

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Jadier Redondo Cotes

**PAPEL DAS LIGASES E3 HIPOCAMPAIS DA FAMÍLIA HECT NAS DIFERENTES
FASES DA MEMÓRIA AVERSIVA AO CONTEXTO**

Porto Alegre

2020

Jadier Redondo Cotes

PAPEL DAS LIGASES E3 HIPOCAMPAIS DA FAMÍLIA HECT NAS DIFERENTES
FASES DA MEMÓRIA AVERSIVA AO CONTEXTO

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Neurociências.

Orientador(a): Prof. Dr. Tadeu Mello e Souza
Coorientador(a), Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Redondo Cotes, Jadier
PAPEL DAS LIGASES E3 HIPOCAMPAIS DA FAMÍLIA HECT
NAS DIFERENTES FASES DA MEMÓRIA AVERSIVA AO CONTEXTO /
Jadier Redondo Cotes. -- 2020.
59 f.
Orientador: Tadeu Mello e Souza.

Coorientador: Lucas de Oliveira Alvares.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Porto
Alegre, BR-RS, 2020.

1. Heclina. 2. Condicionamento aversivo. 3.
Memória. 4. Ubiquitina ligase. 5. Ratos. I. Mello e
Souza, Tadeu, orient. II. Alvares, Lucas de Oliveira,
coorient. III. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, os melhores,
pelo seu amor, incentivo e suporte incondicional.

Obrigado

Agradecimentos

En primer lugar agradezco a mi familia. A mi papá (Orlando), siempre me incentivó a seguir adelante y me enseñó el valor de perseverar. A mi madre (Maida), por ser la mujer más fuerte que conozco y siempre me anima a ser cada día mejor. A mis hermanas, Nayadeth por siempre creer y confiar en mí. Lisette te agradezco por tu constante apoyo y paciencia, aún en los momentos más difíciles. Familia, son mi motor, por ustedes todo.

Agradeço ao meu orientador o Professor Tadeu, por acreditar em mim e ter me aceito como orientando, pelos ensinamentos e paciência, admiro muito a sua capacidade e conhecimento multidisciplinar, isso me fez crescer como cientista e ter uma visão mais ampla da ciência, muito obrigado.

Agradeço ao Professor Lucas, meu co-orientador, de quem aprendi muito do que sei de pesquisa com memória, a minha admiração pelos seus insights experimentais e conhecimento, e que sempre esteve com a porta aberta para conversar, muito obrigado.

Ao Professor Jorge, quem faz parte da família no Campus do Vale, um exemplo como professor e pesquisador e que junto com o seu laboratório, compartilhamos seminários, espaços, equipamentos e conhecimento, obrigado.

Às pessoas que já não estão mais no laboratório, mas que foram parte dele por muitos anos, e dos que aprendi muito: Ana Paula, Rossana, Mateus, Josué e Ricardo.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia da Memória, o Bruno, com quem além de compartilhar experimentos, conversas, risadas, muitas discussões e conhecimentos o considero um amigo, a Mirelle, quem sempre se dispôs para me ajudar, aconselhar e corrigir o meu português, à Henrique, Jordana, Paula, Angel, Vitor, Débora, Aline obrigado pela

ajuda sempre, as discussões no laboratório, e a pesquisa sempre foi melhor graças a sua competência.

Agradeço a Tina, que cuidou de nossos animais e sempre esteve disposta para conversar, dar risadas e ser parceira, muito obrigado.

Agradeço ao PPG de Neurociências por ter me aceito e pela disposição e compreensão.

Agradeço ao CAPES/CNPQ pela bolsa de estudo e pelo fomento à pesquisa no Brasil.

Sumário

PARTE I.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Lista de abreviaturas.....	11
1. Introdução.....	13
1.1 Memória.....	13
1.2 Ubiquitinação.....	14
1.3 Riqueza combinatória no controle da ubiquitinação.....	17
1.4 Ligases E3 com domínio HECT.....	17
1.5 Ubiquitinação e receptores glutamatérgicos.....	18
1.6 Ubiquitinação, plasticidade sináptica e memória.....	21
2. Objetivos.....	23
2.1 Gerais.....	23
2.2 Específicos.....	23
PARTE II.....	24
Capítulo 1.....	25
Hippocampal HECT E3 Ligase inhibition facilitates consolidation, retrieval, and reconsolidation, and inhibits extinction of contextual fear memory.....	25
PARTE III.....	35
3. Discussão.....	36
4. Conclusões.....	43
5. Perspectivas.....	45
Referências.....	46
Apêndice.....	60

Resumo

A ubiquitinação está envolvida na plasticidade sináptica e na memória, mas o envolvimento das ligases HECT E3 nesses processos ainda não foi estabelecido. Aqui, infundimos bilateralmente a heclina, um inibidor específico de algumas dessas ligases, no hipocampo dorsal de ratos Wistar machos que foram treinados no condicionamento contextual ao medo. A heclina melhorou a memória de curta duração, e a consolidação, evocação e reconsolidação de memória de longa duração quando administrada imediatamente após o treino, antes do teste ou após a reativação da memória, respectivamente. Além disso, prejudicou a extinção de memória quando administrada antes de uma sessão de reativação longa. A infusão de heclina também foi testada para avaliar a atividade locomotora e o comportamento semelhante ao da ansiedade em uma arena circular, mas nenhum efeito foi observado. Tomados em conjunto, esses resultados indicam que as ligases HECT E3 do hipocampo modulam a memória do medo, sendo que a inibição destas enzimas reforça o traço de memória.

Abstract

Ubiquitination is involved in synaptic plasticity and memory, but the involvement of HECT E3 ligases in these processes has not yet been established. Here, we bilaterally infused heclin, a specific inhibitor of some of these ligases, into the dorsal hippocampus of male Wistar rats that were trained in a contextual fear conditioning. Heclin improved short-term memory, consolidation, retrieval, and reconsolidation of long-term memory when administered immediately post training, prior to testing, or after memory reactivation, respectively. In addition, it impaired memory extinction when administered prior to a long reactivation session. Heclin infusion was also tested for locomotor activity and anxiety-like behavior in a circular arena, but no effect was seen. Taken together, these results indicate that hippocampal HECT E3 ligases modulate fear memory, and the inhibition of these enzymes reinforces the memory trace.

Lista de abreviaturas

AKAP79/150	Proteína de ancoramento da cinase A 79/150
AMP	adenosina monofosfato
AMPA	Receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
APCCdh1	Proteína ativadora APC/C CDH1
ATP	adenosina trifosfato
CA1	Região hipocampal CA1
Ca²⁺	Íon cálcio
CAC/CFC	Condicionamento aversivo ao contexto
CaMKII	Cálcio calmodulina cinase II
CI-AMPA	Receptor AMPA impermeável ao cálcio
CP-AMPA	Receptor AMPA permeável ao cálcio
CREB	Ligante de Elemento Responsivo a Cálcio cAMP
CREB1b	Subunidade CREB 1 beta
D-APV	2-amino-5-fosfopentanoato
DUB	Enzimas deubiquitinantes
Dunc-13	Proteína Drosophila UNC-13
E-LTP	LTP precoce
Eps15	Substrato da via do receptor do fator de crescimento epidérmico 15
LTF	Facilitação de longa duração
FMRFa	FMRF amida
GKAP	Proteína associada à guanilato-ciclase
GluA1	Subunidade do receptor de glutamato A1
HECT	Hómologo ao Terminal C
HPCd	Hipocampo dorsal
UCH-Ap	Hidrolase C-terminal de ubiquitina
IκB	Cinase I κ B
K⁺	Íon potássio
L-LTP	LTP tardia

LTD	Depressão de longa duração
LTM	Memória de Longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
Lys-48	Lisina 48
Lys-63	Lisina 63
MG132	Inibidor do proteassoma MG132
mRNA	RNA mensageiro
Na+	Íon sódio
NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
PI3K-Akt	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PKA	Proteína kinase A
PSD95	Densidade pós-sináptica 95
RIM1	Proteína de ligação ao DNA de fita simples RIM1
RING	Ligase de ubiquitina E3 “Gene Interessante Realmente Novo”
RNF167	Proteína RING FINGER 167
Smurf2	Ligase de ubiquitina E3 SMURF 2
STM	Memória de curta duração
TRIM2	Proteína 2 Contendo Motivo Tripartido
TRIM3	Proteína 3 Contendo Motivo Tripartido
UPP	Via Ubiquitina-Proteassoma
USP46	Hidrolase 46 do terminal carboxíla da ubiquitina
USP8	Hidrolase 8 do terminal carboxíla da ubiquitina
HPV	Papilomavírus Humano
WWP1	Proteína ligase E3--1 da Ubiquitina contendo Domínio WW

1. Introdução

Proteólise é a quebra de proteínas em polipeptídeos menores ou aminoácidos, sendo tipicamente catalisada por enzimas celulares chamadas proteases, mas também podendo ocorrer por digestão intramolecular. A proteólise não ocorre aleatoriamente, mas depende de processos subjacentes, que indiquem quais as proteínas a serem degradadas ([Varshavsky, 2001](#)).

Existem diversos tipos de proteólise intracelular, entre eles: a degradação pelas calpaínas, degradação pela cascata de caspases, degradação de oligopeptídeos pelas peptidases, a proteólise via lisossomal, e a degradação de proteínas dependente de ATP (via ubiquitina-proteassoma) ([Glickman, 2002](#); [Hershko & Ciechanover, 1998](#)). Esta última é o foco deste trabalho, sendo detalhada a seguir.

1.1. Memória

A memória permite o armazenamento de informações adquiridas ao longo do tempo, tornando possível ser evocada posteriormente. Ela tem grande importância adaptativa, pois permite os animais modificar seus comportamentos e interagir de maneira progressivamente mais eficiente e segura com o ambiente ([Haubrich et al., 2015](#)).

1.1.1. Tipos de memória

As memórias são usualmente classificadas em (i) explícitas ou declarativas e (ii) implícitas ou de procedimento. As memórias declarativas requerem a consciência, ao contrário das de procedimento. Memórias declarativas são dependentes de estruturas como o hipocampo e o neocórtex. Já memórias implícitas requerem a atividade de estruturas como o cerebelo e os núcleos da base ([Kandel, Dudai, & Mayford, 2014](#)).

1.1.2. Fases da memória

A memória compreende uma sequência de processos divididos nas fases de aquisição, consolidação, evocação, reconsolidação e extinção ([Dudai, Karni, & Born, 2015](#); [Kandel, Dudai, & Mayford, 2014](#); [Lee, 2009](#); [Nader & Einarsson, 2010](#); [Nader, Schafe, & Le Doux, 2000](#)).

A consolidação da memória é um processo que depende da síntese de novas proteínas e da subsequente reorganização macromolecular em neurônios excitatórios em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central (SNC), como hipocampo e complexo basolateral da amígdala ([Kandel, 2001](#)).

Entretanto, a evocação ou recuperação, é uma fase na qual a memória pode ser reativada e levada a um estado instável e passível de sofrer interferências ([Nader et al., 2000](#)). Uma delas é a reconsolidação da memória que é um processo cujo papel é manter e/ou acrescentar novas informações à memória original, atualizando-a ([Crestani et al., 2015](#); [Haubrich et al., 2015](#); [Nader, Schafe, & Le Doux, 2000](#)), enquanto o papel da extinção é de formar uma nova associação com significado oposto da memória original, suprimindo a resposta da memória formada originalmente ([Quirk & Mueller, 2008](#)).

Os processos previamente descritos são produtos de uma dinâmica molecular conhecida como plasticidade sináptica, que basicamente é a capacidade de mudança da sinapse ao longo do tempo, seja fortalecendo-se ou debilitando-se ([Hughes, 1958](#)).

1.2 Ubiquitinação

A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional reversível que regula uma infinidade de processos fisiológicos, incluindo degradação de proteínas, endocitose, classificação e tráfego de proteínas transmembranas ([Hershko & Ciechanover, 1998](#)). Envolve a ligação covalente de uma molécula de ubiquitina de 76 aminoácidos altamente conservada (monoubiquitinação) ou cadeias poliméricas de ubiquitina (poliubiquitinação) a um resíduo de lisina de uma proteína de substrato ([Hershko & Ciechanover, 1998](#)).

Na via ubiquitina-proteassoma (UPP), os substratos proteicos são marcados por uma ligação covalente à ubiquitina para degradação por um enorme complexo proteolítico chamado proteassoma. A ubiquitina é uma pequena proteína de 76 aminoácidos que é altamente conservada ao longo da evolução. Nesta via proteolítica, a ubiquitina se liga seletiva e covalentemente ao substrato. O processo enzimático de ligação da ubiquitina aos substratos é chamado de ubiquitinação ou conjugação de ubiquitina e depende da ação de três classes diferentes de enzimas, E1, E2 e E3. Primeiro, a ubiquitina é ativada por E1 para formar um intermediário de ubiquitina-AMP. A ubiquitina ativada é passada para E2 ([Hershko & Ciechanover, 1998](#)). A E2 transfere a ubiquitina para uma E3 (ubiquitina ligase), que liga a ubiquitina ativada ao substrato. À ubiquitina, que está ligada a um substrato, outra ubiquitina se liga e, assim, por meio de ligações sucessivas de ubiquitina, uma cadeia de poliubiquitina é formada. Os substratos poliubiquitinados são degradados por uma unidade proteolítica 26S chamada complexo proteassoma em uma reação ATP-dependente. O núcleo catalítico é a parte que divide a proteína ubiquitinada em pequenos peptídeos, com três a 32 aminoácidos. É provável que os peptídeos gerados hidrolisem ainda mais para gerar aminoácidos livres por outras proteases e amino peptidases ([Hegde, 2010](#); [Marques, Palanimurugan, Matias, Ramos, & Dohmen, 2009](#))(Fig. 1).

A ubiquitina não é degradada, mas a cadeia da poliubiquitina é quebrada e a ubiquitina é reciclada pelas enzimas desubiquitinantes (DUB). Antes de acontecer a degradação pelo proteassoma, a ubiquitinação é reversível. Os DUBs podem desmontar a cadeia de poliubiquitina se um substrato estiver incorretamente ubiquitinado e impedir a degradação do substrato ([Hegde, 2010](#)).

E3s são as enzimas que ligam a ubiquitina a substratos específicos. As E3s podem ser proteínas individuais ou complexos proteicos. Algumas E3s podem aceitar moléculas de ubiquitina das E2 por meio de ligações de tioéster (ver fig. 1) e ligam a molécula de ubiquitina ao substrato, enquanto outras E3s ligam as E2 e os substratos e facilitam a transferência de ubiquitina para os substratos. Existem duas classes principais de E3: (1) E3s do domínio HECT (homólogos ao terminal carboxila E6-AP) e (2) RING (“gene realmente novo”) FINGER E3s ([Hegde, 2010](#)).

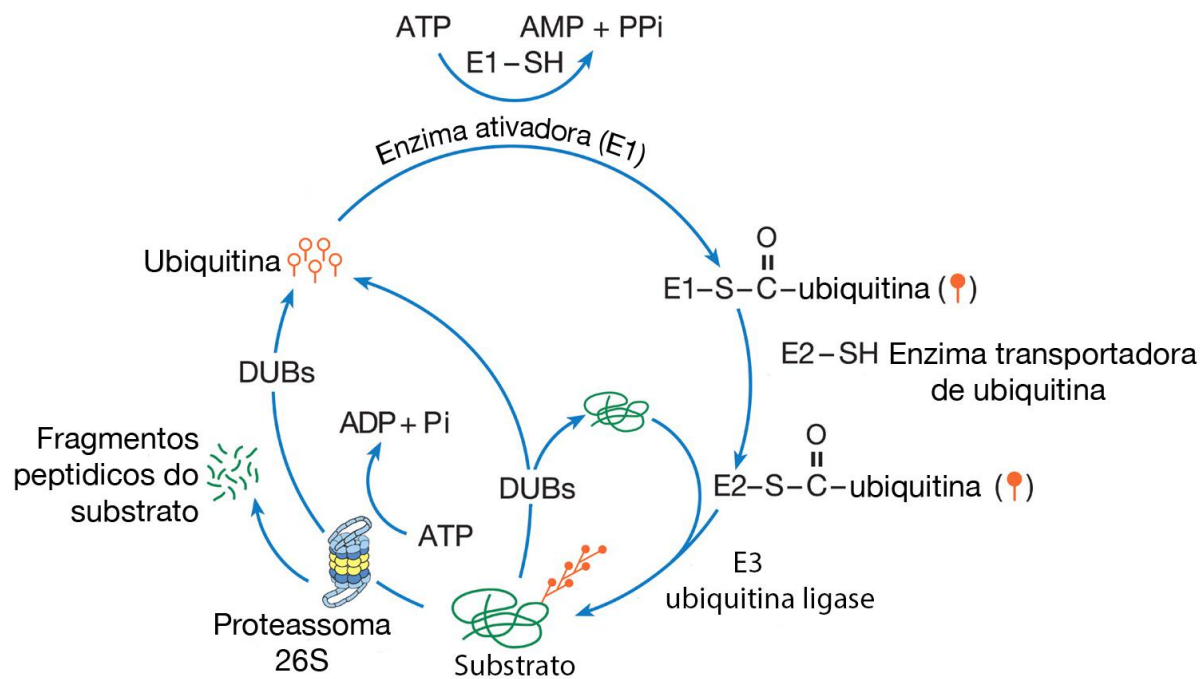


Figura 1. A via ubiquitina-proteassoma (UPP). Mais informações encontram-se no texto. Figura foi adaptada de ([Hegde, 2010](#)).

1.3 Riqueza combinatória no controle da ubiquitinação

As evidências disponíveis indicam que a conjugação da ubiquitina em um substrato é uma reação altamente específica. As E1s fornecem algum grau de especificidade para uma reação de ubiquitinação. As E2s preferem interagir com algumas E3s, mas não com todas. As E2s interagem com as E3s por meio de duas voltas (chamadas L1 e L2) e uma hélice α -N-terminal 1 na estrutura tridimensional da E2. Pequenas variações na sequência de aminoácidos nesses elementos estruturais contribuem para a especificidade da ligação da E2 a E3 ([Ye & Rape, 2009](#)). Inicialmente, pensava-se que existia uma E3 específica para cada substrato. No entanto, ter uma E3 dedicada para cada substrato seria insustentável devido à carga de codificação que imporá ao genoma. Um estudo estimou que o genoma humano contém 617 genes que codificam E3 ([W. Li et al., 2008](#)). E2s, E3s e substratos geram um grande número de combinações para "codificar" a especificidade de uma reação de ubiquitinação. Ocasionalmente, uma E2 pode interagir com mais de uma E3, e uma E3 pode ubiquitinar mais de um substrato. Essas interações ainda são específicas porque provavelmente ocorrem por meio de diferentes domínios de reconhecimento nessas moléculas. Além das combinações únicas de E2-E3, a especificidade pode ser gerada pelo status do substrato (vulnerável ou resistente à degradação), bem como pela regulação da E3 por meio de modificações pós-traducionais, como a fosforilação ([Hegde, 2010](#); [Hegde & DiAntonio, 2002](#)). Portanto, a maquinaria de conjugação de ubiquitina pode ser altamente específica para um determinado substrato. Vale ressaltar que as proteínas ubiquitinadas podem sofrer degradação pelo proteossoma ou endocitose ou a ubiquitinação pode ter um papel não proteolítico ([Hegde, 2010](#)).

