.W. Moore // *J. Neurochem.* – 1984. – V. 42. – N 6. – P. 1536-1541.
355. Sheng, J.G. In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis / J.G. Sheng, K. Ito, R.D. Skinner, R.E. Mrazek, C.R. Rovnaghi, L.J. Van Eldik, W.S. Griffin // *Neurobiol. Aging.* – 1996. – V. 17. – P. 761-766.
356. Shih, P.Y. Retrograde synaptic signaling mediated by K⁺ efflux through postsynaptic NMDA receptors / P.Y. Shih, L.P. Savtchenko, N. Kamasawa, Y. Dembitskaya, T.J. McHugh, D.A. Rusakov, R. Shigemoto, A. Semyanov // *Cell Rep.* – 2013. – V. 5. – N 4. – P. 941-951.
357. Shii, Y. Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product / Y. Shii, T. Yamamoto, N. Yamaguchi // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89. – N 12. – P. 5206-5210.
358. Smolen, P. Bistable MAP kinase activity: a plausible mechanism contributing to maintenance of late long-term potentiation / P. Smolen, D.A. Baxter, J.H. Byrne // *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* – 2008. – V. 294. – P. C503-C515.

359. Snigdha, S. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death / S. Snigdha, E.D. Smith, G.A. Prieto, C.W. Cotman // *Neurosci. Bull.* – 2012. – V. 28. – N 1. – P. 14-24.
360. Solá, S. Driving apoptosis-relevant proteins toward neural differentiation / S. Solá, M.M. Aranha, C.M. Rodrigues // *Mol. Neurobiol.* – 2012. – V. 46. – P. 316-331.
361. Solomon, J.M. Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage / J.M. Solomon, R. Pasupuleti, L. Xu, T. McDonagh, R. Curtis, P.S. DiStefano, L.J. Huber // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – V. 26. – N 1. – P. 28-38.
362. Song, W., Zimmer, D.B. Expression of the rat S100A1 gene in neurons, glia, and skeletal muscle / W. Song, D.B. Zimmer // *Brain Res.* – 1996. – V. 721. – N 1-2. – P. 204-216.
363. Sorci, G. S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond / G. Sorci, R. Bianchi, F. Riuzzi, C. Tubaro, C. Arcuri, I. Giambanco, R. Donato // *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* – 2010. – V. 2010. – Article ID: 656481.
364. Sorci, G. S100B protein in tissue development, repair and regeneration / G. Sorci, F. Riuzzi, C. Arcuri, C. Tubaro, R. Bianchi, I. Giambanco, R. Donato // *World J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 4. – N 1. – P. 1-12.
365. Spange, S. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels / S. Spange, T. Wagner, T. Heinzl, O.H. Krämer // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2009. – V. 41. – P. 185-198.
366. Squire, L., Barondes, S. Actinomycin-D: effects on memory at different times after training / L. Squire, S. Barondes // *Nature.* – 1970. – V. 225. – P. 649-650.
367. Starostina, M.V. Studies on the interaction of Ca²⁺ ions with some fractions of the neurospecific S-100 protein / M.V. Starostina, T.K. Malup, S.M. Sviridov // *J. Neurochem.* – 1981. – V. 36. – N 6. – P. 1904-1915.
368. Steelman, L.S. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer

- and aging / L.S. Steelman, W.H. Chappell, S.L. Abrams, R.C. Kempf, J. Long, P. Laidler, S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, F. Stivala, M.C. Mazzarino, M. Donia, P. Fagone, G. Malaponte, F. Nicoletti, M. Libra, M. Milella, A. Tafuri, A. Bonati, J. Bäsecke, L. Cocco, C. Evangelisti, A.M. Martelli, G. Montalto, M. Cervello, J.A. McCubrey // *Aging* (Albany NY). – 2011. – V. 3. – N 3. – P. 192-222.
369. Steiner, J. S100B is expressed in, and released from, OLN-93 oligodendrocytes: Influence of serum and glucose deprivation / J. Steiner, H.G. Bernstein, B. Bogerts, T. Gos, C. Richter-Landsberg, M.T. Wunderlich, G. Keilhoff // *Neuroscience*. – 2008. – V. 154. – N 2. – P. 496-503.
370. Steinhäuser, C., Gallo, V. News on glutamate receptors in glial cells / C. Steinhäuser, V. Gallo // *Trends Neurosci*. – 1996. – V. 19. – N 8. – P. 339-345.
371. Stellwagen, D., Malenka, R.C. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α / D. Stellwagen, R.C. Malenka // *Nature*. – 2006. – V. 440. – N 7087. – P. 1054-1059.
372. Steward, O., Schuman, E.M. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites / O. Steward, E.M. Schuman // *Annu. Rev. Neurosci*. – 2001. – V. 24. – P. 299-325.
373. Stott, F.J. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2 / F.J. Stott, S. Bates, M.C. James, B.B. McConnell, M. Starborg, S. Brookes, I. Palmero, K. Ryan, E. Hara, K.H. Vousden, G. Peters // *EMBO J*. – 1998. – V. 17. – N 17. – P. 5001-5014.
374. Sumi, M. The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells / M. Sumi, K. Kiuchi, T. Ishikawa, A. Ishii, M. Hagiwara, T. Nagatsu, H. Hidaka // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 1991. – V. 181. – N 3. – P. 968-975.
375. Sun, W. Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain / W. Sun, E. McConnell, J.F. Pare, Q. Xu, M. Chen, W. Peng, D. Lovatt, X. Han, Y. Smith, M. Nedergaard // *Science*. – 2013. – V. 339. – N 6116. – P. 197-200.

