

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГИСТОНА H3 ПРИ КОНСОЛИДАЦИИ И РЕКОНСОЛИДАЦИИ ПАМЯТИ У МОЛЛЮСКА *HELIX*

К.Г. Шевченко, А.Б. Данилова, Л.Н. Гринкевич

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: larisa_gr_spb@mail.ru

Посттрансляционной модификации гистонов в последние годы отводится важная роль в регуляции экспрессии генов при обучении. В нашей работе моделью обучения являлся условный оборонительный рефлекс пищевой аверзии у моллюска *Helix*. Методом Вестерн-блот анализа изучено фосфорилирование гистона H3 при консолидации и реконсолидации памяти в функционально различных структурах ЦНС. Показано, что при консолидации в церебральном ганглии (осуществляет анализ информации запахов) наблюдается значительное увеличение фосфорилирования гистона H3 спустя 1 и 24 часа после обучения. При реконсолидации фосфорилирование гистона H3 увеличивается недостоверно. В париетовисцеральном ганглии (контролирует оборонительное поведение животных) достоверного увеличения фосфорилирования гистона H3 при обучении не наблюдается. Однако значительное увеличение фосфорилирования происходит при реконсолидации. Таким образом, в структурах, связанных с обработкой условных и безусловных стимулов, динамика фосфорилирования гистона H3 носит различный характер. Предположительно, индуктором фосфорилирования может являться MAPK/ERK каскад. Ранее нами было показано, что дисфункция этого каскада нарушает формирование изучаемого рефлекса. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении модификации гистонов как в процессы консолидации, так и реактивации долговременной памяти у *Helix* и высокой консервативности молекулярных процессов, лежащих в их основе.

Ключевые слова: гистон H3, фосфорилирование, обучение, реконсолидация, Вестерн-блот анализ, моллюск *Helix*.

Введение

Выяснение молекулярно-генетических механизмов обучения и памяти является одной из основных задач фундаментальной нейробиологии. В последние годы было показано, что долговременные механизмы обучения определяются перестройками нейрональных сетей и увеличением эффективности синаптической передачи. Причем формирование долговременных форм обучения невозможно без включения работы генома (Гринкевич, 1992; Alberini *et al.*, 1994; Анохин, 1997; Kandel, 2001). Таким образом, изучение механизмов регуляции экспрессии генов при обучении становится чрезвычайно актуальным. Регуляция экспрессии генов в клетках эукариот осуществляется как через активацию или ингибирование ДНК-

связывающих транскрипционных факторов (ТФ), так и через ремоделирование хроматина (Reul, Chandramohan, 2007). Важнейшую роль в ремоделировании хроматина играют процессы фосфорилирования и ацетилирования гистонов, а также метилирование ДНК (Roth, Sweatt, 2009). В последние годы здесь разворачивается широкий фронт исследований.

Наиболее удобными объектами для изучения молекулярно-клеточных механизмов пластичности являются животные с относительно простой нервной системой, в частности моллюски (Kandel, 2001). В течение многих лет свои исследования мы проводим на моллюске *Helix*. Нами было показано, что при обучении *Helix* происходит активация ряда ТФ, которая в значительной мере индуцируется через внутриклеточный регуляторный каскад MAPK/ERK (Гринкевич и

др., 2001). При этом дисфункция MAPK/ERK предотвращает формирование долговременной памяти (Гринкевич и др., 2006; Grinkevich *et al.*, 2008). Кроме того, у ювенильных животных с незрелыми механизмами формирования долговременных форм пластичности оборонительного поведения, подвергнутых процедуре обучения, в отличие от взрослых не наблюдается как активации MAPK/ERK, так и нижележащих ТФ (Гринкевич и др., 2001; Grinkevich *et al.*, 2008). Следует отметить, что MAPK/ERK каскад является чрезвычайно важным регуляторным каскадом в функционировании клетки. В нервной системе MAPK/ERK каскад контролирует процесс выживания нейронов, регенерацию отростков и синаптический спраутинг (Kaplan, Miller, 2000). Показана также необходимость индукции этого каскада в формировании долговременной памяти (Kormhauser, Greenberg, 1997; Martin *et al.*, 1997; Atkins *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2000; Thomas, Huganir, 2004). Дисфункция MAPK/ERK является причиной ряда нейродегенеративных заболеваний (Kyoosseva, 2004). В последние годы обнаружено, что влияние на экспрессию генов MAPK/ERK может оказывать не только через фосфорилирование ряда транскрипционных факторов, но и через индукцию фосфорилирования и ацетилирования гистонов (Chwang *et al.*, 2007).