1.4 Ligases E3 com domínio HECT

A primeira E3 descoberta nesta classe é chamada E6-AP, que liga a ubiquitina à proteína supressora de tumor p53 (Fig. 2A) em células infectadas pelo vírus do papiloma humano (VPH) ([Beer-Romero, Glass, & Rolfe, 1997](#)). E6 é uma proteína codificada por cepas oncogênicas do VPH. A E6 está associada a uma proteína celular denominada proteína associada ao E6 (E6-AP). A região C-terminal da E6-AP contém o domínio catalítico da ubiquitina ligase ([Huibregtse, Scheffner, & Howley, 1993](#)). Estudos posteriores descobriram que existe uma família de proteínas ubiquitina ligase homólogas ao domínio catalítico E6-AP. Essas ligases de ubiquitina foram nomeadas homólogas as E3s do domínio E3-AP do

terminal carboxila (HECT) ([Huibregtse, Scheffner, Beaudenon, & Howley, 1995](#)). Uma característica das HECT ligases é que elas aceitam ubiquitina ativada de um E2 e formam uma ligação intermediária ubiquitina-tioéster com a E3 ([Scheffner, Nuber, & Huibregtse, 1995](#)).

Até o momento, foi demonstrado que quatro E3 ligases diferentes, o gene 4-1 expresso em células precursoras neurais (Nedd4-1), Nedd4-2, RNF167 e APCCdh1, demonstraram mediar a ubiquitinação de AMPARs em neurônios centrais de mamíferos sob diferentes condições de estimulação ([Fu et al., 2011](#); [Lin et al., 2011](#); [Lussier et al., 2012](#); [Schwarz, Hall, & Patrick, 2010](#); [Zhu et al., 2017](#)).

A família Nedd4 de ligases E3 é caracterizada pela presença do domínio homólogo ao terminal carboxila E6-AP (HECT) ([Scheffner & Kumar, 2014](#)). Essas ligases formam preferencialmente cadeias de poliubiquitina ligadas a K63 em seus substratos ([Kim et al., 2007](#)). Nedd4-1 foi a primeira ligase E3 que demonstrou interagir e facilitar a ubiquitinação de GluA1 nos neurônios ([Schwarz et al., 2010](#)). Um fato importante é que Nedd4-1 é rapidamente redistribuído para sinapses após a ativação do AMPAR ([Hou, Gilbert, & Man, 2011](#); [Scudder et al., 2014](#)).

1.5 Ubiquitinação e receptores glutamatérgicos

A ligação do glutamato aos receptores do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPARs) medeia a transmissão excitatória no sistema nervoso central dos mamíferos. O genoma de mamíferos codifica quatro subunidades AMPAR, GluA1–4. Estes se combinam como um dímero de dímeros para formar tetrâmeros funcionais que geralmente são permeáveis apenas aos íons Na^+ e K^+ , com exceção dos AMPARs, que não apresentam GluA2, e que também conduzem íons de cálcio (Ca^{2+}) adicionais em espinhas dendríticas ([Sukumaran, Penn, & Greger, 2012](#)). Os AMPARs são endocitados e exocitados da membrana plasmática neuronal em condições basais e esses padrões de tráfego podem ser modulados rápida e dinamicamente de maneira dependente da atividade. O tráfego dinâmico de AMPARs é um dos principais mecanismos subjacentes a várias formas de plasticidade sináptica, incluindo a hebbiana e a plasticidade homeostática ([Huganir & Nicoll, 2013](#); [Pozo & Goda, 2010](#)). Esses processos são fortemente regulados pela ação orquestrada das proteínas

de ligação a AMPARs, bem como por modificações pós-traducionais reversíveis que ocorrem nos domínios do terminal carboxila das subunidades de AMPAR ([Anggono & Huganir, 2012](#); [Lu & Roche, 2012](#)).

Após a ativação de AMPARs, aumento de Ca^{2+} intracelular e ativação das ligases E3, por meio da translocação da Nedd4-1 para a membrana plasmática e / ou fosforilação direta do Nedd4 e RNF167 por CaMKII, os AMPARs seriam internalizados sem ubiquitinação e a seguir ubiquitinados nos endossomos ou a sua ubiquitinação recrutaria a ligação de um adaptador endocítico, Eps15, facilitando a internalização. A ativação dos NMDARs pode recrutar o USP8 e, potencialmente, o USP46, para desubiquitinar os AMPARs e promover sua reciclagem. Por meio de um mecanismo desconhecido, os AMPARs ubiquitinados também podem ser degradados por meio do sistema proteassoma ([J. Widagdo, Guntupalli, Jang, & Anggono, 2017](#)).

A ubiquitinação de AMPARs é inicialmente desencadeada pela ligação do ligante aos receptores. Todas as quatro subunidades de AMPARs sofrem ubiquitinação dependente de atividade quando os neurônios são estimulados com AMPA ou bicuculina ([Lussier, Nasu-Nishimura, & Roche, 2011](#); [Schwarz et al., 2010](#); [Jocelyn Widagdo et al., 2015](#)). Além da ligação do ligando aos AMPARs, também é necessária despolarização subsequente da membrana pós-sináptica para a ubiquitinação do AMPAR. Isso permite que o segundo mensageiro Ca^{2+} entre no compartimento pós-sináptico por meio dos canais Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (L-VGCCs) e ative uma cascata de sinalização dependente de Ca^{2+} que envolve a ativação da cinase II dependente de Ca^{2+} (CaMKII) ([Lussier et al., 2011](#); [Jocelyn Widagdo et al., 2015](#)). O papel da CaMKII na regulação da ubiquitinação por AMPAR é atualmente desconhecido, mas acredita-se que a CaMKII esteja envolvida na fosforilação direta e / ou na ativação da(s) ligase(s) E3 que agiriam na ubiquitinação das subunidades do AMPAR ([Lussier et al., 2011](#); [Schwarz et al., 2010](#); [Jocelyn Widagdo et al., 2015](#)).

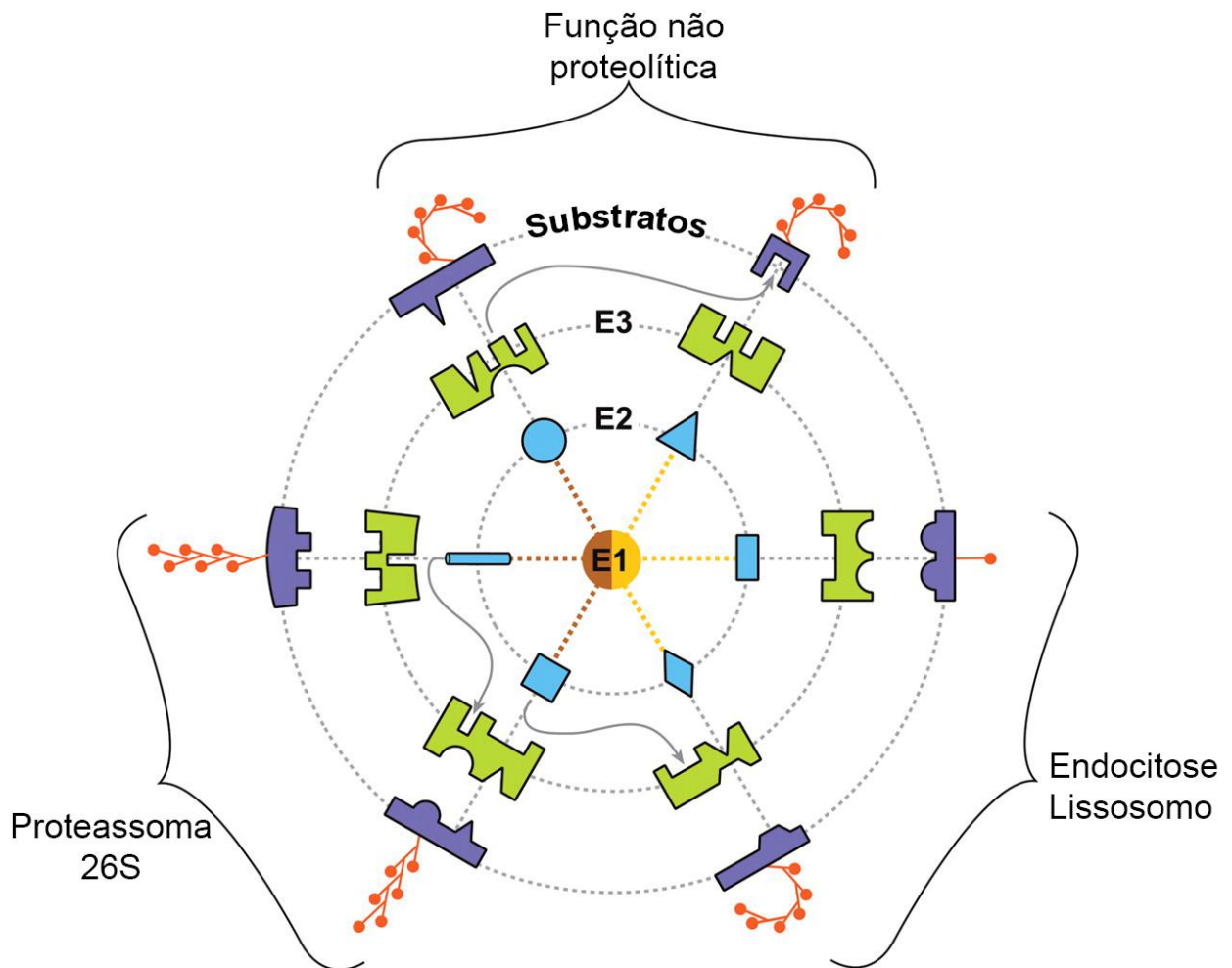


Figura 2.

Codificação combinatória da especificidade na conjugação de ubiquitina. Mais informações encontram-se no texto. Figura foi adaptada da literatura ([Hegde, 2010](#)).

1.6 Ubiquitinação, plasticidade sináptica e memória

A primeira descoberta da degradação mediada por ubiquitina-proteassoma de um substrato relevante para a plasticidade sináptica no sistema nervoso foi a das subunidades regulatórias de PKA ([Hegde, Goldberg, & Schwartz, 1993](#)). Desde então, vários substratos de UPP foram identificados no sistema nervoso ([Hegde, 2010](#)).

Como as subunidades regulatórias inibem a atividade das subunidades catalíticas da PKA, alguns estudos sugerem que a UPP trabalha para remover as restrições inibitórias na formação da memória a longa duração ([Chain et al., 1999](#); [Hegde et al., 1997](#)). Por outro lado, ([Lopez-Salon et al., 2001](#)) demonstraram que a infusão bilateral de lactacistina na região CA1 do hipocampo do rato causa amnésia retrógrada total na tarefa de esquiva inibitória de uma sessão, bem como que a ubiquitinação total aumenta no hipocampo 4 h depois do treino. Estes resultados são consistentes com a ideia de que uma diminuição em algumas proteínas inibidoras é crítica para a formação da memória de longa duração e mediada pela UPP ([Abel, 1998](#)).

Após a descoberta da degradação das subunidades regulatórias da PKA mediada por ubiquitina-proteassoma, foi achado um papel crucial na facilitação de longa duração (LTF, da sigla em inglês) da hidrolase ubiquitina C-terminal da *Aplysia* (UCH-Ap, da sigla em inglês). Estudos recentes expandiram o papel da UCH-Ap e do proteassoma na *Aplysia* na depressão a longa duração (LTD, da sigla em inglês). Na *Aplysia*, as sinapses entre os neurônios sensoriais e motores possuem LTD dependente da transcrição em resposta ao tratamento com o neuropeptídeo Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFa). A aplicação do inibidor de proteassoma lactacistina bloqueou a LTD induzida por FMRFa ([Fioravante, Liu, & Byrne, 2008](#)).

Um papel do proteassoma na plasticidade sináptica de curta duração também foi obtido por meio de experimentos com LTP. Um tipo de LTP chamada LTP de fase inicial (E-LTP, da sigla em inglês), que é independente da síntese de proteínas, é potencializado pela pré-incubação de fatias de hipocampo com o inibidor de proteassoma β - lactona ([Dong, Upadhyya, Ding, Smith, & Hegde, 2008](#)).

Além do grande número de papéis na função sináptica normal, a UPP também tem sido associada ao mau funcionamento sináptico observado em muitas doenças e distúrbios

cerebrais. Acredita-se que os defeitos da UPP tenham um papel no desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA) ([Devrij, Fischer, Vanleeuwen, & Hol, 2004](#)), da doença de Parkinson ([S. Upadhyaya & Hegde, 2005](#)) e da doença de Huntington ([Rubinsztein, 2006](#)). Também foram encontradas evidências de envolvimento da UPP na neurodegeneração por autofagia ([Olzmann & Chin, 2008](#)). Por outro lado, vários estudos mostraram o envolvimento da ubiquitinação de subunidades GluA1/2 no escalonamento sináptico homeostático ([Fu et al., 2011](#); [Hou et al., 2011](#); [Jewett, Zhu, & Tsai, 2015](#); [Scudder et al., 2014](#)) e o envolvimento de Nedd4-1 e Nedd4-2 neste processo ([Hou et al., 2011](#)). A redução homeostática das sinapses excitatórias também foi observada “in vivo” durante o sono, um processo essencial para a consolidação da memória ([Diering et al., 2017](#)).

O envolvimento da ubiquitinação já foi demonstrado na consolidação da memória emocional ([Jarome, Werner, Kwapis, & Helmstetter, 2011](#); [S. H. Lee et al., 2008](#); [Lopez-Salon et al., 2001](#)). Além disso, a ubiquitinação está envolvida na desestabilização e subsequente reconsolidação da memória recuperada do medo ([Jarome, Ferrara, Kwapis, & Helmstetter, 2016](#); [J. L. Lee, 2008](#); [S. H. Lee et al., 2008](#)).

A consolidação, a reconsolidação e a extinção dependem ou são alteradas pela plasticidade sináptica dependente da atividade, como Hebbiana e a plasticidade homeostática. A plasticidade sináptica, por sua vez, depende do tráfego dinâmico adequado de receptores glutamatérgicos AMPAR na sinapse ([Huganir & Nicoll, 2013](#); [Makino & Malinow, 2009](#); [Pozo & Goda, 2010](#)), que é modulado pelas proteínas de ligação ao AMPAR e modificações pós-traducionais reversíveis dos AMPARs ([Anggono & Huganir, 2012](#); [Lu & Roche, 2012](#)).

Nedd4 tem vários alvos que regulam a via PI3K-Akt ([Hsia et al., 2014](#); [A. Sun et al., 2017](#); [Trotman et al., 2007](#)), autofagia ([Kuang, Qi, & Ronai, 2013](#)) e o intercâmbio sináptico de proteínas ([Lin et al., 2011](#)). Esses processos também estão envolvidos na consolidação da memória ([Shehata et al., 2018](#); [Shehata & Inokuchi, 2014](#)) e na reconsolidação ([Jarome et al., 2016](#); [J. L. Lee, 2008](#); [S. H. Lee et al., 2008](#)), bem como na evocação da memória ([Chen et al., 2005](#)) e extinção ([Kuang et al., 2013](#)). A endocitose do AMPAR também medeia a expressão do aprendizado da extinção ([Dalton, Wang, Floresco, & Phillips, 2008](#)). Portanto, há evidências indiretas para indicar que as E3 ligases da família HECT também estejam envolvidas na evocação e extinção da memória do medo, e que o uso da heclina possa fornecer mais informações para esclarecer esse envolvimento.

2. Objetivos

2.1 Gerais

2.1.1 Determinar os efeitos da inibição das E3 ligases da família HECT no hipocampo e na amígdala sobre memórias aversivas e não aversivas.

2.2 Específicos

2.2.1 Verificar o efeito da infusão bilateral de heclina intra-CA1 imediatamente após o treinamento sobre a consolidação da memória adquirida no CAC;

2.2.2 Verificar o efeito da infusão bilateral de heclina intra-CA1 antes de uma reativação curta sobre a evocação da memória recente adquirida no CAC;

2.2.3 Verificar o efeito da infusão bilateral de heclina intra-CA1 antes de uma sessão de exposição ao Campo Aberto sobre a locomoção e o comportamento tipo ansioso;

2.2.4 Verificar o efeito da infusão bilateral de heclina intra-CA1 2 horas após o treino sobre a consolidação da memória de curta duração (STM) adquirida no CAC;

2.2.5 Verificar o efeito da infusão bilateral de heclina intra-CA1 após uma reativação curta sobre a reconsolidação da memória recente adquirida no CAC;

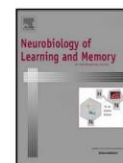
2.2.6 Verificar o efeito da infusão bilateral de heclina intra-CA1 antes de uma reativação longa sobre a extinção da memória recente adquirida no CAC.

PARTE II

Hippocampal HECT E3 Ligase inhibition facilitates consolidation, retrieval, and reconsolidation, and inhibits extinction of contextual fear memory

Artigo publicado na revista *Neurobiology of Learning and Memory* 167 (2020) 107135

DOI: [10.1016/j.nlm.2019.107135](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107135)



Hippocampal HECT E3 ligase inhibition facilitates consolidation, retrieval, and reconsolidation, and inhibits extinction of contextual fear memory

Jadier Redondo^{a,c,d}, Bruno Popik^{a,d}, Mirelle Casagrande^{a,d}, Mateus Oliveira Silva^{a,d}, Jorge Alberto Quillfeldt^{b,d}, Lucas de Oliveira Alvares^{a,c}, Tadeu Mello e Souza^{c,d,*}

^a Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, 91.501-970, Brazil

^b Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, 91.501-970, Brazil

^c Laboratório de Estudos sobre Cognição, Memória e Consciência, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^d Programa de Pós-graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 90.046-900, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Ubiquitin ligase
Heclin
Rat
Fear conditioning
Memory

ABSTRACT

Ubiquitination is involved in synaptic plasticity and memory, but the involvement of HECT E3 ligases in these processes has not yet been established. Here, we bilaterally infused heclin, a specific inhibitor of some of these ligases, into the dorsal hippocampus of male Wistar rats that were trained in a contextual fear conditioning. Heclin improved short-term memory, consolidation, retrieval, and reconsolidation when administered immediately post training, prior to testing, or after memory reactivation, respectively. In addition, it impaired memory extinction when administered prior to a long reactivation session. Heclin infusion was also tested for locomotor activity and anxiety-like behavior in a circular arena, but no effect was seen. Taken together, these results indicate that HECT E3 ligases are involved in the modulation of fear memory.

1. Introduction

Memory consolidation is a process that takes several hours, during which newly acquired information is stored and can be strengthened or weakened. (Izquierdo, Barros et al., 1998, McGaugh, 2000). Re-exposure only to the training environment may trigger memory reconsolidation (Nader, Schafe et al., 2000, De Oliveira Alvares, Crestani et al., 2013, Haubrich, Crestani et al., 2015) or extinction, if it takes longer (Pavlov, 1927, Quirk & Mueller, 2008).