376. Sutton, M.A., Schuman, E.M. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory / M.A. Sutton, E.M. Schuman // *Cell*. – 2006. – V. 127. – P. 49-58.
377. Suzuki, A. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation / A. Suzuki, S.A. Stern, O. Bozdagi, G.W. Huntley, R.H. Walker, P.J. Magistretti, C.M. Alberini // *Cell*. – 2011. – V. 144. – N 5. – P. 810-823.
378. Tabuchi, A. Differential activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoters I and III by Ca^{2+} signals evoked via L-type voltage-dependent and N-methyl-D-aspartate receptor Ca^{2+} channels / A. Tabuchi, R. Nakaoka, K. Amano, M. Yukimine, T. Andoh, Y. Kuraishi, M. Tsuda // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – N 23. – P. 17269-17275.
379. Takeda, K., Ichijo, H. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system / K. Takeda, H. Ichijo // *Genes Cells*. – 2002. – V. 7. – P. 1099-1111.
380. Tancredi, V. Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices / V. Tancredi, G. D’Arcangelo, F. Grassi, P. Tarroni, G. Palmieri, A. Santoni, F. Eusebi // *Neurosci. Lett.* – 1992. – V. 146. – P. 176-178.
381. Tancredi, V. Nerve growth factor inhibits the expression of long-term potentiation in hippocampal slice / V. Tancredi, G. D’Arcangelo, D. Mercanti, P. Calissano // *Neuroreport*. – 1993. – V. 4. – P. 147-150.
382. Tancredi, V. Interleukin-2 suppressed established long-term potentiation and inhibits its induction in the rat hippocampus / V. Tancredi, C. Zona, F. Velotti, F. Eusebi, A. Santoni // *Brain Res.* – 1990. – V. 525. – P. 149-151.
383. Tang, Y. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis / Y. Tang, J. Luo, W. Zhang, W. Gu // *Mol. Cell*. – 2006. – V. 24. – N 6. – P. 827-839.
384. Tao, X. A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF / X. Tao, A.E. West, W.G. Chen, G. Corfas, M.E. Greenberg // *Neuron*. – 2002. – V. 33. – P. 383-395.

385. Tedeschi, A., Di Giovanni, S. The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon / A. Tedeschi, S. Di Giovanni // *EMBO Rep.* – 2009. – V. 10. – N 6. – P. 576-83.
386. Terlau, H., Seifert, W. Influence of epidermal growth factor on long-term potentiation in the hippocampal slice / H. Terlau, W. Seifert // *Brain Res.* – 1989. – V. 484. – P. 352-356.
387. Terlau, H., Seifert, W. Fibroblast growth factor enhances long-term potentiation in the hippocampal slice / H. Terlau, W. Seifert // *Eur. J. Neurosci.* – 1990. – V. 2. – P. 973-977.
388. Thomas, M.J. Activity-dependent β -adrenergic modulation of low frequency stimulation induced LTP in the hippocampal CA1 region / M.J. Thomas, T.D. Moody, M. Makhinson, T.J. O'Dell // *Neuron.* – 1996. – V. 17. – P. 475-482.
389. Thompson, T. Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis / T. Thompson, C. Tovar, H. Yang, D. Carvajal, B.T. Vu, Q. Xu, G.M. Wahl, D.C. Heimbrosk, L.T. Vassilev // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 53015-53022.
390. Thut, P.D., Lindell, T.J. Alpha-amanitin inhibition of mouse brain form II ribonucleic acid polymerase and passive avoidance retention / P.D. Thut, T.J. Lindell // *Mol. Pharmacol.* – 1974. – V. 10. – P. 146-154.
391. Tramontina, F. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter / F. Tramontina, M.C. Leite, D. Gonçalves, A.C. Tramontina, D.F. Souza, J.K. Frizzo, P. Nardin, C. Gottfried, S.T. Wofchuk, C.A. Gonçalves // *Neurochem. Res.* – 2006. – V. 31. – N 6. – P. 815-820.
392. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25742>
393. Vaidyanathan, H. ERK MAP kinase is targeted to RSK2 by the phosphoprotein PEA-15 / H. Vaidyanathan, J. Opoku-Ansah, S. Pastorino, H. Renganathan, M.L. Matter, J.W. Ramos // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V. 104. – P. 19837-19842.

394. Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain / L.J. Van Eldik, M.S. Wainwright // *Restor. Neurol. Neurosci.* – 2003. – V. 21. – P. 97-108.
395. Van Eldik, L.J., Zimmer, D.B. Secretion of S100 from rat C6 glioma cells / L.J. Van Eldik, D.B. Zimmer // *Brain Res.* – 1987. – V. 436. – P. 367-370.
396. Vann, S.D. Fos expression in the rostral thalamic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests / S.D. Vann, M.W. Brown, J.P. Aggleton // *Neuroscience.* – 2000. – V. 101. – N 4. – P. 983-991.
397. Vaseva, A.V., Moll, U.M. The mitochondrial p53 pathway / A.V. Vaseva, U.M. Moll // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1787. – N 5. – P. 414-420.
398. Vassilev, L.T. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2 / L.T. Vassilev, B.T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E.A. Liu // *Science.* – 2004. – V. 303. – P. 844-848.
399. Vickers, C.A. Induction and maintenance of late-phase long-term potentiation in isolated dendrites of rat hippocampal CA1 pyramidal neurons / C.A. Vickers, K.S. Dickson, D.J.A. Wyllie // *J. Physiol.* – 2005. – V. 568. – P. 803-813.
400. Vincent, A.M. Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress / A.M. Vincent, L. Perrone, K.A. Sullivan, C. Backus, A.M. Sastry, C. Lastoskie, E.L. Feldman // *Endocrinology.* – 2007. – V. 148. – P. 548-558.
401. Voronin, L.L. Long-term potentiation in the hippocampus / L.L. Voronin // *Neuroscience.* – 1983. – V. 10. – N 4. – P. 1051-1069.
402. Vossler, M.R. cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway / M.R. Vossler, H. Yao, R.D. York, M.G. Pan, C.S. Rim, P.J. Stork // *Cell.* – 1997. – V. 89. – N 1. – P. 73-82.
403. Vousden, K.H., Prives, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53 / K.H. Vousden, C. Prives // *Cell.* – 2009. – V. 137. – N 3. – P. 413-431.
404. Waltereit, R. Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated

- kinase activation / R. Waltereit, B. Dammermann, P. Wulff, J. Scafidi, U. Staubli, G. Kauselmann, M. Bundman, D. Kuhl // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21. – P. 5484-5493.
405. Waltereit, R., Weller, M. Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity / R. Waltereit, M. Weller // *Mol. Neurobiol.* – 2003. – V. 27. – N 1. – P. 99-106.
406. Wayman, G.A. Analysis of CaM-kinase signaling in cells / G.A. Wayman, H. Tokumitsu, M.A. Davare, T.R. Soderling // *Cell Calcium.* – 2011. – V. 50. – N 1. – P. 1-8.
407. West, A.E. Calcium regulation of neuronal gene expression / A.E. West, W.G. Chen, M.B. Dalva, R.E. Dolmetsch, J.M. Kornhauser, A.J. Shaywitz, M.A. Takasu, X. Tao, M.E. Greenberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – V. 98. – N 20. – P. 11024-11031.
408. West, A.E., Greenberg, M.E. Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function / A.E. West, M.E. Greenberg // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – V. 3. – N 6. – Article ID: a005744.
409. West, A.E. Regulation of transcription factors by neuronal activity / A.E. West, E.C. Griffith, M.E. Greenberg // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2002. – V. 3. – N 12. – P. 921-931.
410. Wetmore, C. Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization / C. Wetmore, P. Ernfors, H. Persson, L. Olson // *Exp. Neurol.* – 1990. – V. 109. – N 2. – P. 141-152.
411. Wetzell, W. Is actinomycin D suitable for the investigation of memory processes? / W. Wetzell, T. Ott, H. Matthies // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1976. – V. 4. – P. 515-519.
412. Whitaker-Azmitia, P.M. Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology / P.M. Whitaker-Azmitia, R. Murphy, E.C. Azmitia // *Brain Res.* – 1990. – V. 528. – N 1. – P. 155-158.