Если механизмы накопления информации (научения) и ее хранения (памяти) в последние десятилетия изучались довольно интенсивно, то механизмы вспоминания стали изучаться буквально в последние годы. Было обнаружено, что, как и в случае формирования долговременной памяти, процессы вспоминания зависят от работы генома (Przybylski, Sara, 1997; Milekic, Alberini, 2002). Во время напоминания память становится лабильной и появляется возможность нарушить предварительно сформированную память введением блокаторов трансляции. Этот лабильный процесс получил название реконсолидации памяти. На высших позвоночных животных на модели условного оборонительного (Duarci, Nader, 2004; Duvarci *et al.*, 2005) и познавательного рефлексов (Kelly *et al.*, 2003) была показана необходимость участия в процессах реконсолидации MAPK/ERK зависимых процессов, а также ремоделирования хроматина (Lubin, Sweatt, 2007).

В связи с этим в данной работе нашей задачей являлся анализ фосфорилирования гистона H3 – потенциальной мишени MAPK/ERK при формировании (консолидации) условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии у моллюска *Helix* и его реконсолидации после реактивации.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на виноградных улитках *Helix lucorum*. В качестве модели обучения использовали условный рефлекс пищевого избегания (условный стимул – морковь, безусловный – удар током 6 мА, предъявление сочетаний с интервалом 15 мин). Перед обучением животных 3 суток содержали без корма. После получения животными 8 пар стимулов (по 4 сочетания в день) извлекали ЦНС, кластеры нейронов париетовисцерального и церебрального комплекса ганглиев использовали для экстракции гистонов. Для исследования процесса реконсолидации у улиток вырабатывали условный рефлекс и спустя сутки после обучения предъявляли только условный стимул, на который у улитки была выработана оборонительная реакция. Спустя 1 час извлекали комплексы париетовисцерального и церебрального ганглиев и анализировали в них содержание и фосфорилирование гистона H3.

Для изучения фосфорилирования гистона H3 применяли метод Вестерн-блот-гибридизационного анализа с использованием антител к фосфорилированным и тотальным формам соответствующих белков. Экстракцию гистонов проводили согласно Chwang *et al.* (2007). Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Брэдфорд. Экстракты, содержащие искомые белки, разделяли электрофорезом в 14 %-м полиакриламидном геле (система Лэмбли) на трис-глициновом буфере (pH 8,3) в присутствии 0,1 % SDS. Предварительно белковые пробы кипятили с буфером для проб (50 мМ Трис, pH 6,7; 6 % SDS; 20 % глицерин; 8 % 2-меркаптоэтанол; 0,25 % бромфеноловый синий) в отношении 1 : 1. В качестве маркеров молекулярного веса использовали белки («Novex»). Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозные фильтры. Для проверки качества переноса белков на мембрану использовали окрашивание Ponceaus.

Нитроцеллюлозные фильтры после проведения процедур, уменьшающих неспецифическую сорбцию (инкубация с 3 %-м молоком), последовательно инкубировали в растворах, содержащих первичные и вторичные (конъюгированные с пероксидазой хрена) антитела, согласно рекомендации фирмы «Amersham pharmacia biotech» – протокол для работы с ECL – western blotting analysis system. Инкубацию с первичными антителами осуществляли в течение ночи при 4 °С. Визуализацию и количественный анализ связавшихся антител проводили с использованием хемолюминесцентного метода (система ECL, фирма «Amersham»). Рентгеновские пленки сканировали. Количественный анализ осуществляли при помощи компьютерной программы Gel Pro Anal. Статистическая обработка проводилась методом Стьюдента. В работе использовали первичные антитела к H3 фирмы «Millipore» и фосфорилированные по серину 10 антитела к P-H3 (Upstate) в разведении 1 : 1000. Вторичные антитела фирмы «Amersham» (ECL-система) применяли в разведениях 1 : 1500.