Ubiquitination is a reversible post-translational protein modification that may induce proteolysis and, in the case of transmembrane proteins, their endocytosis, sorting, and/or trafficking (Glickman & Ciechanover, 2002). E3 ligases catalyze the transfer of ubiquitin to the protein substrate (Hershko & Ciechanover, 1998) and can largely contribute to substrate-specificity of ubiquitination because of their wide variety (Hegde, 2010). The neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 (Nedd4) family belongs to the class of E3 ligases that has a homolog to the E6-AP Carboxyl Terminus (HECT) domain. Among the enzymes that belong to this family, there are Nedd4, Smurf2, and WWP1 (Scheffner & Kumar, 2014), which are specifically inhibited by heclin (IC values are 6.3, 6.8, and 6.9 μ M, respectively) (Mund, 2014), making this molecule an interest-

ing pharmacological tool to investigate the role of these ligases in memory processes.

There is compelling evidence to indicate that memory strength is related to surface hippocampal glutamatergic AMPA receptors (AMPA) levels (Wenthold, Petralia et al., 1996, Song & Huganir, 2002, Isaac, Ashby et al., 2007, Shepherd & Huganir, 2007, Makino & Malinow, 2009). To date, four E3 ligases mediate neuronal AMPAR ubiquitination, including Nedd4, and this ubiquitination may reduce surface AMPAR via endocytosis and mediate homeostatic synaptic downscaling (Schwarz, Hall et al., 2010, Fu, Hung et al., 2011, Hou, Gilbert et al., 2011, Lin, Hou, Gilbert, & Man, 2011, Lussier, Herring et al., 2012, Scudder, Goo et al., 2014, Zhu, Lee et al., 2017).

Therefore, it is interesting to evaluate the effect of a Nedd4 inhibitor on memory consolidation due to its role in modulating AMPAR surface levels.

Some inhibitors of ubiquitination are amnesic when acting on consolidation (Lopez-Salon, Alonso et al., 2001, Lee, Choi et al., 2008, Jarome, Werner et al., 2011) or reconsolidation of emotional memory (Lee, 2008, Lee, Choi et al., 2008, Jarome, Ferrara et al., 2016, Widagdo, Guntupalli et al., 2017). It is known that the proteasome degrades transcription repressors involved in memory consolidation (Hegde, 2010), such as CREB1b (Upadhyaya, Smith et

* Corresponding author at: Laboratório de Estudos sobre Cognição, Memória e Consciência, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2600 - anexo, Sala 22, CEP 90035-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail address: msouza@ufrgs.br (T. Mello e Souza)

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107135>

Received 13 July 2019; Received in revised form 25 November 2019; Accepted 3 December 2019

Available online xxx

1074-7427/© 2019.

al., 2004), and that proteasome inhibitor administration into hippocampal slices prior to LTP induction increases the magnitude of the early, induction phase, but inhibits its late, maintenance phase (Dong, Upadhyay et al., 2008). Therefore, it is worth to elucidate the role in memory of the HECT E3 ligases that are inhibited by heclin, and whether there is a differential effect of this inhibitor on short- and long-term memory (STM and LTM, respectively).

Nedd4 has several targets that regulate the PI3K-Akt pathway (Wang, Trotman et al., 2007, Hsia, Kumar et al., 2014, Sun, Wei et al., 2017), autophagy (Kuang, Qi et al., 2013), and synaptic protein turnover (Lin, Hou et al., 2011). These processes are also involved in memory consolidation (Shehata & Inokuchi, 2014, Shehata, Abdou et al., 2018) and reconsolidation (Lee, 2008, Lee, Choi et al., 2008, Jarome, Ferrara et al., 2016), as well as in memory retrieval (Chen, Garelick et al., 2005) and extinction (Kuang, Qi et al., 2013). AMPAR endocytosis also mediates the expression of extinction learning (Dalton, Wang et al., 2008). Therefore, there is indirect evidence to indicate that HECT E3 ligases are also implicated in fear memory retrieval and extinction, and that the use of heclin may give more information to clarify this involvement.

Since the involvement of Nedd4 in memory processes is currently unknown and this molecule is involved in ubiquitination, autophagy, synaptic plasticity, synaptic protein turnover, and AMPAR trafficking, the aim of the present work was to verify whether hippocampal HECT E3 ubiquitin ligases are involved in STM and in the consolidation, reconsolidation, retrieval, and extinction of fear conditioned LTM in rats by the hippocampal administration of heclin.

2. Material and methods

2.1. Subjects

Male *Wistar* rats (2–3 months old, 300–350 g) from the Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals at Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) were used and housed 4–5 per cage with free access to food and water in the Biophysics Department at UFRGS. The housing room was maintained on a 12 h:12 h light/dark cycle (lights on from 7 am to 7 pm) under controlled temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity. Procedures were carried out within the Brazilian ethical guidelines for animal research and approved by the Ethics Committee of UFRGS (number 33253).

2.2. Stereotaxic surgery, cannula placement, and histology

Animals were anesthetized by intraperitoneal injection with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and secure in a Kopf stereotaxic apparatus. Bilateral 22-gauge guide cannulae were targeted for placement directly above the CA1 region of the dorsal hippocampus (AP -4.0 mm from bregma, LL ± 3.0 mm, DV -1.6 mm). Meloxicam (1 mg/Kg; via subcutaneous) was administered 20 min before surgery and once a day in the following two days. Animals were allowed 5–7 days to recover for behavioral procedures. After that, animals were euthanized and had their brains dissected and preserved in 10% formaldehyde to verify accurate cannula placement. Five animals with inaccurate cannula position were excluded from statistical analysis combining all experiments.

2.3. Drugs, microinfusion, and experimental designs

Experimental designs are shown in Figs. 1–4. Different cohorts of animals were used for behavioral tests.

Heclin (Sigma-Aldrich), a HECT E3 ligase inhibitor (0.425, 4.25, 42.5, and 425 $\mu\text{g}/\text{side}$) or its vehicle alone (DMSO 10%) was bilaterally infused into CA1 region of the dorsal hippocampus through a 27-gauge needle that was fit into the cannulae, with its tip protruding 1.0 mm beyond. Infusions (0.5 $\mu\text{L}/\text{side}$) were administered in 60 s, and 30 additional seconds were waited before removing the infusion needle.

2.4. Contextual fear conditioning (CFC)

The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box with a 25 cm \times 25 cm grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart. In the training session, rats were individually placed in the conditioning chamber for 3 min before receiving two 2-s, 0.7-mA foot shocks separated by a 30-s interval. They were kept in the conditioning context for additional 30 s before returning to their home cage. A 4-min re-exposition was performed in any test session without foot-shock.

In order to evaluate the effect of heclin on STM and on memory consolidation, heclin was infused immediately after training and animals were tested 2 or 48 h later (Fig. 1D and 1A), respectively. In order to evaluate the effect of heclin on LTM retrieval, heclin was infused twenty minutes before a test session carried out 24 h after training (Fig. 2A).

Between training and test session, animals were re-exposed to the same conditioning chamber without receiving foot-shock for 5 or 30 min for evaluation of the effects of heclin on reconsolidation or extinction, respectively. Reactivation and test sessions occurred 24 and 48 h after conditioning, respectively (Figs. 3A and 4A). Heclin infusion occurred immediately after or 20 min before these sessions, respectively. This infusion occurred at the same post-training time in a control experiment in which there was no 5-min reactivation session (Fig. 3E). Another 4-min test session was carried out 21 days after conditioning for evaluating spontaneous recovery in the extinction experiment (Fig. 4A).

Freezing behavior was defined as the total cessation of all movements except those required for respiration (Blanchard & Blanchard, 1969), and its duration was measured with a stopwatch in real time by an experienced observer that was unaware of the experimental conditions. Data were obtained considering the corresponding session duration as 100% (except for the 30-min reactivation session, which was divided into 5-min intervals), and used as memory index for reactivation or test session, which is indicated as FB from now on.

2.5. Locomotor activity and anxiety-like behavior evaluation

Locomotor activity and anxiety-like behavior were assessed in an apparatus consisted of a 90-cm diameter circular arena with walls 50-cm high. The floor was subdivided into 12 quadrants and 3 concentric zones (periphery, intermediary and center). The animals were placed in the apparatus for 5 min. The diameter of the central region is 18 cm, and the periphery zone was the complementary region between it and the wall. The time spent on the periphery zone (thigmotaxis) and the number of crossings between quadrants were measured. The experimental design is shown in Fig. 2D.

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using two-tailed Student's unpaired *t*-test, or one or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's or Bonferroni's post hoc test whenever necessary. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

Immediate posttraining heclin administration (at 4.25, 42.5, and 425 but not 0.425 $\mu\text{g}/\text{side}$) increased FB in the test session carried out 48 h after training (One-way ANOVA: $F(4, 37) = 15.68$ and $p < 0.0001$; Tukey's post hoc test: $p = 0.0002$, $p < 0.0001$, $p = 0.0002$, and $p = 0.9765$, respectively; Fig. 1B). *N* per group was 11, 6, 11, 7 and 7 for control and heclin groups, respectively. This indicates that HECT ligase inhibition facilitates memory consolidation.

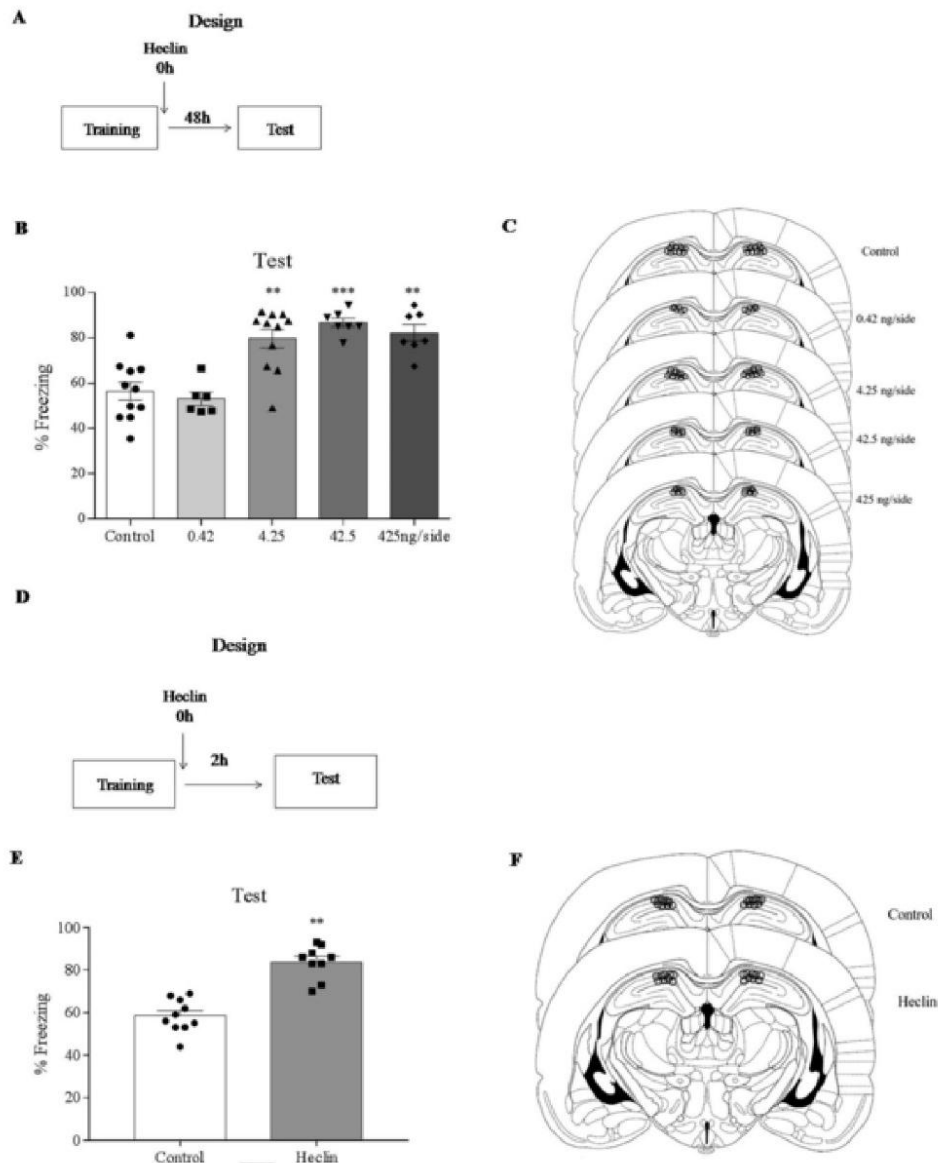


Fig. 1. Memory consolidation and STM are facilitated by postraining hippocampal heclin administration immediately after training. Experimental designs (A and D), positions of the cannula tips (C and F), and graphs showing freezing behavior (B and E) in the evaluation of memory consolidation and STM, respectively, are shown. Bars and error bars indicate FB mean \pm SEM, and scattered geometric figures represent each individual freezing behavior in the test session. For memory consolidation: one-way ANOVA $F(4, 37) = 15.68, p < 0.0001$, and double and triple asterisk indicates $p < 0.01$ and < 0.001 , respectively (Tukey's post hoc test). For STM evaluation, double asterisk indicates $p < 0.01$ (Student's t test). Group sizes are shown in the text. Drawings at the coronal plane -4.16 mm were adapted from the literature (Paxinos, 1998).

tion. Then, we used the dose of 4.25 ng/side in the following experiments since it was the minimum effective dose on memory consolidation

Immediate postraining heclin administration also increased FB in the test session carried out 2 h after training (Student's t test; $t_{(17)} = 7.01; p < 0.001$; Fig. 1E). N was 10 and 9 for heclin and control, respectively. This result indicates that HECT ligases are involved in STM.

Animals treated with heclin 20 min before CFC test session carried out 24 h after training expressed more freezing levels than controls (Student's t test; $t = 3.74; p = 0.0044$; Fig. 2B). N per group was

7. This result indicates that HECT ligases are involved in memory retrieval.

As shown in Fig. 2E, no between-group difference was found in crossings (Student's t test; $t_{(16)} = 0.19; p = 0.85$) or in the time spent in the central region of the circular arena (Fig. 2F) (Student's t test; $t_{(16)} = 1.20; p = 0.25$), indicating that the effect on retrieval may not be due to effects on locomotion or anxiety. N per group was 10 and 8 in controls and treated animals, respectively.

In a 5-min reactivation CFC session, there was no between-group difference in FB (Student's t test; $t_{(10)} = 1.52; p = 0.1584$; Fig. 3

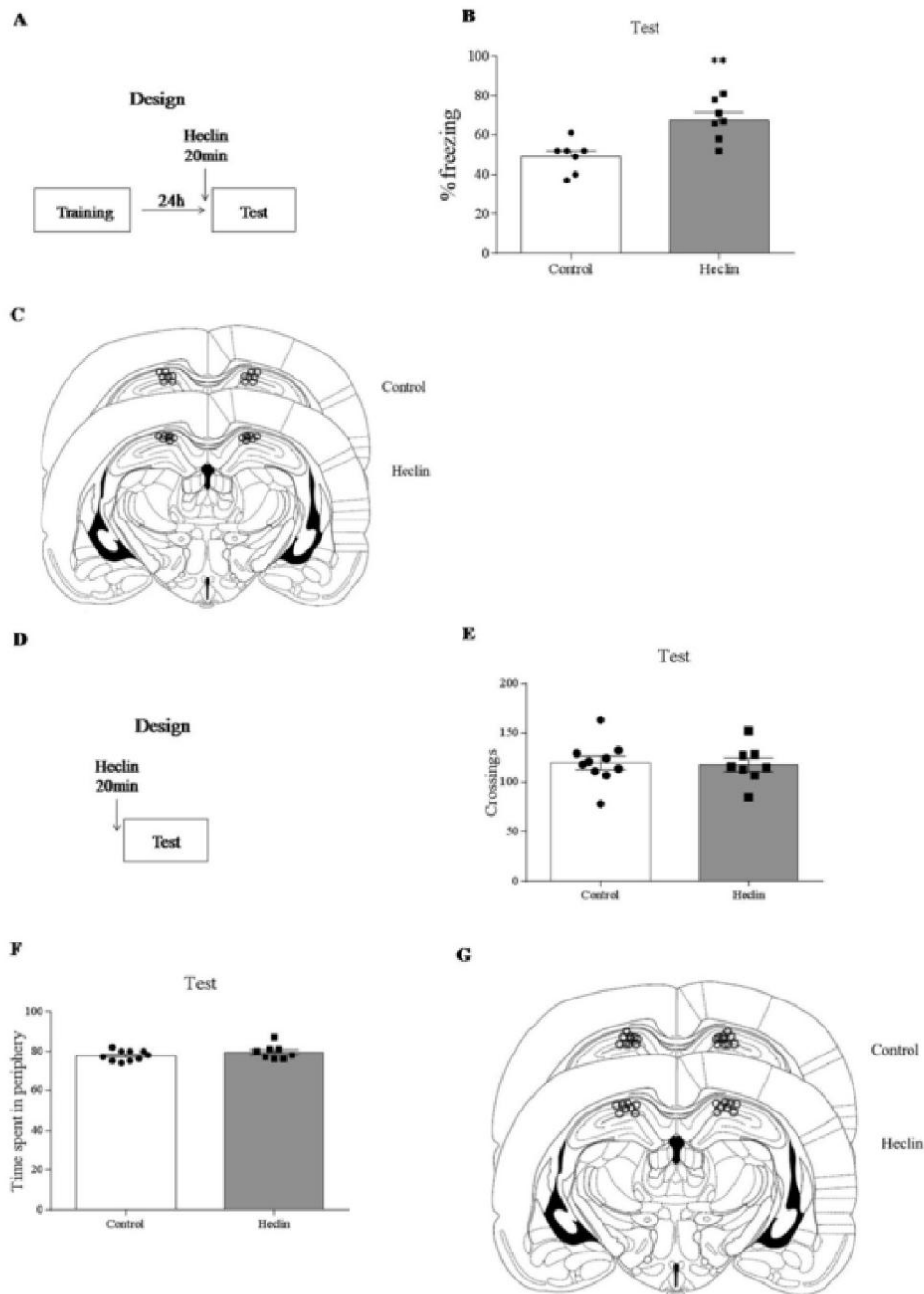


Fig. 2. Hippocampal heclin administration (4.25 ng/side) facilitates retrieval but does not change locomotor activity and anxiety-like behavior. Experimental designs (A and D) and positions of cannula tips (C and G) for CFC memory retrieval and circular arena evaluation, respectively, are shown. (B) Bars and error bars indicate FB mean \pm SEM, and scattered geometric figures represent each individual freezing behavior in CFC test session. For the exploratory behavior in the circular arena, bars and error bars indicate crossings (E) and thigmotaxis (F) mean \pm SEM, and scattered geometric figures represent respective individual values. Double asterisk indicates $p < 0.01$. Group sizes are shown in the text. Drawings at the coronal plane -4.16 mm were adapted from the literature (Paxinos, 1998).