413. Whitlock, J.R. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus / J.R. Whitlock, A.J. Heynen, M.G. Shuler, M.F. Bear // *Science*. – 2006. – V. 313. – P. 1093-1097.
414. Wibrand, K. Identification of genes co-upregulated with Arc during BDNF-induced long-term potentiation in adult rat dentate gyrus in vivo / K. Wibrand, E. Messaoudi, B. Håvik, V. Steenslid, R. Løvlie, V.M. Steen, C.R. Bramham // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – V. 23. – P. 1501-1511.
415. Wilder, P.T. Recognition of the tumor suppressor protein p53 and other protein targets by the calcium-binding protein S100B / P.T. Wilder, J. Lin, C.L. Bair, T.H. Charpentier, D. Yang, M. Liriano, K.M. Varney, A. Lee, A.B. Oppenheim, S. Adhya, F. Carrier, D.J. Weber // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1763. – N 11. – P. 1284-1297.
416. Williams, J. Krox20 may play a key role in the stabilisation of long-term potentiation / J. Williams, M. Dragunow, P. Lawlor, S. Mason, W.C. Abraham, J. Leah, R. Bravo, J. Demmer, W. Tate // *Mol. Brain Res.* – 1995. – V. 28. – P. 87-93.
417. Willoughby, K.A. S100B protein is released by in vitro trauma and reduces delayed neuronal injury / K.A. Willoughby, A. Kleindienst, C. Müller, T. Chen, J.K. Muir, E.F. Ellis // *J. Neurochem.* – 2004. – V. 91. – P. 1284-1291.
418. Winzen, R. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism / R. Winzen, M. Kracht, B. Ritter, A. Wilhelm, C.Y. Chen, A.B. Shyu, M. Muller, M. Gaestel, K. Resch, H. Holtmann // *EMBO J.* – 1999. – V. 18. – P. 4969-4980.
419. Wisden, W. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord / W. Wisden, M.L. Errington, S. Williams, S.B. Dunnett, C. Waters, D. Hitchcock, G. Evan, T.V. Bliss, S.P. Hunt // *Neuron*. – 1990. – V. 4. – N 4. – P. 603-614.
420. Wong, K. Nerve growth factor receptor signaling induces histone acetyltransferase domain-dependent nuclear translocation of p300/CREB-binding protein-associated factor and hGCN5 acetyltransferases / K. Wong, J. Zhang, S.

- Awasthi, A. Sharma, L. Rogers, E.F. Matlock, C. Van Lint, T. Karpova, J. McNally, R. Harrod // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – N 53. – P. 55667-55674.
421. Wood, M.A. A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes / M.A. Wood, M.A. Attner, A.M.M. Oliveira, P.K. Brindle, T. Abel // *Learn. Mem.* – 2006. – V. 13. – P. 609-617.
422. Worley, P.F. Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement / P.F. Worley, R.V. Bhat, J.M. Baraban, C.A. Erickson, B.L. McNaughton, C.A. Barnes // *J. Neurosci.* – 1993. – V. 13. – P. 4776-4786.
423. Wright, N.T. S100A1: structure, function, and therapeutic potential / N.T. Wright, B.R. Cannon, D.B. Zimmer, D.J. Weber // *Curr. Chem. Biol.* – 2009. – V. 3. – N 2. – P. 138-145.
424. Xiong, Z. Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice / Z. Xiong, D. O'Hanlon, L.E. Becker, J. Roder, J.F. MacDonald, A. Marks // *Exp. Cell Res.* – 2000. – V. 257. – P. 281-289.
425. Yamagata, K. Egr-3/Pilot Egr-1, a zinc finger transcription factor, is rapidly regulated by activity in brain neurons and colocalizes with Egr-1/zif268 / K. Yamagata, W.E. Kaufmann, A. Lanahan, M. Papapavlou, C.A. Barnes, K.I. Andreasson, P.F. Worley // *Learn. Mem.* – 1994. – V. 1. – P. 140-152.
426. Yamamoto, N. Activation and degradation of the transcription factor C/EBP during long-term facilitation in *Aplysia* / N. Yamamoto, A.N. Hegde, D.G. Chain, J.H. Schwartz // *J. Neurochem.* – 1999. – V. 73. – P. 2415-2423.
427. Yan, Q. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system / Q. Yan, R.D. Rosenfeld, C.R. Matheson, N. Hawkins, O.T. Lopez, L. Bennett, A.A. Welcher // *Neuroscience.* – 1997. – V. 78. – N 2. – P. 431-448.
428. Yano, S. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein family members by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes / S. Yano, K. Fukunaga, M. Takiguchi, Y. Ushio, M. Mori, E. Miyamoto // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – N 38. – P. 23520-23527.