Результаты

Анализ фосфорилирования гистона H3 в функционально различных ганглиях ЦНС виноградной улитки при обучении

Эксперименты по оценке экспрессии и фосфорилирования гистона H3 в ЦНС виноградной улитки проводили методом Вестерн-блот анализа. Учитывая чрезвычайно высокую консервативность гистонов, применяли коммерческие антитела как к тотальным, так и фосфорилированным формам гистона H3 позвоночных животных. Было показано, что антитела и к тотальным, и к фосфорилированным формам гистона H3 выявляют в ЦНС *Helix* одну полосу с молекулярным весом 17КДа, которая совпадает с подвижностью гистона H3 позвоночных (рис. 1).

Моделью обучения являлась выработка условного рефлекса пищевой аверзии. Исследования экспрессии и активации MAPK/ERK при обучении проводили в функционально различных ганглиях ЦНС улитки (париетовисцеральном и церебральном). В париетовисцеральном комплексе ганглиев локализованы нервные клетки, участвующие в организации оборони-

тельного поведения, в том числе сенсорные, моторные и командные. По литературным данным (Балабан, Захаров, 1992), около 90 % нейронов в этом ганглии реагируют на ноцицептивную стимуляцию. Удар электрическим током использовали в качестве безусловного стимула. В церебральном ганглии осуществляется анализ сенсорной информации – обработка запахов (пища с привлекательным запахом использовалась нами в качестве условного раздражителя). Анализ содержания тотального и фосфорилированного гистона H3 проводили спустя 1 час после окончания процедуры обучения.

Было показано, что спустя 1 час после обучения происходит увеличение фосфорилирования гистона H3 в нервных клетках церебрального ганглия (рис. 2, а). Увеличение по отношению к контролю составляло $2,2 \pm 0,3$ раза ($p < 0,03$). В париетовисцеральном комплексе ганглиев увеличение в $1,3 \pm 0,2$ раза было недостоверным ($p = 0,2$) (рис. 2, б).

Анализ фосфорилирования гистона H3 в функционально различных ганглиях ЦНС виноградной улитки при реконсолидации памяти

В последние годы было обнаружено, что активация работы генома необходима не только для консолидации памяти, но и для реконсолидации. В связи с этим мы провели эксперименты по анализу фосфорилирования гистона H3 при реактивации памяти при напоминании.

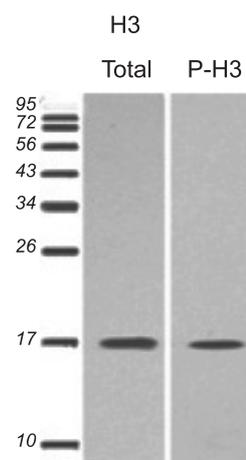


Рис. 1. Вестерн-блот анализ содержания тотальных и фосфорилированных форм гистона H3 в ЦНС виноградной улитки.

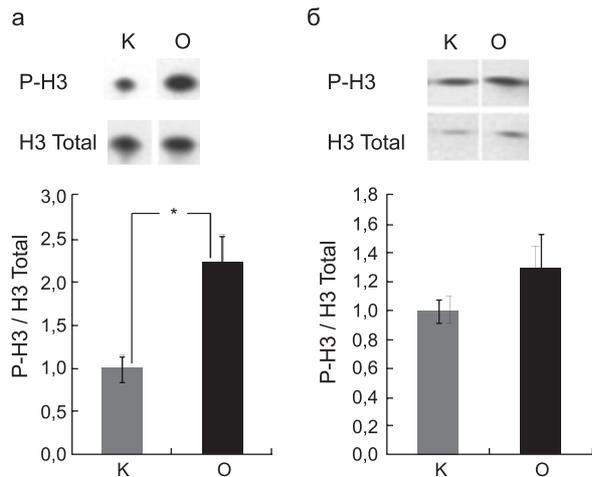


Рис. 2. Анализ фосфорилирования гистона H3 в церебральном и париетовисцеральном комплексе ганглиев виноградной улитки спустя 1 час после обучения.

Сверху – репрезентативный иммуноблот с антителами к фосфорилированному (p-H3) и тотальным (H3) формам гистона H3. а – относительное содержание фосфо-H3 в церебральных ганглиях. К – контроль (N=3), О – обучение (N=5). Статистически значимое отличие от контроля, * $p < 0,03$; б – относительное содержание фосфо-H3 в париетовисцеральных ганглиях. К – контроль (N=7), О – обучение (N=6), $p = 0,2$.