B). Animals treated with heclin immediately after the CFC reactivation test expressed more freezing levels than controls in the test session (Student's t test; $t_{(10)} = 9.17$; $p < 0.0001$; Fig. 3C). N per group was

6. However, if animals received heclin at the same time (24 h after training) without reactivating CFC memory, no between-group difference in FB was found in the test session (Student's t test; $t_{(15)} = 0.39$;

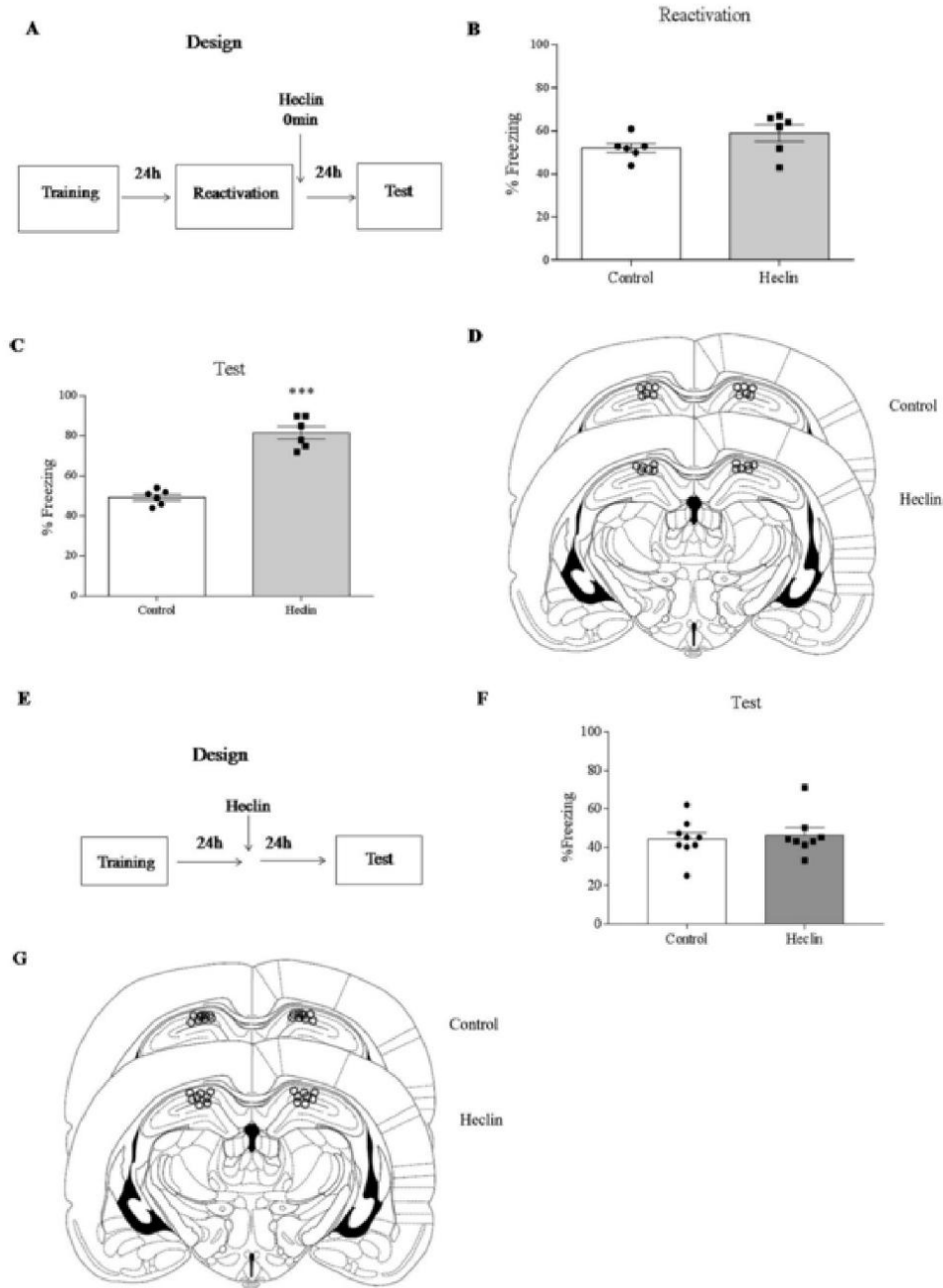


Fig. 3. Hippocampal heclin (4.25 ng/side) administered 24 h after training increases freezing behavior only after a 5-min reactivation session. Experimental designs (A and E), positions of the cannula tips (D and G), and graphs showing freezing behavior (B, C and F) in the evaluation of memory reconsolidation are shown. Bars and error bars indicate FB mean \pm SEM, and scattered geometric figures represent each individual FB in the reactivation (B) and test session (C) of the first experiment, or in the test session carried out without previous reactivation (F). Triple asterisk indicates $p < 0.001$ (Student's *t* test). Group sizes are shown in text. Drawings at the coronal plane -1.16 mm were adapted from the literature (Paxinos, 1998).

$p = 0.6964$; Fig. 3F). N per group was 9 and 8 for control and heclin groups, respectively. These results indicate that HECT ligases are involved in fear memory reconsolidation.

There was a main GROUP and a main TIME effect of heclin infusion 20 min before a 30-min reactivation session on FB (repeated-meas-

ure two-way ANOVA: $F(1, 13) = 71, p < 0.0001$ and $F(5, 65) = 8.1, p < 0.0001$, respectively). There was also an interaction between factors ($F(5, 65) = 5.856; p = 0.0002$), and all time points revealed a between-group difference (see Fig. 4B for more details). Treated animals expressed more freezing levels than controls in the CFC test session car-

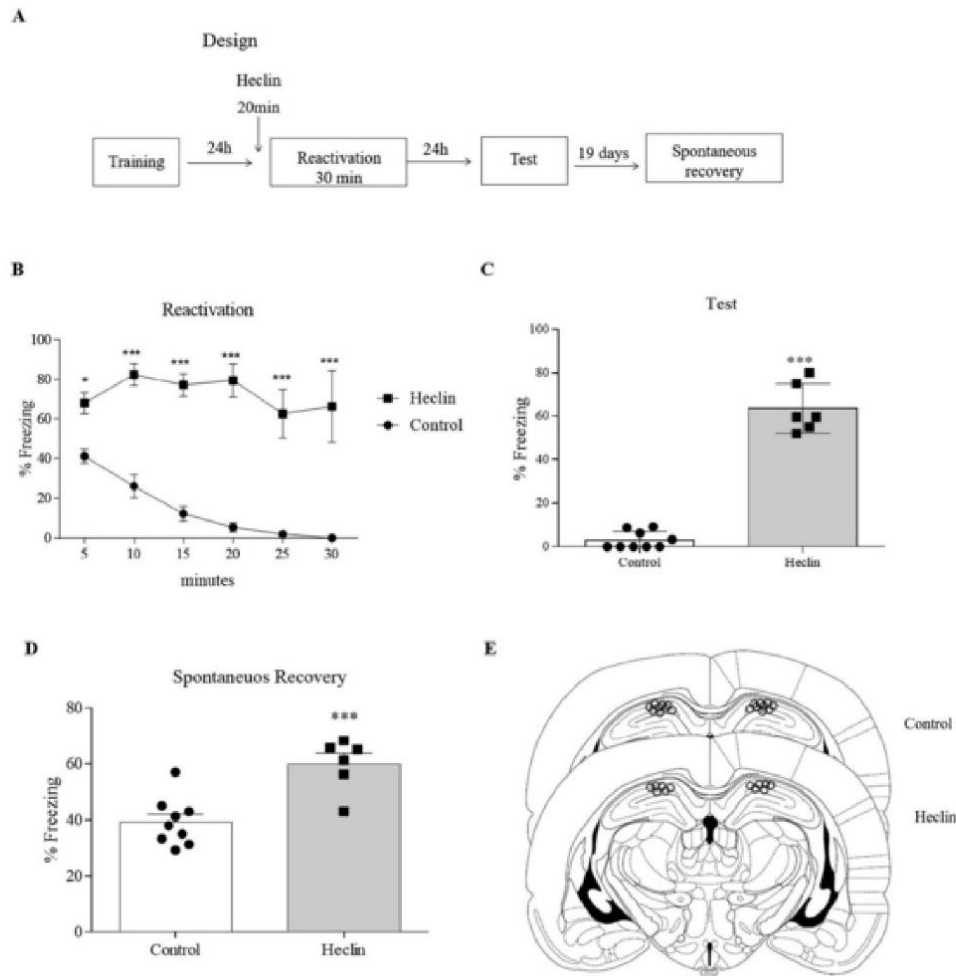


Fig. 4. Hippocampal heclin (4.25 ng/side) administration inhibits memory extinction. (A) Experimental design for extinction. (B) Geometric figures and error bars indicate FB mean \pm SEM from 5 min intervals in a 30 min reactivation session. Bars and error bars indicate FB mean \pm SEM, and scattered geometric figures represent individual FB in test sessions carried out 24 h (C) and 19 days (D) after the extinction session, the latter being a spontaneous recovery of 4 min. (E) Drawings adapted from the literature (Paxinos, 1998) show the positions of cannula tips at the coronal plane -4.16 mm. Single and triple asterisk indicates $p < 0.01$ and < 0.001 , respectively (B – Bonferroni's post hoc test; C – Student's t test). Group sizes are shown in text.

ried out 24 h after the extinction session (Student's t test; $T_{(13)} = 14.96$; $p < 0.0001$; Fig. 4C) and in the spontaneous recovery test session carried out 19 days after the extinction session (Student's t test; $T_{(13)} = 4.44$; $p < 0.001$; Fig. 4D), since they maintained high freezing levels. N per group was 9 and 6 for control and heclin groups, respectively. These results indicate that HECT ligase inhibition impairs fear memory extinction.

Schematic drawings (Fig. 1C, 1F, 2C, 2G, 3D, 3G and 4E) adapted from the literature (Paxinos, 1998) show the position of the cannula tips in each experiment.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study that evaluates the effect of an ubiquitin-protein HECT E3 ligase inhibitor on contextual fear memory. Our results show that intrahippocampal heclin infusion improves STM and memory consolidation, retrieval, and reconsolidation. In addition, it impairs extinction and has no effect on locomotor activity or anxiety-like behavior.

Memory relies on activity-dependent synaptic plasticity that changes the dynamic trafficking of synaptic AMPAR (Makino & Malinow, 2009, Pozo & Goda, 2010, Huganir & Nicoll, 2013) and post-translational modifications (Anggono & Huganir, 2012, Lu & Roche, 2012). Neuronal activity-induced ubiquitination is involved in both synaptic formation and elimination (DiAntonio & Hicke, 2004, Hamilton, Oh et al., 2012, Erturk, Wang et al., 2014). There is compelling evidence to indicate that memory strength relies on surface hippocampal AMPAR levels (Wenthold, Petralia et al., 1996, Song & Huganir, 2002, Isaac, Ashby et al., 2007, Shepherd & Huganir, 2007, Makino & Malinow, 2009). Since Nedd4 reduces surface AMPAR by promoting its endocytosis via ubiquitination (Schwarz, Hall et al., 2010, Lin, Hou et al., 2011, Scudder, Goo et al., 2014, Widagdo, Chai et al., 2015, Widagdo, Guntupalli et al., 2017), the expected result of Nedd4 inhibition would be the increase of surface AMPAR levels and, then, memory facilitation.

Here we show that intrahippocampal heclin infusion enhances STM. Similarly, synaptic proteolysis inhibition enhances an early phase of LTP through the stabilization of proteins locally translated from pre-ex-

isting mRNAs (Dong, Upadhyaya et al., 2008). According to our results, intrahippocampal heclin administration not only improved STM but also memory consolidation. It is important to mention that proteasome inhibition blocks the late, maintenance phase of LTP in Aplysia (Upadhyaya, Smith et al., 2004, Dong, Upadhyaya et al., 2008), since nuclear repressor proteolysis is essential for promoting gene expression and, then, LTM (Dong, Upadhyaya et al., 2008). Therefore, it is unlikely that heclin induced nuclear repressor proteolysis, such as that of CREB1b, the PKA regulatory subunit, or IkappaB, otherwise memory would be impaired. For instance, the proteolysis of IkappaB occurs when the proteasome inhibitor lactacystin is infused into the rat hippocampus and impairs memory consolidation in an inhibitory avoidance task (Lopez-Salon, Alonso et al., 2001). All of this suggests a complex role played by the ubiquitin system in memory. Synaptic proteolysis inhibition may enhance STM and LTM by increasing surface AMPAR levels. Inhibiting autophagy might also contribute to keep AMPAR levels elevated, since these processes seem to be associated (Shehata & Inokuchi, 2014, Shehata, Abdou et al., 2018). Interestingly, Nedd4 malfunction leads to a defective or downregulated autophagic process (Li, Zhang et al., 2015). Therefore, it is likely that heclin strengthened memory consolidation by inhibiting Nedd4-mediated AMPAR endocytosis and/or inhibiting autophagy. It is important to mention that contextual fear memory enhancement is also found in mice lacking the ubiquitin ligase TRIM3 (Trim3^{-/-}), but it occurs 2 but not 24 h after training (Schreiber, Vegh et al., 2015).

There is compelling evidence to indicate that memory retrieval is not as passive as traditionally thought (Szapiro, Izquierdo et al., 2000, Abel & Lattal, 2001, Hall, Thomas et al., 2001, Lopez, Gamache et al., 2015). AMPAR activation in the hippocampus and amygdala is necessary for memory retrieval (Izquierdo, Quillfeldt et al., 1997, Ben Mamou, Gamache et al., 2006). Protein synthesis inhibitors such as anisomycin and rapamycin infused into the amygdala 10 min before memory retrieval transiently impairs memory expression, an effect that is prevented by AMPAR endocytosis inhibition (Lopez, Gamache et al., 2015). This indicates that such a 10-min interval is enough to affect memory retrieval and that AMPAR turnover is surprisingly fast (Bats, Groc et al., 2007, Choquet, 2010, Lopez, Gamache et al., 2015). In addition, surface NMDAR regulation by Nedd4-1 might require a shorter time scale than that of AMPAR (Goo, Scudder et al., 2015). This might also be the case for other synaptic proteins. Therefore, it is likely that heclin strengthened memory retrieval by inhibiting receptor endocytosis and/or modulating the PI3K/Akt pathway and autophagy. Further studies may clarify this.

Our results also show that heclin strengthens memory reconsolidation, but only when there is a short reactivation session before its administration. Ubiquitination increases at synapses during reconsolidation (Orsi, Devulapalli et al., 2018), affecting intracellular trafficking (Sun & Chen, 2004, Erpapazoglou, Walker et al., 2014, Akutsu, Dikic et al., 2016). During reconsolidation an abrupt exchange of AMPAR that are impermeable (CI-AMPA) to those that are permeable to Ca²⁺ (CP-AMPA) occurs, making memory labile again (Hong, Kim et al., 2013). Considering that memory strengthening induced by reconsolidation requires AMPAR trafficking (Rao-Ruiz, Rotaru et al., 2011) and that Nedd4 induces CP-AMPA endocytosis (Lin, Hou et al., 2011, Mund, 2014), it is possible that one of the effects of heclin in reconsolidation is the increase of surface AMPAR levels. Heclin-mediated autophagy inhibition might also be involved, since it can also act in AMPAR trafficking regulation (Shehata & Inokuchi, 2014, Shehata, Abdou et al., 2018).

In fear memory extinction, a new memory is formed in order to antagonize the previous fear memory (Morgan, Romanski et al., 1993, Quirk & Mueller, 2008). The balance between both memories determines behavior, and freezing levels tend to return to be relatively high during a spontaneous recovery session carried out weeks later. Heclin impaired memory extinction when administered before the 30-min reactivation (extinction) session, since treated animals presented

higher levels of freezing relative to controls not only in this session, but also in the test sessions carried out 1 or 20 days later. Interestingly, AMPA receptor endocytosis blockade also impairs memory extinction (Dalton, Wang et al., 2008). It is worth to mention that the involvement in memory extinction of another E3 ligase, APC/C-Cdh1, has already been shown in neuron-specific enolase-Cdh1 knockout mice (Pick, Wang et al., 2013).

The lack of effect of heclin administration into the hippocampus on locomotor activity or anxiety-like behavior indicates the notion that memory rather than other processes are affected by hippocampal E3 ligases. Other studies directly or indirectly reinforce this notion, since Trim3^{-/-} and Trim2^{-/-} mice also do not show any of these alterations (Schreiber, Vegh et al., 2015), as well as blockade of AMPAR endocytosis does not induce anxiety-like behavior (Dalton, Wang et al., 2008). Therefore, putative Nedd4-mediated effects on dendritic remodeling or surface AMPAR levels may be related to memory rather than to other cognitive functions.

As already mentioned, heclin also inhibits HECT E3 ubiquitin ligases Smurf2 and WWP1. Therefore, we may not rule out the involvement of these ligases in fear memory. However, there is sparse if any direct evidence to indicate this. Smurf2 and WWP1 are involved in cell development or in the immune response (Pan, Li et al., 2014, Nyati, Masuda et al., 2017), however their involvement in synaptic plasticity in mature neurons is not yet known. It might happen considering, for instance, the role of the immunological system in memory consolidation (Rachal Pugh, Fleshner et al., 2001, Yirmiya & Goshen, 2011). However, such a body of very indirect evidence indicates that it is very likely that the effects on memory found here are due to an effect of heclin on Nedd4 rather than on Smurf2 and WWP1.

It is interesting to mention that the involvement of Nedd4 is not restricted to memory, but also occurs in chronic stress (Wei, Xiong et al., 2016), epilepsy (Wu, Peng et al., 2015, Zhu, Lee et al., 2017), or may also occur in degenerative diseases, such as Alzheimer's, since AMPAR ubiquitination mediates synaptic depression induced by insoluble aggregates of extracellular beta-amyloid peptides (Rodrigues, Scudder et al., 2016, Guntupalli, Jang et al., 2017).

In summary, our results show that heclin, an ubiquitin-protein HECT E3 ligase, improves STM and consolidation, retrieval, and reconsolidation of fear conditioning memory, but impairs its extinction and has no effect on locomotor activity or anxiety-like behavior when infused into the hippocampus. Our work also opens new interesting possibilities to investigate the underlying mechanisms involved in the effect of heclin on memory and to relate them to other subjects of clinical relevance.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian government agency CAPES and CNPq/INCT (465671/2014-4). The authors acknowledge Isabel Cristina Marques for her kind technical assistance.

References

- Abel, T., & Lattal, K.M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(2), 180–187.
- Akutsu, M., Dikic, I., & Brenn, A. (2016). Ubiquitin chain diversity at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(5), 875–880.
- Anggono, V., & Huganir, R.L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 461–469.
- Bats, C., Groc, L., & Choquet, D. (2007). The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron*, 53(5), 719–734.
- Ben Mamou, C., Gamache, K., & Nader, K. (2006). NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1237–1239.
- Blanchard, R.J., & Blanchard, D.C. (1969). Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 68(1), 129–135.
- Chen, X., Garelick, M.G., Wang, H., Li, V., Athos, J., & Storm, D.R. (2005). PI3 kinase signaling is required for retrieval and extinction of contextual memory. *Nature Neuroscience*, 8(7), 925–931.
- Choquet, D. (2010). Fast AMPAR trafficking for a high-frequency synaptic transmission. *European Journal of Neuroscience*, 32(2), 250–260.