429. Yano, S. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway / S. Yano, H. Tokumitsu, T.R. Soderling // *Nature*. – 1998. – V. 396. – P. 584-587.
430. Yasuda, Y. Relationship between S100 β and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia / Y. Yasuda, N. Tateishi, T. Shimoda, S. Satoh, E. Ogitani, S. Fujita // *Brain Res.* – 2004. – V. 1021. – P. 20-31.
431. Yelmo-Cruz, S. S100B and schizophrenia / S. Yelmo-Cruz, A.L. Morera-Fumero, P. Abreu-González // *Psychiatry Clin. Neurosci.* – 2013. – V. 67. – N 2. – P. 67-75.
432. Yi, J., Luo, J. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond / J. Yi, J. Luo // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – V. 1804. – N 8. – P. 1684-1689.
433. Yoshii, A., Constantine-Paton, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease / A. Yoshii, M. Constantine-Paton // *Dev. Neurobiol.* – 2010. – V. 70. – P. 304-322.
434. Yu, J. A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells / J. Yu, V. Baron, D. Mercola, T. Mustelin, E.D. Adamson // *Cell Death Differ.* – 2007. – V. 14. – P. 436-446.
435. Yuste, R., Bonhoeffer, T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity / R. Yuste, T. Bonhoeffer // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2001. – V. 24. – P. 1071-1089.
436. Zarubin, T., Han, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway / T. Zarubin, J. Han // *Cell Res.* – 2005. – V. 15. – N 1. – P. 11-18.
437. Zhan, M. Transcriptional repression of protein kinase C α via Sp1 by wild type p53 is involved in inhibition of multidrug resistance 1 P-glycoprotein phosphorylation / M. Zhan, D. Yu, J. Liu, R.I. Glazer, J. Hannay, R.E. Pollock // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – N 6. – P. 4825-4833.
438. Zhang, L. S100B attenuates microglia activation in gliomas: possible role of STAT3 pathway / L. Zhang, W. Liu, D. Alizadeh, D. Zhao, O. Farrukh, J. Lin, S.A. Badie, B. Badie // *Glia.* – 2011. – V. 59. – P. 486-498.

439. Zhang, X. HOXC6 and HOXC11 increase transcription of S100 β gene in BrdU-induced in vitro differentiation of GOTO neuroblastoma cells into Schwannian cells / X. Zhang, J. Hamada, A. Nishimoto, Y. Takahashi, T. Murai, M. Tada, T. Moriuchi // *J. Cell. Mol. Med.* – 2007. – V. 11. – N 2. – P. 299-306.
440. Zhang, X. Long-term potentiation at hippocampal perforant path-dentate astrocyte synapses / X. Zhang, J. Zhang, C. Chen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – V. 383. – N 3. – P. 326-330.
441. Zhao, Y.N. Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway / Y.N. Zhao, W.F. Li, F. Li, Z. Zhang, Y.D. Dai, A.L. Xu, C. Qi, J.M. Gao, J. Gao // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – V. 435. – P. 597-602.
442. Zheng, F. Regulation of BDNF-mediated transcription of immediate early gene Arc by intracellular calcium and calmodulin / F. Zheng, Y. Luo, H. Wang // *J. Neurosci. Res.* – 2009. – V. 87. – N 2. – P. 380-392.
443. Zheng, F. Regulation of brain-derived neurotrophic factor exon IV transcription through calcium responsive elements in cortical neurons / F. Zheng, X. Zhou, Y. Luo, H. Xiao, G. Wayman, H. Wang // *PLoS ONE.* – 2011. – V. 6. – N 12. – Article ID: e28441.
444. Zimmer, D.B. S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases / D.B. Zimmer, J. Chaplin, A. Baldwin, M. Rast // *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* – 2005. – V. 51. – N 2. – P. 201-214.
445. Zimmer, D.B. The S100 protein family: history, function, and expression / D.B. Zimmer, E.H. Cornwall, A. Landar, W. Song // *Brain Res. Bull.* – 1995. – V. 37. – N 4. – P. 417-429.
446. Zimmer, D.B., Van Eldik, L.J. Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and S100-binding proteins / D.B. Zimmer, L.J. Van Eldik // *Am. J. Physiol.* – 1987. – V. 252. – N 3. – P. C285-C289.