Здесь и далее в рис. 3, 4: по оси абсцисс – содержание фосфо-H3, отнесенное к содержанию тотальных форм в каждом образце и контролю. Контроль принят за единицу.

У улиток вырабатывали условный рефлекс и спустя сутки после обучения предъявляли только условный стимул, на который у улитки была выработана оборонительная реакция, тем самым реактивировали память. Спустя 1 час извлекали комплексы париетовисцерального и церебрального ганглиев и анализировали в них содержание гистона H3 и его фосфорилирование. Контролем являлись необученные улитки и обученные (спустя 24 часа после обучения), которым не предъявляли условный стимул. Методом Вестерн-блот анализа было показано, что реактивация вызывает значительное фосфорилирование гистона H3 спустя 1 час после предъявления условного стимула в париетовисцеральном ганглии по отношению как к наивным животным, так и обученным, которым не предъявляли условный стимул (рис. 3).

Увеличение фосфорилированных форм H3 при реконсолидации достигало 2,47 по отношению к контролю (достоверно при $p < 0,01$). По отношению к обученным неактивированным

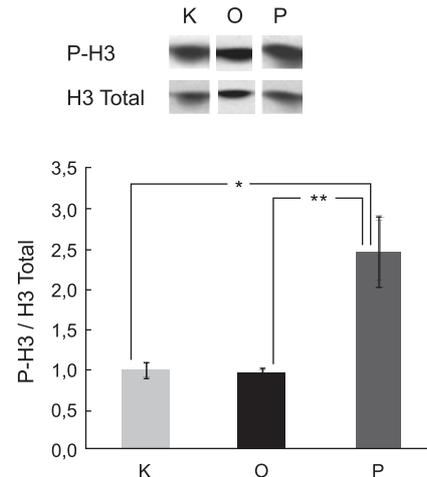


Рис. 3. Анализ фосфорилирования гистона H3 в париетовисцеральном комплексе ганглиев виноградной улитки при реконсолидации памяти спустя 1 час после напоминания.

На графике – относительное содержание фосфогистона H3. К – контроль (N = 6), О – обучение через 24 часа (N = 3), P – реконсолидация (N = 6). Статистически значимое отличие от контроля, * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

животным наблюдалось возрастание в 2,55 раза ($p < 0,05$).

В церебральных ганглиях при реактивации уровень фосфорилирования H3 по отношению к контролю был высок и достигал 3,1 раза (достоверно при $p < 0,01$) (рис. 4). Однако в связи с высоким остаточным уровнем фосфорилирования H3 у обученных улиток (через 24 часа после обучения увеличение фосфорилирования H3 достоверно при $p < 0,01$) увеличение фосфорилирования у реактивированных улиток по отношению к обученным было недостоверно ($p = 0,33$).

Таким образом, при формировании условного рефлекса пищевой аверзии спустя 1 и 24 часа после обучения происходит увеличение фосфорилирования гистона H3 в нервных клетках церебрального ганглия (обработка информации, связанной с условным стимулом). В париетовисцеральном комплексе ганглиев (прием и обработка сигналов со стороны безусловного ноцицептивного стимула) достоверного увеличения не выявлено. При реконсолидации памяти, напротив, значительное увеличение фосфорилирования гистона H3 наблюдается в париетовисцеральном ганглии и не происходит в церебральном.

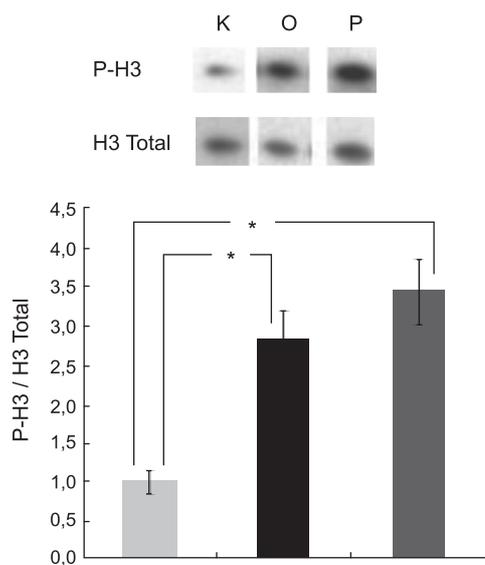


Рис. 4. Анализ фосфорилирования гистона H3 в церебральном комплексе ганглиев виноградной улитки при реконсолидации памяти спустя 1 час после напоминания.