- Dalton, G L, Wang, Y T, Floresco, S B, & Phillips, A G (2008). Disruption of AMPA receptor endocytosis impairs the extinction, but not acquisition of learned fear. *Neuropsychopharmacology*, 33(10), 2416–2426.
- De Oliveira Alvares, I, Crestani, A P, Cassini, L F, Haubrich, J, Santana, F, & Quillfeldt, J A (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: Exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, 244, 42–48.
- DiAntonio, A, & Hicke, L (2004). Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 223–246.
- Dong, C, Upadhyay, S C, Ding, L, Smith, T K, & Hegde, A N (2008). Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. *Learning & Memory*, 15(5), 335–347.
- Erpapazoglou, Z, Walker, O, & Hagenauer-Tsapis, R (2014). Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking. *Cells*, 3(4), 1027–1088.
- Erturk, A, Wang, Y, & Sheng, M (2014). Local pruning of dendrites and spines by caspase 3 dependent and proteasome limited mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 34(5), 1672–1688.
- Fu, A K, Hung, K W, Fu, W Y, Shen, C, Chen, Y, Xia, J, ... Ip, N Y (2011). APC(Cdh1) mediates EphA4-dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity. *Nature Neuroscience*, 14(2), 181–189.
- Glickman, M H, & Ciechanover, A (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*, 82(2), 373–428.
- Goo, M S, Scudder, S L, & Patrick, G N (2015). Ubiquitin-dependent trafficking and turnover of ionotropic glutamate receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8, 60.
- Guntupalli, S, Jang, S E, Zhu, T, Haganir, R L, Widagdo, J, & Anggono, V (2017). GluA1 subunit ubiquitination mediates amyloid beta induced loss of surface alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(20), 8186–8194.
- Hall, J, Thomas, K L, & Everitt, B J (2001). Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 13(7), 1453–1458.
- Hamilton, A M, Oh, W C, Vega Ramirez, H, Stein, I S, Hell, J W, Patrick, G N, & Zito, K (2012). Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome. *Neuron*, 74(6), 1023–1030.
- Haubrich, J, Crestani, A P, Cassini, L F, Santana, F, Sierra, R O, Alvares Lde, O, & Quillfeldt, J A (2015). Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*, 40(2), 315–326.
- Hegde, A N (2010). Ubiquitin-Dependent Protein Degradation. *Comprehensive Natural Products II* (pp. 699–752). Elsevier.
- Hegde, A N (2010). The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. *Learning & Memory*, 17(7), 314–327.
- Hershko, A, & Ciechanover, A (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 425–479.
- Hong, I, Kim, J, Kim, J, Lee, S, Ko, H G, Nader, K, ... Choi, S (2013). AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(20), 8218–8223.
- Hou, Q, Gilbert, J, & Man, H Y (2011). Homeostatic regulation of AMPA receptor trafficking and degradation by light-controlled single-synaptic activation. *Neuron*, 72(5), 806–818.
- Hsia, H E, Kumar, R, Luca, R, Takeda, M, Courchet, J, Nakashima, J, ... Kawabe, H (2014). Ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 acts as a downstream target of PI3K/PTEEN/nTORC1 signaling to promote neurite growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(36), 13205–13210.
- Huganir, R L, & Nicoll, R A (2013). AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron*, 80(3), 704–717.
- Isaac, J T, Ashby, M C, & McBain, C J (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*, 54(6), 859–871.
- Izquierdo, I, Barros, D M, Mello e Souza, T, de Souza, M M, Izquierdo, I A, & Medina, J H (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393(6686), 635–636.
- Izquierdo, I, Quillfeldt, J A, Zanatta, M S, Quevedo, J, Schaeffer, E, Schmitz, P K, & Medina, J H (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*, 9(4), 786–793.
- Jarome, T J, Ferrara, N C, Kwapis, J L, & Helmstetter, F J (2016). CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 128, 103–109.
- Jarome, T J, Werner, C T, Kwapis, J L, & Helmstetter, F J (2011). Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the Amygdala. *PLoS ONE*, 6(9), e24349.
- Kuang, E, Qi, J, & Ronai, Z (2013). Emerging roles of E3 ubiquitin ligases in autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(9), 453–460.
- Lee, J L (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*, 11(11), 1264–1266.
- Lee, S H, Choi, J H, Lee, N, Lee, H R, Kim, J I, Yu, N K, ... Kaang, B K (2008). Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*, 319(5867), 1253–1256.
- Li, Y, Zhang, L, Zhou, J, Luo, S, Huang, R, Zhao, C, & Diao, A (2015). Nedd4 E3 ubiquitin ligase promotes cell proliferation and autophagy. *Cell Proliferation*, 48(3), 338–347.
- Lin, A, Hou, Q, Jarzylo, I, Amato, S, Gilbert, J, Shang, F, & Man, H Y (2011). Nedd4-mediated AMPA receptor ubiquitination regulates receptor turnover and trafficking. *Journal of Neurochemistry*, 119(1), 27–39.
- Lopez Salom, M, Alonso, M, Vianna, M R, Viola, H, Mello e Souza, T, Izquierdo, I, ... Medina, J H (2001). The ubiquitin proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *European Journal of Neuroscience*, 14(11), 1820–1826.
- Lopez Salom, M, Alonso, M, Vianna, M R, M, Viola, H, Souza, T M E, Izquierdo, I, ... Medina, J H (2001). The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *European Journal of Neuroscience*, 14(11), 1820–1826.
- Lopez, J, Gamache, K, Schneider, R, & Nader, K (2015). Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *Journal of Neuroscience*, 35(6), 2465–2475.
- Lu, W, & Roche, K W (2012). Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 470–479.
- Lussier, M P, Herrring, B E, Nasu-Nishimura, Y, Neutzner, A, Karbowski, M, Youle, R J, ... Roche, K W (2012). Ubiquitin ligase RNF167 regulates AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), 19426–19431.
- Makino, H, & Malinow, R (2009). AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: The role of lateral movement and exocytosis. *Neuron*, 64(3), 381–390.
- McGaugh, J L (2000). Memory—a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248–251.
- Morgan, M A, Romanski, I M, & LeDoux, J E (1993). Extinction of emotional learning: Contribution of medial prefrontal cortex. *Neuroscience Letters*, 163(1), 109–113.
- Mund (2014). Peptide and small molecule inhibitors of HECT-type ubiquitin ligases.
- Nader, K, Schafe, G E, & Le Doux, J E (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726.
- Nyati, K K, Masuda, K, Zaman, M M, Dubey, P K, Millrine, D, Chalise, J P, ... Kishimoto, T (2017). TLR4-induced NF-kappaB and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. *Nucleic Acids Research*, 45(5), 2687–2703.
- Orsi, S A, Devulapalli, R K, Nelsen, J L, McFadden, T, Surineni, R, & Jarome, T J (2018). Distinct subcellular changes in proteasome activity and linkage specific protein polyubiquitination in the amygdala during the consolidation and reconsolidation of a fear memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 157, 1–11.
- Pan, Y, Li, R, Meng, J L, Mao, H T, Zhang, Y, & Zhang, J (2014). Smurf2 negatively modulates RIG-I-dependent antiviral response by targeting VISA/MAVS for ubiquitination and degradation. *Journal of Immunology*, 192(10), 4758–4764.
- Paxinos, G W, & Charles (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates (4th ed.). Academic Press.
- Pavlov, I (1927). *Conditioned Reflexes*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Pick, J E, Wang, L, Mayfield, J E, & Klann, E (2013). Neuronal expression of the ubiquitin E3 ligase APC/C Cdh1 during development is required for long term potentiation, behavioral flexibility, and extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 100, 25–31.
- Pozo, K, & Goda, Y (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, 66(3), 337–351.
- Quirk, G J, & Mueller, D (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 56–72.
- Rachal Pugh, C, Fleshner, M, Watkins, L R, Maier, S F, & Rudy, J W (2001). The immune system and memory consolidation: A role for the cytokine IL-1beta. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(1), 29–41.
- Rao-Ruiz, P, Rotaru, D C, van der Loo, R J, Mansvelde, H D, Stiedl, O, Smit, A B, & Spijker, S (2011). Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nature Neuroscience*, 14(10), 1302–1308.
- Rodrigues, E M, Scudder, S L, Goo, M S, & Patrick, G N (2016). Abeta induced synaptic alterations require the E3 ubiquitin ligase Nedd4-1. *Journal of Neuroscience*, 36(5), 1590–1595.
- Scheffner, M, & Kumar, S (2014). Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: Biological and pathophysiological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(1), 61–74.
- Schreiber, J, Vegh, M J, Dawitz, J, Kroon, T, Loos, M, Labonte, D, ... Van Kesteren, R E (2015). Ubiquitin ligase TRIM3 controls hippocampal plasticity and learning by regulating synaptic gamma actin levels. *Journal of Cell Biology*, 211(3), 569–586.
- Schwarz, L A, Hall, B J, & Patrick, G N (2010). Activity dependent ubiquitination of GluA1 mediates a distinct AMPA receptor endocytosis and sorting pathway. *Journal of Neuroscience*, 30(49), 16718–16729.
- Scudder, S L, Goo, M S, Cartier, A E, Molteni, A, Schwarz, L A, Wright, R, & Patrick, G N (2014). Synaptic strength is bidirectionally controlled by opposing activity dependent regulation of Nedd4-1 and USP8. *Journal of Neuroscience*, 34(50), 16637–16649.
- Shehata, M, Abdou, K, Choko, K, Matsuo, M, Nishizono, H, & Inokuchi, K (2018). Autophagy enhances memory erasure through synaptic destabilization. *Journal of Neuroscience*, 38(15), 3809–3822.
- Shehata, M, & Inokuchi, K (2014). Does autophagy work in synaptic plasticity and memory? *Reviews in the Neurosciences*, 25(4), 543–557.
- Shepherd, J D, & Huganir, R L (2007). The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 613–643.
- Song, I, & Huganir, R L (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 25(11), 578–588.
- Sun, A, Wei, J, Childress, C, Shaw, J H, Peng, K, Shao, G, ... Lin, Q (2017). The E3 ubiquitin ligase NEDD4 is an LC3-interactive protein and regulates autophagy. *Autophagy*, 13(3), 522–537.
- Sun, L, & Chen, Z J (2004). The novel functions of ubiquitination in signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(2), 119–126.
- Szapiro, G, Izquierdo, I, A, Alonso, M, Barros, D, Paratcha, G, Ardenghi, P, ... Izquierdo, I (2000). Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*, 99(1), 1–5.
- Upadhyay, S C, Smith, T K, & Hegde, A N (2004). Ubiquitin-proteasome-mediated CREB repressor degradation during induction of long term facilitation. *Journal of Neurochemistry*, 91(1), 210–219.
- Wang, X, Trotman, I C, Koppie, T, Alimonti, A, Chen, Z, Gao, Z, ... Jiang, X (2007). NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*, 128(1), 129–139.
- Wei, J, Xiong, Z, Lee, J B, Cheng, J, Duffney, I, J, Matas, E, & Yan, Z (2016). Histone modification of Nedd4 ubiquitin ligase controls the loss of AMPA receptors and cognitive impairment induced by repeated stress. *Journal of Neuroscience*, 36(7), 2119–2130.

- Wenthold, R J, Petralia, R S, Blahos, J, II, & Niedzielski, A S (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *Journal of Neuroscience*, 16(6), 1982–1989.
- Widagdo, J, Chai, Y J, Ridder, M C, Chau, Y, Johnson, R C, Sah, P, ... Anggono, V (2015). Activity-dependent ubiquitination of GluA1 and GluA2 regulates AMPA receptor intracellular sorting and degradation. *Cell Reports*, 10(5), 783–795.
- Widagdo, J, Guntupalli, S, Jang, S E, & Anggono, V (2017). Regulation of AMPA receptor trafficking by protein ubiquitination. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 347.
- Wu, L, Peng, J, Kong, H, Yang, P, He, F, Deng, X, ... Yin, F (2015). The role of ubiquitin/Nedd4-2 in the pathogenesis of mesial temporal lobe epilepsy. *Physiology & Behavior*, 143, 104–112.
- Yirmiya, R, & Goshen, I (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(2), 181–213.
- Zhu, J, Lee, K Y, Jewett, K A, Man, H Y, Chung, H J, & Tsai, N P (2017). Epilepsy-associated gene Nedd4-2 mediates neuronal activity and seizure susceptibility through AMPA receptors. *PLoS Genetics*, 13(2), e1006634.

UNCORRECTED PROOF

3. Discussão

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia o efeito de um inibidor da ubiquitina-proteína HECT E3 ligase na memória de medo contextual. Nossos resultados mostram que a infusão intra-hipocampal da heclina melhora a consolidação, reconsolidação e evocação da memória de longa duração, bem como a de curta duração. Além disso, prejudica a extinção e não afeta a atividade locomotora ou o comportamento do tipo ansioso.

A UPP, além de moléculas reguladoras como a PKA, também afeta a transmissão sináptica e a plasticidade sináptica a curta duração, atuando sobre a proteína Dunc-13 em *Drosophila* ([Speese, Trotta, Rodesch, Aravamudan, & Broadie, 2003](#)) e outras proteínas sinápticas vesiculares como syntaxina 1 e RIM1 α ([Chin, Vavalle, & Li, 2002](#)). Muitas das evidências dos papéis pós-sinápticos da UPP na plasticidade sináptica são indiretas. A UPP modula receptores de neurotransmissores, proteínas estruturais e moléculas reguladoras no compartimento pós-sináptico. A endocitose é mediada principalmente pela ligação de uma única molécula de ubiquitina (monoubiquitinação) ou uma cadeia de poliubiquitina ligada à Lys-63 ([Hegde, 2010](#)).

Existem evidências convincentes indicando que a memória é fortalecida pelo aumento do AMPAR na membrana celular no hipocampo ([Makino & Malinow, 2009](#); [Shepherd & Huganir, 2007](#); [Song & Huganir, 2002](#)) e enfraquecida pela diminuição desses receptores ([Isaac, Ashby, & McBain, 2007](#); [Wenthold, Petralia, Blahos, & Niedzielski, 1996](#)). O AMPAR é modificado pelas cadeias de poliubiquitina ligadas à Lys-63 na presença de AMPA e D-APV, um antagonista de NMDAR, e o Nedd4 reduz o AMPAR de superfície promovendo sua endocitose via ubiquitinação ([Lin et al., 2011](#); [Schwarz et al., 2010](#); [Scudder et al., 2014](#); [Jocelyn Widagdo et al., 2015](#); [J. Widagdo et al., 2017](#)). Portanto, é muito provável que a heclina fortaleça a consolidação da memória inibindo a endocitose AMPAR mediada por Nedd4.

No hipocampo dos mamíferos, a inibição do proteassoma com MG132 bloqueia a endocitose induzida pelos agonistas do receptor AMPA ([Patrick, Bingol, Weld, & Schuman, 2003](#)). Além disso, a internalização do receptor AMPA induzida por NMDA é impedida pela inibição de proteassoma. Como os agonistas do NMDA e do AMPA estimulam a

internalização, que por sua vez é inibida pelo proteassoma, é provável que este seja um caso de internalização passiva. Em apoio a esta ideia, foi demonstrado que uma proteína de densidade pós-sináptica PSD-95 é regulada pela degradação mediada pelo sistema UPP ([Colledge et al., 2003](#)). A PSD-95 é um componente pós-sináptico importante, que por meio da interação com outra proteína chamada stargazina fornece um local de acoplamento para os receptores AMPA ([Schnell et al., 2002](#)). A degradação do PSD-95 leva à internalização do receptor AMPA e mutações que bloqueiam a ubiquitinação da PSD-95 bloqueiam a endocitose dos receptores AMPA induzida por NMDA ([Colledge et al., 2003](#)), apoiando ainda mais a papel do proteassoma na diminuição do número de receptores AMPA nos locais sinápticos. Está bem estabelecido que a ativação de AMPARs na ausência de atividade de NMDAR induz a internalização e classificação de AMPAR para endossomos tardios para posterior degradação por lisossomos ([Ehlers, 2000](#)). Juntamente com o fato de que apenas os receptores de superfície sofrem ubiquitinação induzida por agonista ([Jocelyn Widagdo et al., 2015](#)), é plausível que a ubiquitinação de AMPARs esteja envolvida tanto na endocitose quanto na classificação pós-endocítica desses receptores em direção a endossomos tardios. Porém, o papel direto da ubiquitina na degradação endocítica regulada dos receptores AMPA permanece como uma questão em aberto. A UPP provavelmente desempenha um papel amplo na regulação dos receptores de neurotransmissores, tais como os receptores NMDA ([Kato, Rouach, Nicoll, & Brecht, 2005](#)) e também Shank, GKAP e AKAP79 / 150 ([Ehlers, 2003](#)). Há evidências que a UPP regule o formato do espinho dendrítico, reorganizando o citoesqueleto de actina ([Pak & Sheng, 2003](#)).

Existem várias evidências que apoiam a ideia de que a ubiquitinação de GluA1 atue como um sinal endocítico para AMPARs. Isso inclui: (a) a superexpressão de Nedd4-1 nos neurônios, que aumenta a ubiquitinação de GluA1, causa uma redução no número de AMPARs na membrana plasmática ([Lin et al., 2011](#); [Schwarz et al., 2010](#)); (b) “knockdown” mediado por shRNA (short hairpin RNA, da sigla em inglês) de Nedd4-1 aumenta a taxa de internalização GluA1 ([Schwarz et al., 2010](#)); (c) a superexpressão do USP46, que regula negativamente a ubiquitinação de GluA1 ([Huo et al., 2015](#)); e (d) a superexpressão de mutantes deficientes em ubiquitina GluA1-4KR bloqueia a internalização de GluA1 induzida por AMPA ([Lin et al., 2011](#); [Schwarz et al., 2010](#)). Juntos, esses dados sustentam a noção de que a ubiquitinação de AMPARs é necessária e ocorre antes da internalização do receptor ([J. Widagdo et al., 2017](#)).

No mesmo neurônio, é provável que o proteassoma execute tarefas diferentes em diferentes compartimentos subcelulares, resultando em diferentes consequências fisiológicas. Portanto, o bloqueio de diferentes funções do proteassoma durante a indução da memória levaria a efeitos até opostos na força sináptica ([Hegde, 2010](#)). Alguns experimentos mostraram que, tanto no sistema nervoso da *Aplysia* quanto no cérebro do rato, a atividade do proteassoma nos terminais sinápticos é significativamente maior do que a do proteassoma no núcleo ([Djakovic, Schwarz, Barylko, DeMartino, & Patrick, 2009](#); [S. C. Upadhya, Ding, Smith, & Hegde, 2006](#)).

A aplicação do inibidor de proteassoma nas fatias de hipocampo antes da indução de LTP causa um aumento na magnitude da fase inicial de indução, mas uma inibição da fase de manutenção tardia ([Dong et al., 2008](#)). O aumento na fase inicial da LTP tardia (L-LTP, da sigla em inglês) causada pela β -lactona também é impedido pela aplicação anterior da rapamicina ([Gingras, 2001](#)). Essas evidências sugerem que a inibição do proteassoma melhora a fase inicial da L-LTP estabilizando proteínas traduzidas localmente a partir de mRNAs preexistentes ([Dong et al., 2008](#)). Outra possibilidade é que a UPP normalmente ajude na degradação dos repressores transcricionais. Portanto, a inibição do proteassoma resultaria no acúmulo desses repressores, bloqueando assim a transcrição ([Dong et al., 2008](#)). Esses estudos também revelaram a mudança do papel do proteassoma, mesmo em dendritos, por meio da progressão da L-LTP. A aplicação de β -lactona em dendritos isolados também produz o bloqueio da L-LTP dendrítica. Sob essas condições, não há suprimento de RNAm recém-transcrito do corpo celular. Se o inibidor da tradução da anisomicina for aplicado após a aplicação de β -lactona nas fatias de hipocampo, a inibição da fase de manutenção é resgatada ([Dong et al., 2008](#)).