Сверху – репрезентативный иммуноблот. Внизу – относительное содержание фосфо-H3. К – контроль (N = 5), О – обучение через 24 часа (N = 3), Р – реконсолидация (N = 3). Статистически значимое отличие от контроля, * $p < 0,001$.

Обсуждение

В данном исследовании мы показали, что в структурах, связанных с приемом и обработкой условных и безусловных стимулов у моллюска *Helix*, динамика фосфорилирования гистона H3 при обучении носит различный характер. Так, при выработке условного рефлекса пищевой аверсии в церебральных ганглиях в отличие от париетовисцеральных происходит значительное увеличение фосфорилирования гистона H3. Как отмечалось выше, в нейронах церебрального ганглия осуществляется анализ сенсорной информации, связанной с запахами (условный стимул). Значительную часть церебрального ганглия составляет процеребрум – обфакторный центр моллюсков. Париетовисцеральный ганглий специализирован на оборонительном поведении животных (ноцицептивный стимул являлся безусловным). Ранее нами было показано, что при формировании пищевой аверсии спустя 15 минут и 1 час после обучения в этих структурах происходит и значительная активация регуляторного каскада MAPK/ERK.

Причем дисфункция MAPK/ERK приводит к нарушению долговременной памяти (Гринкевич и др. 2006; Grinkevich *et al.*, 2008). В связи с вышесказанным можно предположить, что индукция фосфорилирования гистона H3 при формировании пищевой аверсии у *Helix* в церебральных ганглиях может в значительной мере определяться активацией MAPK/ERK. В последние годы появились первые работы по исследованию формирования оборонительных рефлексов у позвоночных животных. В них показана связь MAPK/ERK с фосфорилированием гистона H3 (Chwang *et al.*, 2006; Chandramonah *et al.*, 2008)

Отсутствие индукции фосфорилирования гистона H3 у *Helix* спустя 1 час после обучения в париетовисцеральной ганглии не означает отсутствия индукции в иные временные интервалы. С другой стороны, не исключено и фосфорилирование других классов гистонов. Так, на модели неассоциативного обучения (габитуация моносинаптической связи между сенсорными и моторными нейронами моллюска *Aplysia*) показана MAP-зависимая индукция ацетилирования гистона H4, а не H3 (Guan *et al.*, 2002). Избирательная активация тех или иных гистонов (либо H3, либо H4) наблюдается и у позвоночных животных (Levenson *et al.*, 2004). Предполагается, что фосфорилирование и ацетилирование гистонов – в значительной степени взаимосвязанные процессы (Nowak, Corces, 2009). Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об избирательности модификации гистонов в различных структурах ЦНС при обучении и высокой консервативности молекулярных процессов, лежащих в основе долговременной памяти.

Как отмечалось выше, механизмы консолидации памяти к настоящему времени изучены гораздо полнее, чем механизмы реконсолидации, связанные с извлечением информации (вспоминанием). Буквально в последние годы на высших позвоночных животных на модели условного оборонительного рефлекса (Duvarci, Nader, 2004; Duvarci *et al.*, 2005) и познавательного рефлекса (Kelly *et al.*, 2003) была показана необходимость участия в процессах реконсолидации, как и в случае консолидации памяти, MAPK/ERK зависимых процессов. Кроме того, зарегистрировано изменение структуры хрома-

тина, связанное с ацелированием и фосфорилированием гистона H3, индуцируемое через протеинкиназу ИККа (Lubin, Sweatt, 2007).

В данной работе мы впервые описали индукцию фосфорилирования гистона H3 в париетовисцеральном ганглии – структуре ЦНС, специализирующейся на оборонительном поведении, при реконсолидации пищевой аверзии у моллюсков. Наши данные дополняют вышеперечисленные работы, выполненные на позвоночных животных, и свидетельствуют о важности фосфорилирования гистона H3 в процессах реконсолидации и о высокой консервативности молекулярных механизмов, лежащих в основе этого процесса. К настоящему времени показана лабильность реконсолидации памяти у *Helix* при введении блокаторов белкового синтеза (Gainutdinova *et al.*, 2005; Солнцева и др., 2006).

Не исключена возможность индукции фосфорилирования гистона H3 при реконсолидации у *Helix*, как и у позвоночных животных (Kelly *et al.*, 2003; Duvarci, Nader, 2004), через регуляторный каскад MAPK/ERK. С другой стороны, показано, что фосфорилирование гистона H3 у высших позвоночных может также индуцироваться через протеинкиназу ИККа. Кроме того, ИККа способна активировать ацетилтрансферазу CBP и ацелирование гистона H3 (Lubin, Sweatt, 2007). В нескольких работах показано вовлечение CBP в формирование долговременной памяти (Alarcon *et al.*, 2004; Korzus *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006). Кроме того, появились данные о возможности активации фосфорилирования гистона H3 через ингибирование фосфатаз, дефосфорилирующих H3 (Stipanovich, 2008).

Таким образом, пути индукции ремоделирования хроматина при обучении достаточно многообразны и еще плохо изучены. Единичными являются работы по модификации гистонов в промоторах конкретных генов и тем более в отдельных клеточных структурах. В связи с этим исследования эпигенетических механизмов памяти, проводимые на животных с «простыми нервными системами», представляются перспективными.

Исследование поддержано РФФИ, грант № 08-04-01325.

Литература

- Анохин К.В. Молекулярные сценарии консолидации долговременной памяти // Журн. высш. нерв. деятельности. 1997. Т. 47. Вып. 2. С. 261–279.
- Балабан П.М., Захаров И.С. Обучение и развитие: общая основа двух явлений. М.: Наука, 1992. 152 с.
- Гринкевич Л.Н. Метаболизм белков в формировании оборонительного рефлекса моллюсков // Журн. высш. нервн. деятельности. 1992. Т. 42. Вып. 6. С. 1221.
- Гринкевич Л.Н., Лисачев П.Д., Баранова К.А., Харченко О.А. Сравнительный анализ активации MAP/ERK-киназ в ЦНС животных, обладающих разной способностью к обучению // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 92. № 6. С. 536–545.
- Гринкевич Л.Н., Лисачев П.Д., Меркулова Т.И. Формирование транскрипционных факторов AP-1 при обучении *Helix* // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2001. Т. 87. Вып. 6. С. 762–773.
- Солнцева С.В., Никитин В.П., Козырев С.А. и др. Действие ингибиторов синтеза белка во время реактивации ассоциативной памяти у виноградной улитки вызывает обратимую и необратимую амнезию // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 92. С. 1058–1068.
- Alarcon J.M., Malleret G., Touzani K. *et al.* Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP +/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration // Neuron. 2004. V. 42. № 6. P. 947–959.
- Alberini C.M., Ghirardi M., Metz R., Kandel E.R. C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia* // Cell. 1994. V. 76. № 6. P. 1099–1114.
- Atkins C.M., Selcher J.S., Petraitis J.J. *et al.* The MAPK cascade is required for mammalian associative learning // Nat. Neurosci. 1998. V. 1. P. 602–609.
- Chandramonah Y., Droste S.K., Arthur J.S.C., Reul J.M.H.M. The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-d-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway // Eur. J. Neurosci. 2008. V. 27. P. 2701–2713.
- Chwang W.B., Arthur J.S., Schumacher A., Sweatt J.D. The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 46. P. 12732–12742.
- Chwang W.B., O’Riordan K.J., Levenson J.M., Sweatt J.D. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning // Learning and Memory. 2006. V. 13. P. 322–328.