Entre outras proteínas sinápticas, os receptores AMPAR, NMDAR e glutamatérgicos metabotrópicos são diferencialmente ubiquitinados pelas ligases E3 ([Tsai, 2014](#)). A ubiquitinação induzida pela atividade neuronal está envolvida na formação e eliminação de sinapses ([DiAntonio & Hicke, 2004](#); [Erturk, Wang, & Sheng, 2014](#); [Hamilton et al., 2012](#)). Portanto, a coordenação da atividade do proteassoma em neurônios e sinapses é outra forma de regulação proteica ([Tsai, 2014](#)), e isso pode ser obtido pela grande variedade de ligases E3 ([Akutsu, Dikic, & Bremm, 2016](#); [Nakayama & Nakayama, 2006](#); [L. Sun & Chen, 2004](#)). Isso explica por que agir na ubiquitinação usando diferentes agentes pode resultar em efeitos diferentes e até opostos. Por exemplo, a inibição do proteassoma do hipocampo pela

lactacistina prejudica a consolidação da memória em uma tarefa de esquiva inibitória ([Lopez-Salon et al., 2001](#)), um efeito oposto à memória emocional que foi encontrada aqui. Parece que uma ação mais ampla nas ligases E3 tende a ser mais perturbadora, enquanto a ação em certas ligases E3 específicas pode facilitar a memória, conforme indicado pelos nossos resultados. De fato, outro efeito facilitador é encontrado em camundongos sem a ubiquitina ligase TRIM3 (Trim3 - / -), que está envolvida no controle dos níveis de actina. No entanto, a facilitação da memória de medo contextual ocorre quando esta é evocada duas, mas não 24 horas após o treinamento ([Schreiber et al., 2015](#)), indicando que atuar em Nedd4 (ou Smurf2 e WWP1) tem um efeito mais longo que o TRIM3.

A memória depende da plasticidade sináptica dependente de atividade que altera o tráfego dinâmico do AMPAR sináptico ([Huganir & Nicoll, 2013](#); [Makino & Malinow, 2009](#); [Pozo & Goda, 2010](#)), modificações pós-traducionais ([Anggono & Huganir, 2012](#); [Lu & Roche, 2012](#)). A ubiquitinação induzida pela atividade neuronal está envolvida na formação e eliminação sinápticas ([DiAntonio & Hicke, 2004](#); [Erturk et al., 2014](#); [Hamilton et al., 2012](#)). Há evidências convincentes para indicar que a força da memória depende dos níveis de AMPAR na membrana plasmática do neurônios do hipocampo ([Isaac et al., 2007](#); [Makino & Malinow, 2009](#); [Shepherd & Huganir, 2007](#); [Song & Huganir, 2002](#); [Wenthold et al., 1996](#)). Como o Nedd4 reduz os AMPAR da membrana ao promover sua endocitose via ubiquitinação ([Lin et al., 2011](#); [Schwarz et al., 2010](#); [Scudder et al., 2014](#); [Jocelyn Widagdo et al., 2015](#); [J. Widagdo et al., 2017](#)), o resultado esperado da inibição da Nedd4 seria o aumento dos níveis de AMPAR na superfície neuronal e, portanto, a facilitação da memória .

Aqui, mostramos que a infusão intra-hipocampal da heclina melhora a STM. Da mesma forma, a inibição da proteólise sináptica melhora uma fase inicial da LTP por meio da estabilização de proteínas traduzidas localmente a partir de mRNAs preexistentes ([Dong et al., 2008](#)). De acordo com nossos resultados, a administração intra-hipocampal da heclina não apenas melhorou a STM, mas também a consolidação da memória. É importante mencionar que a inibição do proteassoma bloqueia a fase tardia de manutenção da LTP em *Aplysia* ([Dong et al., 2008](#); [S. C. Upadhyay, Smith, & Hegde, 2004](#)), pois a proteólise do repressor nuclear é essencial para promover a expressão gênica e, então, LTM ([Dong et al., 2008](#)). Portanto, é improvável que a proteólise do repressor nuclear seja induzida por heclina, como a do CREB1b, a subunidade reguladora da PKA ou a cinase IkappaB, caso contrário, a memória seria prejudicada. Por exemplo, a proteólise de IkappaB ocorre quando o inibidor de

proteassoma lactacistina é infundido no hipocampo de ratos e prejudica a consolidação da memória em uma tarefa de esquivas inibitória ([Lopez-Salon et al., 2001](#)). Tudo isso sugere um papel complexo desempenhado pelo sistema de ubiquitina na memória. A inibição da proteólise sináptica pode melhorar STM e LTM aumentando os níveis de AMPAR na membrana celular, como anteriormente discutido. Inibir a autofagia também pode contribuir para manter os níveis de AMPAR elevados, uma vez que esses processos parecem estar associados ([Shehata et al., 2018](#); [Shehata & Inokuchi, 2014](#)). Curiosamente, o mau funcionamento do Nedd4 leva a um processo autofágico defeituoso ou enfraquecido ([Y. Li et al., 2015](#)), o que pode indicar o envolvimento da Nedd4 na regulação da autofagia.. Portanto, é provável que a heclina tenha fortalecido a consolidação da memória ao inibir a endocitose do AMPAR mediada por Nedd4 ou ao inibir a autofagia. É importante lembrar que a facilitação da memória contextual de medo também é encontrada em camundongos sem a ubiquitina ligase TRIM3 (Trim3 - / -) ([Schreiber et al., 2015](#)).

Até o momento, podemos apenas especular quais processos de plasticidade sináptica estão envolvidos nesse fortalecimento da consolidação da memória. A inibição da depressão a longa duração (LTD) ou despotenciação parece ser forte candidata aos processos mediados por Nedd4, uma vez que a Nedd-4 está envolvida na redução homeostática da força sináptica ([Fu et al., 2011](#); [Hou et al., 2011](#); [Jewett et al., 2015](#); [Scudder et al., 2014](#)). Além disso, a regulação dos AMPAR de membrana pelas ligases E3 é promovida pelo RNF167 a curta duração e por Nedd4-1 e APCCdh1 em uma escala de tempo mais longa ([Goo, Scudder, & Patrick, 2015](#)). Uma vez que são encontrados efeitos opostos da inibição do proteassoma na LTP hipocampal ([Dong et al., 2008](#); [Fonseca, Vabulas, Hartl, Bonhoeffer, & Nägerl, 2006](#); [Karpova, Mikhaylova, Thomas, Knöpfel, & Behnisch, 2006](#)), os ratos Trim3 - / - têm a LTP aumentada ([Schreiber et al., 2015](#)) e, o mais importante, os ratos nocaute para Nedd4 apresentaram prejuízo à LTP ([Camera et al., 2016](#)), ainda é prematuro excluir um efeito da heclina na LTP.

Existem evidências convincentes para indicar que a evocação da memória não é tão passiva quanto se pensava tradicionalmente ([Abel & Lattal, 2001](#); [Hall, Thomas, & Everitt, 2001](#); [Lopez, Gamache, Schneider, & Nader, 2015](#); [Szapiro et al., 2000](#)). A ativação do AMPAR no hipocampo e na amígdala é necessária para a evocação da memória ([Ben Mamou, Gamache, & Nader, 2006](#); [Izquierdo et al., 1997](#)). Inibidores da síntese de proteínas, como anisomicina e rapamicina, infundidos na amígdala 10 minutos antes da evocação da memória, prejudicam

transitoriamente a expressão da memória, um efeito que é impedido pela inibição da endocitose da AMPAR ([Lopez et al., 2015](#)). Isso indica que esse intervalo de 10 minutos é suficiente para afetar a evocação da memória e que a rotatividade da AMPAR é surpreendentemente rápida ([Bats, Groc, & Choquet, 2007](#); [Choquet, 2010](#); [Lopez et al., 2015](#)). Além disso, a regulação NMDAR de superfície por Nedd4-1 pode exigir uma escala de tempo menor que a de AMPAR ([Goo et al., 2015](#)). Esse também pode ser o caso de outras proteínas sinápticas. Portanto, é provável que a heclina tenha fortalecido a evocação da memória inibindo a endocitose do receptor e/ou modulando a via PI3K/Akt e a autofagia. Estudos adicionais podem esclarecer isso.

Nossos resultados também mostram que a heclina fortalece a reconsolidação de memória, mas somente quando há uma breve sessão de reativação antes de sua administração. A ubiquitinação aumenta nas sinapses durante a reconsolidação ([Orsi et al., 2018](#)), afetando o tráfego intracelular ([Akutsu et al., 2016](#); [Erpapazoglou, Walker, & Hagenauer-Tsapis, 2014](#); [L. Sun & Chen, 2004](#)). Durante a reconsolidação, ocorre uma troca abrupta de AMPAR que são impermeáveis (CI-AMPAR) por aquelas que são permeáveis a Ca^{+2} (CP-AMPAR), tornando a memória instável novamente ([Hong et al., 2013](#)). Considerando que o fortalecimento da memória induzido pela reconsolidação requer tráfego de AMPAR ([Rao-Ruiz et al., 2011](#)) e que Nedd4 induz endocitose por CP-AMPAR ([Lin et al., 2011](#); [Mund, 2014](#)), é possível que um dos efeitos da heclina na reconsolidação seja o aumento dos níveis de AMPAR na superfície. A inibição da autofagia mediada por heclina também pode estar envolvida, uma vez que também pode atuar na regulamentação do tráfego de AMPAR ([Shehata et al., 2018](#); [Shehata & Inokuchi, 2014](#)).

Na extinção da memória do medo, uma nova memória é formada para antagonizar a memória do medo ([Morgan, Romanski, & LeDoux, 1993](#); [Quirk & Mueller, 2008](#)). O equilíbrio entre as duas memórias determina o comportamento, e os níveis de congelamento tendem a voltar a ser relativamente altos durante uma sessão de evocação espontânea realizada semanas depois. Heclina prejudicou a extinção de memória quando administrado antes da sessão de reativação (extinção) de 30 minutos, uma vez que os animais tratados apresentaram níveis mais altos de congelamento em relação aos controles, não apenas na sessão, mas também nas sessões de teste realizadas 1 ou 20 dias depois. Em acréscimo, o bloqueio da endocitose no receptor AMPA também prejudica a extinção da memória ([Dalton et al., 2008](#)). Vale ressaltar que o

envolvimento na extinção de memória de outra ligase E3, a APC / C-Cdh1, já foi demonstrado nos neurônios de camundongos nocaute para enolase-Cdh1 ([Pick, Wang, Mayfield, & Klann, 2013](#)).

A falta de efeito da administração da heclina no hipocampo sobre a atividade locomotora ou o comportamento tipo ansioso indica a noção de que a memória, em vez de outros processos, é afetada pelas ligases E3 do hipocampo. Outros estudos reforçam direta ou indiretamente essa noção, já que os ratos TRIM3 - / - e TRIM2 - / - também não apresentam nenhuma dessas alterações ([Schreiber et al., 2015](#)), assim como o bloqueio da endocitose AMPAR não induz comportamento do tipo ansioso ([Dalton et al., 2008](#)). Portanto, efeitos presumíveis mediados por Nedd4 no remodelamento dendrítico ou nos níveis superficiais de AMPAR poderiam estar relacionados à memória e não à ansiedade, por exemplo.

Como já mencionado, a heclina também inibe Smurf2 e WWP1, outros membros da família HECT de ligases E3 de ubiquitina. Portanto, não podemos descartar o envolvimento dessas ligases na memória do medo. No entanto, existem poucas evidências diretas para indicar isso. Smurf2 e WWP1 estão envolvidos no desenvolvimento celular ou na resposta imune ([Nyati et al., 2017](#); [Pan et al., 2014](#)), no entanto, seu envolvimento na plasticidade sináptica em neurônios maduros ainda não é conhecido. Isso pode acontecer considerando, por exemplo, o papel do sistema imunológico na consolidação da memória ([Rachal Pugh, Fleshner, Watkins, Maier, & Rudy, 2001](#); [Yirmiya & Goshen, 2011](#)). No entanto, esse corpo de evidências muito indiretas indica que é muito provável que os efeitos na memória encontrados aqui sejam devidos a um efeito da heclina na Nedd4, e não na Smurf2 e WWP1.

É interessante mencionar que o envolvimento de Nedd4 não se restringe à memória, mas também ocorre em estresse crônico ([Wei et al., 2016](#)), epilepsia ([Wu et al., 2015](#); [Zhu et al., 2017](#)), ou também pode ocorrer em doenças degenerativas, como a doença de Alzheimer, uma vez que a ubiquitinação AMPAR medeia a depressão sináptica induzida por agregados insolúveis de peptídeos beta-amilóides extracelulares ([Guntupalli et al., 2017](#); [Rodrigues, Scudder, Goo, & Patrick, 2016](#)).

Em resumo, nossos resultados mostram que a heclina, um inibidor de certas enzimas pertencentes à família HECT de ligases E3 de ubiquitina, melhora a STM e a consolidação, evocação e reconsolidação da memória de medo condicionado, mas prejudica sua extinção e

não afeta a atividade locomotora ou o comportamento tipo ansioso quando infundida no hipocampo. Nosso trabalho também abre novas possibilidades interessantes para investigar os mecanismos subjacentes envolvidos no efeito da heclina na memória e relacioná-los com outros assuntos de relevância clínica.

4. Conclusões

4.1 A dose mais efetiva do inibidor das E3 ligases da família HECT, heclina foi 42.5 ng/lado, produzindo um efeito facilitatório na consolidação da memória de medo;

4.2 A inibição das HECT ligases teve um efeito facilitatório na evocação da memória de medo;

4.3 A heclina não teve efeito sobre a atividade locomotora ou o comportamento tipo ansioso;

4.4 As HECT E3 ligases modulam a consolidação da memória de curta duração (STM) adquirida no CAC;

4.5 A inibição das HECT E3 ligases durante o processo de reconsolidação fortalece a memória de medo evocada mais adiante;

4.6 A inibição das HECT E3 ligases causou um prejuízo na formação e consolidação da memória de extinção, esse efeito foi duradouro até 20 dias depois da infusão.

Fase da memória	Efeito
Consolidação longa duração	↑ (até 12h)
Memória curta duração	↑
Evocação	↑
Comp. Tipo ansioso e locomoção	--
Reconsolidação	↑
Extinção	↓
Consolidação BLA	↑
Generalização	--
Consolidação memória neutra	--

Tabela 1. Resumo dos resultados mostrados acima. A seta ↑ indica facilitação da memória, a seta ↓ indica prejuízo e os traços indicam que nenhum efeito foi observado.

5. Perspectivas

5.1 Verificar o efeito da infusão bilateral de heclina intra-CA1 sobre a desestabilização da memória aversiva;

5.2 Verificar o efeito da heclina na LTP e LTD por meio de eletrofisiologia;

5.3 Verificar o efeito da heclina sobre o crescimento de espinhos dendríticos mediante a técnica de DiI;

5.4 Verificar se o efeito da heclina na consolidação de memórias aversivas se mantém quando infundida em outras estruturas encefálicas.

5.5 Verificar os níveis de receptores AMPA na membrana após infusão da heclina.

Referências

Abel, T. (1998). Memory Suppressor Genes: Inhibitory Constraints on the Storage of Long-Term Memory. *Science*, 279(5349), 338-341. doi:10.1126/science.279.5349.338

Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current opinion in neurobiology*, 11(2), 180-187. doi:S0959-4388(00)00194-X [pii]

Akutsu, M., Dikic, I., & Bremm, A. (2016). Ubiquitin chain diversity at a glance. *J Cell Sci*, 129(5), 875-880. doi:10.1242/jcs.183954

Anggono, V., & Huganir, R. L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology*, 22(3), 461-469. doi:10.1016/j.conb.2011.12.006

Bats, C., Groc, L., & Choquet, D. (2007). The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron*, 53(5), 719-734. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.030

Beer-Romero, P., Glass, S., & Rolfe, M. (1997). Antisense targeting of E6AP elevates p53 in HPV-infected cells but not in normal cells. *Oncogene*, 14(5), 595-602. doi:10.1038/sj.onc.1200872

Ben Mamou, C., Gamache, K., & Nader, K. (2006). NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci*, 9(10), 1237-1239. doi:nn1778 [pii]
10.1038/nn1778

Camera, D., Coleman, H. A., Parkington, H. C., Jenkins, T. A., Pow, D. V., Boase, N., . . . Poronnik, P. (2016). Learning, memory and long-term potentiation are altered in Nedd4 heterozygous mice. *Behav Brain Res*, 303, 176-181. doi:10.1016/j.bbr.2016.01.054

Chain, D. G., Casadio, A., Schacher, S., Hegde, A. N., Valbrun, M., Yamamoto, N., . . . Schwartz, J. H. (1999). Mechanisms for Generating the Autonomous cAMP-Dependent

Protein Kinase Required for Long-Term Facilitation in Aplysia. *Neuron*, 22(1), 147-156. doi:10.1016/s0896-6273(00)80686-8

Chen, X., Garelick, M. G., Wang, H., Lil, V., Athos, J., & Storm, D. R. (2005). PI3 kinase signaling is required for retrieval and extinction of contextual memory. *Nat Neurosci*, 8(7), 925-931. doi:10.1038/nn1482

Chin, L.-S., Vavalle, J. P., & Li, L. (2002). Staring, a Novel E3 Ubiquitin-Protein Ligase That Targets Syntaxin 1 for Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35071-35079. doi:10.1074/jbc.m203300200

Choquet, D. (2010). Fast AMPAR trafficking for a high-frequency synaptic transmission. *Eur J Neurosci*, 32(2), 250-260. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07350.x

Colledge, M., Snyder, E. M., Crozier, R. A., Soderling, J. A., Jin, Y., Langeberg, L. K., . . . Scott, J. D. (2003). Ubiquitination Regulates PSD-95 Degradation and AMPA Receptor Surface Expression. *Neuron*, 40(3), 595-607. doi:10.1016/s0896-6273(03)00687-1

Crestani, A. P., Zaccouteguy Boos, F., Haubrich, J., Ordonez Sierra, R., Santana, F., Molina, J. M., . . . Quillfeldt, J. A. (2015). Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Sci Rep*, 5, 13633. doi:srep13633 [pii] 10.1038/srep13633

Dalton, G. L., Wang, Y. T., Floresco, S. B., & Phillips, A. G. (2008). Disruption of AMPA receptor endocytosis impairs the extinction, but not acquisition of learned fear. *Neuropsychopharmacology*, 33(10), 2416-2426. doi:1301642 [pii] 10.1038/sj.npp.1301642

Devrij, F., Fischer, D., Vanleeuwen, F., & Hol, E. (2004). Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Progress in Neurobiology*, 74(5), 249-270. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.10.001

DiAntonio, A., & Hicke, L. (2004). Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annu Rev Neurosci*, 27, 223-246. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144317

Diering, G. H., Nirujogi, R. S., Roth, R. H., Worley, P. F., Pandey, A., & Huganir, R. L. (2017). Homer1a drives homeostatic scaling-down of excitatory synapses during sleep. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6324), 511-515. doi:10.1126/science.aai8355

Djakovic, S. N., Schwarz, L. A., Barylko, B., DeMartino, G. N., & Patrick, G. N. (2009). Regulation of the Proteasome by Neuronal Activity and Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *Journal of Biological Chemistry*, 284(39), 26655-26665. doi:10.1074/jbc.m109.021956

Dong, C., Upadhyay, S. C., Ding, L., Smith, T. K., & Hegde, A. N. (2008). Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 15(5), 335-347. doi:10.1101/lm.984508

Ehlers, M. D. (2000). Reinsertion or Degradation of AMPA Receptors Determined by Activity-Dependent Endocytic Sorting. *Neuron*, 28(2), 511-525. doi:10.1016/s0896-6273(00)00129-x

Ehlers, M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nature Neuroscience*, 6(3), 231-242. doi:10.1038/nn1013

Erpapazoglou, Z., Walker, O., & Haguenuer-Tsapis, R. (2014). Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking. *Cells*, 3(4), 1027-1088. doi:10.3390/cells3041027

Erturk, A., Wang, Y., & Sheng, M. (2014). Local pruning of dendrites and spines by caspase-3-dependent and proteasome-limited mechanisms. *J Neurosci*, 34(5), 1672-1688. doi:10.1523/JNEUROSCI.3121-13.2014

Fioravante, D., Liu, R.-Y., & Byrne, J. H. (2008). The ubiquitin-proteasome system is necessary for long-term synaptic depression in Aplysia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(41), 10245-10256. doi:10.1523/JNEUROSCI.2139-08.2008

Fonseca, R., Vabulas, R. M., Hartl, F. U., Bonhoeffer, T., & Nägerl, U. V. (2006). A Balance of Protein Synthesis and Proteasome-Dependent Degradation Determines the Maintenance of LTP. *Neuron*, *52*(2), 239-245. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.015

Fu, A. K., Hung, K. W., Fu, W. Y., Shen, C., Chen, Y., Xia, J., . . . Ip, N. Y. (2011). APC(Cdh1) mediates EphA4-dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity. *Nat Neurosci*, *14*(2), 181-189. doi:10.1038/nn.2715

Gingras, A. C. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes & Development*, *15*(7), 807-826. doi:10.1101/gad.887201

Glickman. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction.