- Davis S., Vanhoutte P., Pages C. *et al.* The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus *in vivo* // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. № 2. P. 4563–4572.
- Duvarci S., Nader K. Characterization of fear memory reconsolidation // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 42. P. 9269–9275.
- Duvarci S., Nader K., LeDoux J.E. Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning // *Eur. J. Neurosci.* 2005. V. 21. № 1. P. 283–289.
- Gainutdinova T.H., Tagirova R.R., Ismailova A.I. *et al.* Reconsolidation of a context long-term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis // *Learning and Memory.* 2005. V. 12. P. 620–625.
- Grinkevich L.N., Lisachev P.D., Kharchenko O.A., Vasil'ev G.V. Expression of MAP/ERK kinase cascade corresponds to the ability to develop food aversion in terrestrial snail at different stages of ontogenesis // *Brain Res.* 2008. V. 1187. P. 12–19.
- Guan Z., Giustetto M., Lomvardas S. *et al.* Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure // *Cell.* 2002. V. 111. № 4. P. 483–493.
- Kandel E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses // *Science.* 2001. V. 294. P. 1030–1038.
- Kaplan D.R., Miller F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. V. 10. P. 381–391.
- Kelly A., Laroche S., Davis S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation memory // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 12. P. 5354–5360.
- Kormhauser J.M., Greenberg M.E. A kinase to remember: Dual roles for MAP kinase in long-term memory // *Neuron.* 1997. V. 18. № 6. P. 839–842.
- Korzus E., Rosenfeld M.G., Mayford M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation // *Neuron.* 2004. V. 42. № 6. P. 961–972.
- Kyosseva S.V. Mitogen-activated protein kinase signaling // *Intern. Rev. Neurobiol.* 2004. V. 59. P. 201–220.
- Levenson J.M., O'Riordan K.J., Brown K.D. *et al.* Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 40545–40559.
- Lubin F.D., Sweatt J.D. The I κ B kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories // *Neuron.* 2007. V. 55. № 6 P. 942–957.
- Martin K.C., Michael D., Rose J.C. *et al.* MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia* // *Neuron.* 1997. V. 18. P. 899–912.
- Milekic M.H., Alberini C.M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation // *Neuron.* 2002. V. 36. № 3. P. 521–525.
- Nowak S.J., Corces V.G. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation // *Trends Genet.* 2009. V. 20. № 4. P. 214–220.
- Przybylski J., Sara S.J. Reconsolidation of memory after its reactivation // *Behav. Brain Res.* 1997. V. 84. № 1/2. P. 241–246.
- Reul J.M.H.M., Chandramohan Y. Epigenetic mechanisms in stress-related memory formation // *Psychoneuroendocrinology.* 2007. V. 32. P. S21–S25.
- Roth T.L., Sweatt J.D. Regulation of chromatin structure in memory formation // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2009. V. 19. P. 336–342.
- Stipanovich A., Valjent E., Matamales M. *et al.* A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response // *Nature.* 2008. 453. P. 879–885.
- Thomas G.M., Haganir R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity // *Nature Rev. Neurosci.* 2004. V. 5. P. 173–183.
- Wood M.A., Hawk J.D., Abel T. Combinatorial chromatin modifications and memory storage: A code for memory? // *Learning and Memory.* 2006. V. 13. P. 241–244.

**POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF HISTONE H3
DURING MEMORY CONSOLIDATION AND RECONSOLIDATION
IN THE MOLLUSK *HELIX***

K.G. Shevchenko, A.B. Danilova, L.N. Grinkevich

Pavlov Institute of Physiology, RAS, St.-Petersburg, Russia, e-mail: larisa_gr_spb@mail.ru

Summary

Recent studies have demonstrated an important role of posttranslational histone modifications in gene expression regulation during learning. In our work, the conditioned food aversion in the mollusk *Helix* was used as a learning model. We applied Western blot analysis to the study of changes in histone H3 phosphorylation in functionally different CNS elements during memory consolidation and reconsolidation. A profound increase in histone H3 phosphorylation was recorded 1 and 24 hours after training in cerebral ganglia (analyzing olfactory information) during consolidation, but no significant change in H3 phosphorylation occurred during reconsolidation. Oppositely, no significant change in H3 phosphorylation was recorded in parietovisceral ganglia (controls aversive behavior) during learning (consolidation), but reconsolidation was accompanied by an increase in this index. Thus, compartments responsible for the analysis of conditioned and unconditioned stimuli differ in the time pattern of histone H3 phosphorylation. We suggest that the MAPK/ERK pathway is an inducer of this phosphorylation. Earlier we found that dysfunction of this pathway disturbed the formation of the reflex under study.

Our data suggest that histone modifications are involved in both consolidation processes and reactivation of long term memory formation (reconsolidation) in *Helix* and that the molecular processes underlying these events are highly conservative.

Key words: histone H3, phosphorylation, learning, mollusk *Helix*, Western blotting, memory reconsolidation.