Goo, M. S., Scudder, S. L., & Patrick, G. N. (2015). Ubiquitin-dependent trafficking and turnover of ionotropic glutamate receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *8*, 60-60. doi:10.3389/fnmol.2015.00060

Guntupalli, S., Jang, S. E., Zhu, T., Haganir, R. L., Widagdo, J., & Anggono, V. (2017). GluA1 subunit ubiquitination mediates amyloid- β -induced loss of surface α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. *The Journal of biological chemistry*, *292*(20), 8186-8194. doi:10.1074/jbc.M116.774554

Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2001). Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur J Neurosci*, *13*(7), 1453-1458.

Hamilton, Andrew M., Oh, Won C., Vega-Ramirez, H., Stein, Ivar S., Hell, Johannes W., Patrick, Gentry N., & Zito, K. (2012). Activity-Dependent Growth of New Dendritic Spines Is Regulated by the Proteasome. *Neuron*, *74*(6), 1023-1030. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.031

Haubrich, J., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Santana, F., Sierra, R. O., Alvares Lde, O., & Quillfeldt, J. A. (2015). Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*, *40*(2), 315-326. doi:npp2014174 [pii]

10.1038/npp.2014.174

Hegde, A. N. (2010). The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. *Learning & Memory*, *17*(7), 314-327. doi:10.1101/lm.1504010

Hegde, A. N., & DiAntonio, A. (2002). Ubiquitin and the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(11), 854-861. doi:10.1038/nrn961

Hegde, A. N., Goldberg, A. L., & Schwartz, J. H. (1993). Regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinases are degraded after conjugation to ubiquitin: a molecular mechanism underlying long-term synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(16), 7436-7440. doi:10.1073/pnas.90.16.7436

Hegde, A. N., Inokuchi, K., Pei, W., Casadio, A., Ghirardi, M., Chain, D. G., . . . Schwartz, J. H. (1997). Ubiquitin C-Terminal Hydrolase Is an Immediate-Early Gene Essential for Long-Term Facilitation in Aplysia. *Cell*, *89*(1), 115-126. doi:10.1016/s0092-8674(00)80188-9

Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry*, *67*(1), 425-479. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425

Hong, I., Kim, J., Lee, S., Ko, H. G., Nader, K., Kaang, B. K., . . . Choi, S. (2013). AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(20), 8218-8223. doi:1305235110 [pii]
10.1073/pnas.1305235110

Hou, Q., Gilbert, J., & Man, H.-Y. (2011). Homeostatic regulation of AMPA receptor trafficking and degradation by light-controlled single-synaptic activation. *Neuron*, *72*(5), 806-818. doi:10.1016/j.neuron.2011.10.011

Hsia, H. E., Kumar, R., Luca, R., Takeda, M., Courchet, J., Nakashima, J., . . . Kawabe, H. (2014). Ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 acts as a downstream target of PI3K/PTEN-mTORC1 signaling to promote neurite growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(36), 13205-13210. doi:10.1073/pnas.1400737111

Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*, 80(3), 704-717. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.025

Hughes, J. R. (1958). Post-tetanic potentiation. *Physiol Rev*, 38(1), 91-113.

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., & Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2563-2567. doi:10.1073/pnas.92.7.2563

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1993). Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Molecular and cellular biology*, 13(2), 775-784. doi:10.1128/mcb.13.2.775

Huo, Y., Khatri, N., Hou, Q., Gilbert, J., Wang, G., & Man, H.-Y. (2015). The deubiquitinating enzyme USP46 regulates AMPA receptor ubiquitination and trafficking. *Journal of Neurochemistry*, 134(6), 1067-1080. doi:10.1111/jnc.13194

Isaac, J. T., Ashby, M. C., & McBain, C. J. (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*, 54(6), 859-871. doi:10.1016/j.neuron.2007.06.001

Izquierdo, I., Quillfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K., & Medina, J. H. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci*, 9(4), 786-793.

Jarome, T. J., Ferrara, N. C., Kwapis, J. L., & Helmstetter, F. J. (2016). CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 128, 103-109. doi:10.1016/j.nlm.2016.01.001

Jarome, T. J., Werner, C. T., Kwapis, J. L., & Helmstetter, F. J. (2011). Activity Dependent Protein Degradation Is Critical for the Formation and Stability of Fear Memory in the Amygdala. *PLoS ONE*, 6(9), e24349. doi:10.1371/journal.pone.0024349

Jewett, K. A., Zhu, J., & Tsai, N.-P. (2015). The tumor suppressor p53 guides GluA1 homeostasis through Nedd4-2 during chronic elevation of neuronal activity. *Journal of Neurochemistry*, 135(2), 226-233. doi:10.1111/jnc.13271

Kandel, E. R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038. doi:10.1126/science.1067020

Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163-186. doi:10.1016/j.cell.2014.03.001

Karpova, A., Mikhaylova, M., Thomas, U., Knöpfel, T., & Behnisch, T. (2006). Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(18), 4949-4955. doi:10.1523/JNEUROSCI.4573-05.2006

Kato, A., Rouach, N., Nicoll, R. A., & Brecht, D. S. (2005). Activity-dependent NMDA receptor degradation mediated by retrotranslocation and ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), 5600-5605. doi:10.1073/pnas.0501769102

Kim, H. T., Kim, K. P., Lledias, F., Kisselev, A. F., Scaglione, K. M., Skowyra, D., . . . Goldberg, A. L. (2007). Certain Pairs of Ubiquitin-conjugating Enzymes (E2s) and Ubiquitin-Protein Ligases (E3s) Synthesize Nondegradable Forked Ubiquitin Chains Containing All Possible Isopeptide Linkages. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17375-17386. doi:10.1074/jbc.m609659200

Kuang, E., Qi, J., & Ronai, Z. (2013). Emerging roles of E3 ubiquitin ligases in autophagy. *Trends Biochem Sci*, 38(9), 453-460. doi:10.1016/j.tibs.2013.06.008

Lee, J. L. (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci*, 11(11), 1264-1266. doi:nn.2205 [pii]

10.1038/nn.2205

Lee, S. H., Choi, J. H., Lee, N., Lee, H. R., Kim, J. I., Yu, N. K., . . . Kaang, B. K. (2008). Synaptic Protein Degradation Underlies Destabilization of Retrieved Fear Memory. *Science*, *319*(5867), 1253-1256. doi:10.1126/science.1150541

Li, W., Bengtson, M. H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V. A., Orth, A., . . . Joazeiro, C. A. P. (2008). Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS ONE*, *3*(1), e1487-e1487. doi:10.1371/journal.pone.0001487

Li, Y., Zhang, L., Zhou, J., Luo, S., Huang, R., Zhao, C., & Diao, A. (2015). Nedd4 E3 ubiquitin ligase promotes cell proliferation and autophagy. *Cell Prolif*, *48*(3), 338-347. doi:10.1111/cpr.12184

Lin, A., Hou, Q., Jarzylo, L., Amato, S., Gilbert, J., Shang, F., & Man, H.-Y. (2011). Nedd4-mediated AMPA receptor ubiquitination regulates receptor turnover and trafficking. *Journal of Neurochemistry*, *119*(1), 27-39. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07221.x

Lopez-Salon, M., Alonso, M., Vianna, M. R. M., Viola, H., E Souza, T. M., Izquierdo, I., . . . Medina, J. H. (2001). The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *European Journal of Neuroscience*, *14*(11), 1820-1826. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01806.x

Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R., & Nader, K. (2015). Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *J Neurosci*, *35*(6), 2465-2475. doi:35/6/2465 [pii]
10.1523/JNEUROSCI.0735-14.2015

Lu, W., & Roche, K. W. (2012). Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Current opinion in neurobiology*, *22*(3), 470-479. doi:10.1016/j.conb.2011.09.008

Lussier, M. P., Herring, B. E., Nasu-Nishimura, Y., Neutzner, A., Karbowski, M., Youle, R. J., . . . Roche, K. W. (2012). Ubiquitin ligase RNF167 regulates AMPA receptor-mediated

synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(47), 19426-19431. doi:10.1073/pnas.1217477109

Lussier, M. P., Nasu-Nishimura, Y., & Roche, K. W. (2011). Activity-dependent ubiquitination of the AMPA receptor subunit GluA2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *31*(8), 3077-3081. doi:10.1523/JNEUROSCI.5944-10.2011

Makino, H., & Malinow, R. (2009). AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron*, *64*(3), 381-390. doi:10.1016/j.neuron.2009.08.035

Marques, A. n. J., Palanimurugan, R., Matias, A. C., Ramos, P. C., & Dohmen, R. J. r. (2009). Catalytic Mechanism and Assembly of the Proteasome. *Chemical Reviews*, *109*(4), 1509-1536. doi:10.1021/cr8004857

Morgan, M. A., Romanski, L. M., & LeDoux, J. E. (1993). Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett*, *163*(1), 109-113.

Mund. (2014). Peptide and small molecule inhibitors of HECT-type ubiquitin ligases.

Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, *406*(6797), 722-726. doi:10.1038/35021052

Nakayama, K. I., & Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*, *6*(5), 369-381. doi:nrc1881 [pii] 10.1038/nrc1881

Nyati, K. K., Masuda, K., Zaman, M. M., Dubey, P. K., Millrine, D., Chalise, J. P., . . . Kishimoto, T. (2017). TLR4-induced NF-kappaB and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. *Nucleic Acids Res*, *45*(5), 2687-2703. doi:10.1093/nar/gkx064

Olzmann, J. A., & Chin, L.-S. (2008). Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination: a signal for targeting misfolded proteins to the aggresome-autophagy pathway. *Autophagy*, *4*(1), 85-87. doi:10.4161/auto.5172

Orsi, S. A., Devulapalli, R. K., Nelsen, J. L., McFadden, T., Surineni, R., & Jarome, T. J. (2018). Distinct subcellular changes in proteasome activity and linkage-specific protein polyubiquitination in the amygdala during the consolidation and reconsolidation of a fear memory. *Neurobiol Learn Mem*, *157*, 1-11. doi:10.1016/j.nlm.2018.11.012

Pak, D. T. S., & Sheng, M. (2003). Targeted Protein Degradation and Synapse Remodeling by an Inducible Protein Kinase. *Science*, *302*(5649), 1368-1373. doi:10.1126/science.1082475

Pan, Y., Li, R., Meng, J. L., Mao, H. T., Zhang, Y., & Zhang, J. (2014). Smurf2 negatively modulates RIG-I-dependent antiviral response by targeting VISA/MAVS for ubiquitination and degradation. *J Immunol*, *192*(10), 4758-4764. doi:10.4049/jimmunol.1302632

Patrick, G. N., Bingol, B., Weld, H. A., & Schuman, E. M. (2003). Ubiquitin-Mediated Proteasome Activity Is Required for Agonist-Induced Endocytosis of GluRs. *Current Biology*, *13*(23), 2073-2081. doi:10.1016/j.cub.2003.10.028

Pick, J. E., Wang, L., Mayfield, J. E., & Klann, E. (2013). Neuronal expression of the ubiquitin E3 ligase APC/C-Cdh1 during development is required for long-term potentiation, behavioral flexibility, and extinction. *Neurobiol Learn Mem*, *100*, 25-31. doi:10.1016/j.nlm.2012.11.005

Pozo, K., & Goda, Y. (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, *66*(3), 337-351. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.028

Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, *33*(1), 56-72. doi:10.1038/sj.npp.1301555

Rachal Pugh, C., Fleshner, M., Watkins, L. R., Maier, S. F., & Rudy, J. W. (2001). The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1beta. *Neurosci Biobehav Rev*, *25*(1), 29-41.

Rao-Ruiz, P., Rotaru, D. C., van der Loo, R. J., Mansvelder, H. D., Stiedl, O., Smit, A. B., & Spijker, S. (2011). Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nat Neurosci*, *14*(10), 1302-1308. doi:10.1038/nn.2907 [pii] 10.1038/nn.2907

Rodrigues, E. M., Scudder, S. L., Goo, M. S., & Patrick, G. N. (2016). A β -Induced Synaptic Alterations Require the E3 Ubiquitin Ligase Nedd4-1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *36*(5), 1590-1595. doi:10.1523/JNEUROSCI.2964-15.2016

Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, *443*(7113), 780-786. doi:10.1038/nature05291

Scheffner, M., & Kumar, S. (2014). Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: Biological and pathophysiological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1843*(1), 61-74. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.024

Scheffner, M., Nuber, U., & Huibregtse, J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, *373*(6509), 81-83. doi:10.1038/373081a0

Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Brecht, D. S., & Nicoll, R. A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(21), 13902-13907. doi:10.1073/pnas.172511199

Schreiber, J., Vegh, M. J., Dawitz, J., Kroon, T., Loos, M., Labonte, D., . . . Van Kesteren, R. E. (2015). Ubiquitin ligase TRIM3 controls hippocampal plasticity and learning by regulating synaptic gamma-actin levels. *J Cell Biol*, *211*(3), 569-586. doi:10.1083/jcb.201506048 [pii] 10.1083/jcb.201506048

Schwarz, L. A., Hall, B. J., & Patrick, G. N. (2010). Activity-dependent ubiquitination of GluA1 mediates a distinct AMPA receptor endocytosis and sorting pathway. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 30(49), 16718-16729.
doi:10.1523/JNEUROSCI.3686-10.2010

Scudder, S. L., Goo, M. S., Cartier, A. E., Molteni, A., Schwarz, L. A., Wright, R., & Patrick, G. N. (2014). Synaptic strength is bidirectionally controlled by opposing activity-dependent regulation of Nedd4-1 and USP8. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(50), 16637-16649. doi:10.1523/JNEUROSCI.2452-14.2014

Shehata, M., Abdou, K., Choko, K., Matsuo, M., Nishizono, H., & Inokuchi, K. (2018). Autophagy Enhances Memory Erasure through Synaptic Destabilization. *J Neurosci*, 38(15), 3809-3822. doi:10.1523/JNEUROSCI.3505-17.2018

Shehata, M., & Inokuchi, K. (2014). Does autophagy work in synaptic plasticity and memory? *Rev Neurosci*, 25(4), 543-557. doi:10.1515/revneuro-2014-0002

Shepherd, J. D., & Huganir, R. L. (2007). The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 613-643. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123516

Song, I., & Huganir, R. L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 25(11), 578-588.

Speese, S. D., Trotta, N., Rodesch, C. K., Aravamudan, B., & Broadie, K. (2003). The Ubiquitin Proteasome System Acutely Regulates Presynaptic Protein Turnover and Synaptic Efficacy. *Current Biology*, 13(11), 899-910. doi:10.1016/s0960-9822(03)00338-5

Sukumaran, M., Penn, A. C., & Greger, I. H. (2012). AMPA Receptor Assembly: Atomic Determinants and Built-In Modulators. In *Synaptic Plasticity* (pp. 241-264): Springer Vienna.

Sun, A., Wei, J., Childress, C., Shaw, J. H. t., Peng, K., Shao, G., . . . Lin, Q. (2017). The E3 ubiquitin ligase NEDD4 is an LC3-interactive protein and regulates autophagy. *Autophagy*, 13(3), 522-537. doi:10.1080/15548627.2016.1268301

Sun, L., & Chen, Z. J. (2004). The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 16(2), 119-126. doi:10.1016/j.ceb.2004.02.005

Szapiro, G., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D., Paratcha, G., Ardenghi, P., . . . Izquierdo, I. (2000). Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*, *99*(1), 1-5.

Trotman, L. C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Yang, H., . . . Pandolfi, P. P. (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell*, *128*(1), 141-156. doi:10.1016/j.cell.2006.11.040

Tsai, N. P. (2014). Ubiquitin proteasome system-mediated degradation of synaptic proteins: An update from the postsynaptic side. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(12), 2838-2842. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.08.006

Upadhyaya, S., & Hegde, A. (2005). Ubiquitin-Proteasome Pathway Components as Therapeutic Targets for CNS Maladies. *Current Pharmaceutical Design*, *11*(29), 3807-3828. doi:10.2174/138161205774580651

Upadhyaya, S. C., Ding, L., Smith, T. K., & Hegde, A. N. (2006). Differential regulation of proteasome activity in the nucleus and the synaptic terminals. *Neurochemistry International*, *48*(4), 296-305. doi:10.1016/j.neuint.2005.11.003

Upadhyaya, S. C., Smith, T. K., & Hegde, A. N. (2004). Ubiquitin-proteasome-mediated CREB repressor degradation during induction of long-term facilitation. *Journal of Neurochemistry*, *91*(1), 210-219. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02707.x

Varshavsky, A. (2001). Proteolysis. In *Encyclopedia of Genetics* (pp. 1573-1575): Elsevier.

Wei, J., Xiong, Z., Lee, J. B., Cheng, J., Duffney, L. J., Matas, E., & Yan, Z. (2016). Histone Modification of Nedd4 Ubiquitin Ligase Controls the Loss of AMPA Receptors and Cognitive Impairment Induced by Repeated Stress. *J Neurosci*, *36*(7), 2119-2130. doi:10.1523/JNEUROSCI.3056-15.2016

Wenthold, R. J., Petralia, R. S., Blahos, J., II, & Niedzielski, A. S. (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci*, *16*(6), 1982-1989.

Widagdo, J., Chai, Y. J., Ridder, M. C., Chau, Y. Q., Johnson, R. C., Sah, P., . . . Anggono, V. (2015). Activity-Dependent Ubiquitination of GluA1 and GluA2 Regulates AMPA Receptor Intracellular Sorting and Degradation. *Cell Reports*, *10*(5), 783-795. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.015

Widagdo, J., Guntupalli, S., Jang, S. E., & Anggono, V. (2017). Regulation of AMPA Receptor Trafficking by Protein Ubiquitination. *Front Mol Neurosci*, *10*, 347. doi:10.3389/fnmol.2017.00347

Wu, L., Peng, J., Kong, H., Yang, P., He, F., Deng, X., . . . Yin, F. (2015). The role of ubiquitin/Nedd4-2 in the pathogenesis of mesial temporal lobe epilepsy. *Physiol Behav*, *143*, 104-112. doi:10.1016/j.physbeh.2015.02.026

Ye, Y., & Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *10*(11), 755-764. doi:10.1038/nrm2780

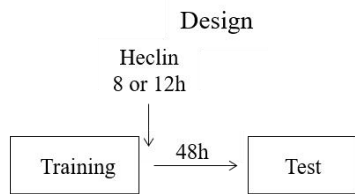
Yirmiya, R., & Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun*, *25*(2), 181-213. doi:10.1016/j.bbi.2010.10.015

Zhu, J., Lee, K. Y., Jewett, K. A., Man, H.-Y., Chung, H. J., & Tsai, N.-P. (2017). Epilepsy-associated gene Nedd4-2 mediates neuronal activity and seizure susceptibility through AMPA receptors. *PLoS genetics*, *13*(2), e1006634-e1006634. doi:10.1371/journal.pgen.1006634

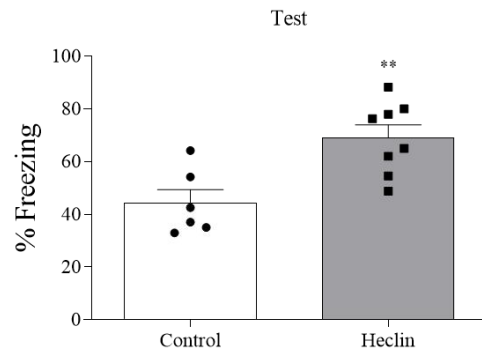
Apêndice

Figure 1

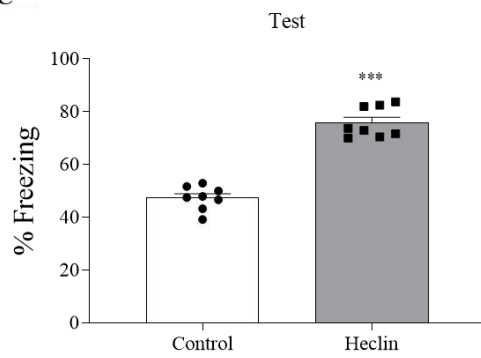
A



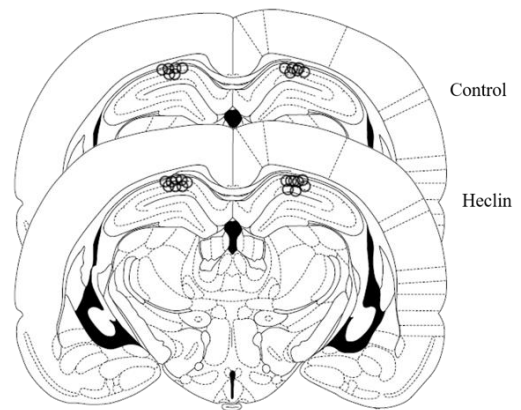
B



C



D



E

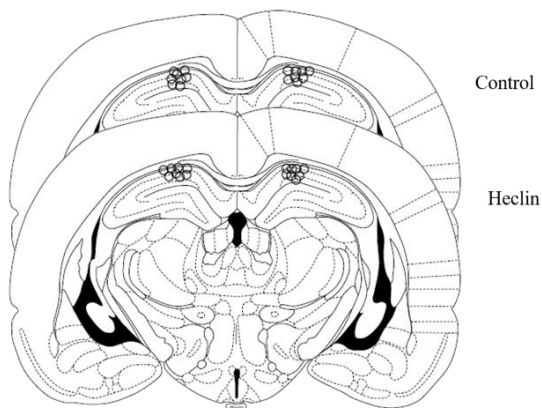


Figure 1. *Heclin facilitates memory consolidation when administered into the hippocampus 8 or 12 hours after training.* We show the experimental design (A), graphs indicating the freezing behavior (B and C for 8 and 12 h, respectively), and the position of the cannula tips (D and E for 8 and 12 h, respectively). Bars and error bars indicate FB mean \pm SEM, and scattered geometric figures represent individual freezing behavior in the test session. The double and triple asterisk indicates $p < 0.01$ and 0.001 , respectively (Student's t-test). N = 6 (control group, 8 hours) and 8 for any other group.

Figure 2

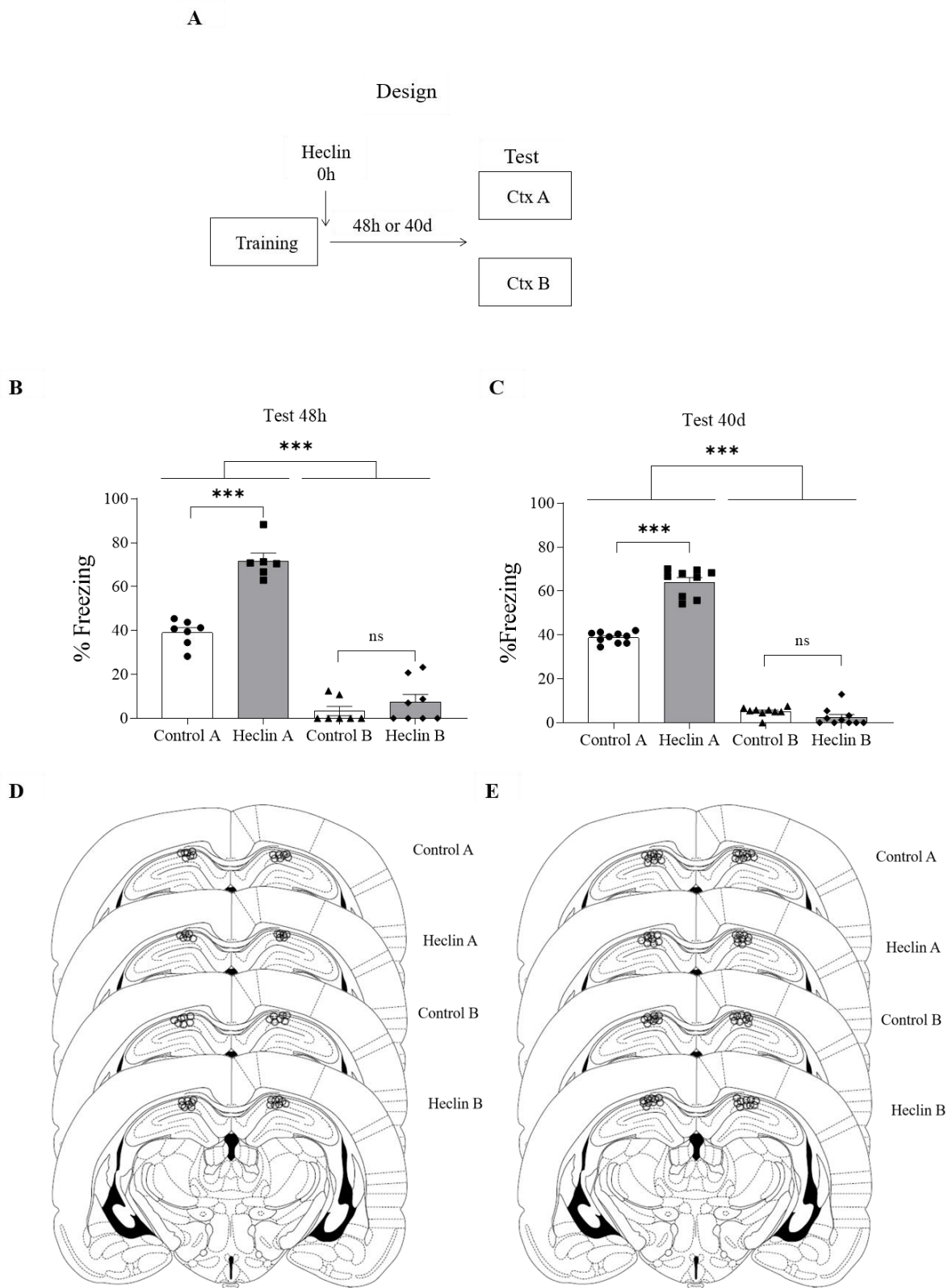


Figure 2. Memory remains precise for 40 days because of hippocampal heclin administration immediately after training. We show the experimental design (A), graphs indicating freezing behavior 48 hours (B) and 40 days (C) after training in the evaluation of memory generalization, and position of the cannula tips (D, E). Bars and error bars indicate FB mean \pm SEM, and scattered geometric figures represent individual freezing behavior in the test session. For 48-hour test: $F(1,24) = 39.13, 289.1,$ and 23.42 for treatment, context, and interaction effect, respectively (two-way ANOVA; $p < 0.001$); $n=7$ and 6 in context A, and 7 and 8 in context B for control and heclin group, respectively. For 40-day test: $F(1,34) = 73.28, 1302,$ and 110.8 for treatment, context, and interaction effect, respectively (two-way ANOVA; $p < 0.001$); $n=10$ and 9 in context A, and 9 and 10 in context B for control and heclin group, respectively. The triple asterisk indicates some of the $p < 0.001$ (Bonferroni's post hoc test); ns indicates otherwise.

Figure 3

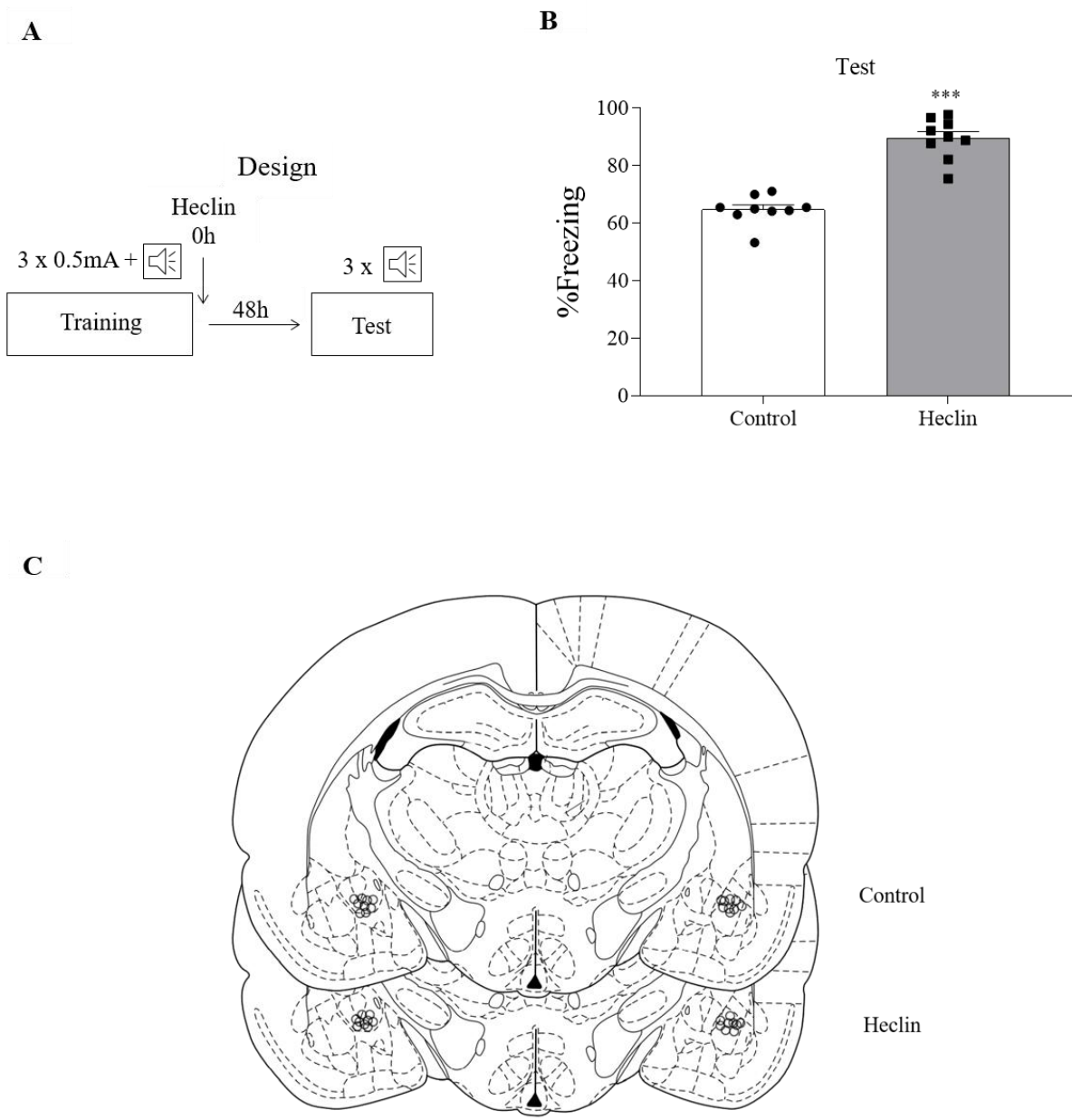
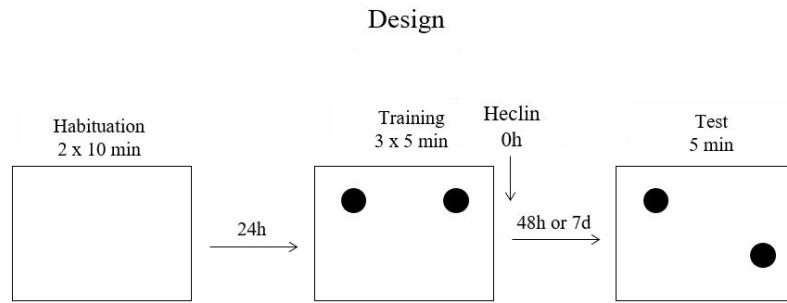


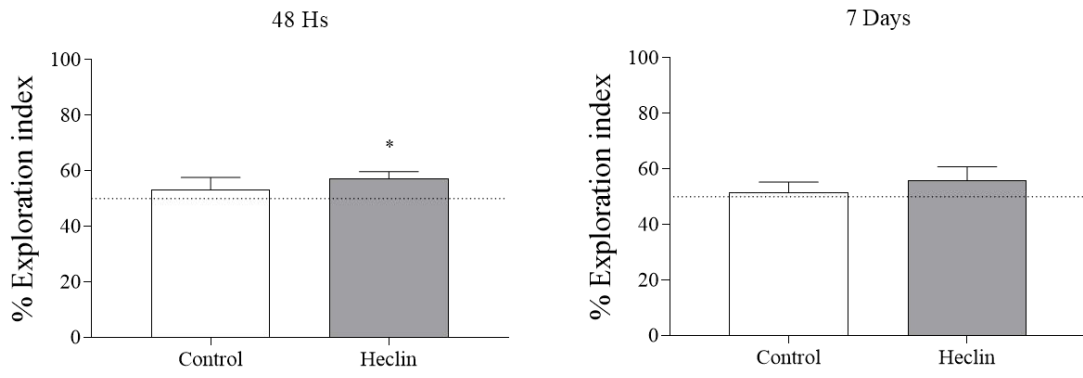
Figure 3. *Heclin facilitates the consolidation of memory for auditory fear conditioning when administered into the basolateral amygdala immediately after training.* We show the experimental design (A), a graph indicating freezing behavior (B), and position of the cannula tips (C) for the evaluation of memory consolidation for auditory fear conditioning. Bars and error bars indicate FB mean \pm SEM, and scattered geometric figures represent individual freezing behavior in the test session. The triple asterisk indicates $p < 0.001$ (Student's t-test; $n = 9$ for control and heclin group).

Figure 4

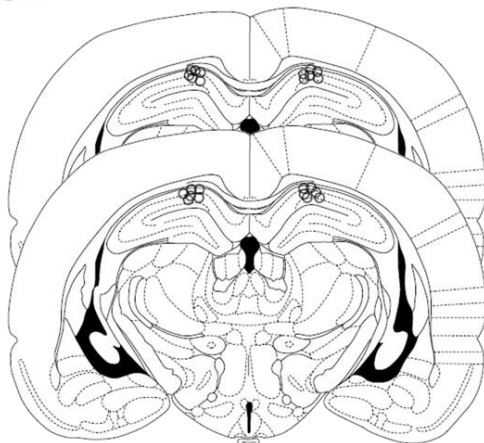
A



B



C



D

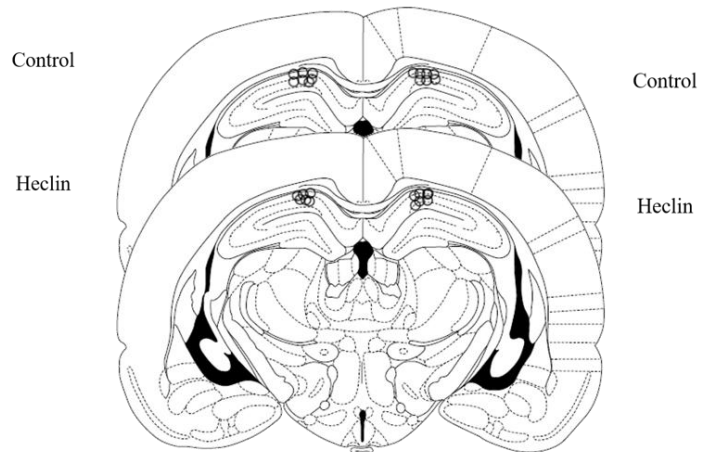


Figure 4. *Heclin might affect the consolidation of memory for the Object Location Task when administered into the hippocampus 48 hours or seven days after training.* We show the experimental design (A), graphs indicating the exploration index (B), and the position of cannula tips (C, D) for the evaluation of memory consolidation for the object location task. Bars and error bars indicate exploration index mean \pm SEM in the test session. The asterisk indicates $p < 0.05$ (one sample t-test). $N = 6$ for both groups in the 48-h experiment and 7 and 6 for control and heclin group, respectively, in the 7-d experiment.

Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*, 88(1), 20-32. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.004

Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163-186. doi:10.1016/j.cell.2014.03.001

Lee, J. L. (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci*, 32(8), 413-420. doi:10.1016/j.tins.2009.05.002

Nader, K., & Einarsson, E. O. (2010). Memory reconsolidation: an update. *Ann N Y Acad Sci*, 1191, 27-41. doi:NYAS5443 [pii]
10.1111/j.1749-6632.2010.05443.x

Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722-726. doi:10.1038/35021052