

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАРК/ЕРК-ЗАВИСИМОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В ЦНС ВЗРОСЛЫХ И ЮВЕНИЛЬНЫХ *HELIX* ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ

А.Б. Данилова¹, П.Д. Лисачев², Л.Н. Гринкевич¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Конструкторско-технологический институт вычислительной техники СО РАН,
Новосибирск, Россия, e-mail: larisa_gr_spb@mail.ru

Животные, обладающие простой нервной системой, являются одним из основных объектов исследования молекулярно-клеточных механизмов памяти. Известно, что способность к формированию различных форм условных рефлексов как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных созревает неравномерно в процессе онтогенеза. Так, у моллюска *Helix* созревание механизмов сенситизации, лежащей в основе пластичности оборонительных рефлексов, формируется после 3-месячного возраста. Поэтому для выявления критических звеньев механизмов долговременной памяти сравнительный онтогенетический подход является перспективным. Ранее нами было показано, что важную роль в формировании условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии у взрослых *Helix* играет регуляторный каскад МАРК/ЕРК. У ювенильных животных (с незрелыми механизмами пластичности оборонительного поведения), подвергнутых процедуре обучения, активации МАРК/ЕРК, как и нижележащих транскрипционных факторов, не происходит.

В связи с важной ролью в функционировании клетки процессов ацетилирования задачей данного исследования являлось выяснение роли МАРК/ЕРК в индукции ацетилирования белков в ЦНС *Helix* в механизмах долговременной памяти. Методом Вестерн-блот анализа показано, что при формировании рефлекса пищевой аверзии в ЦНС взрослых животных индуцируется МАРК/ЕРК-зависимое ацетилирование белков с ММ 53кДа и 72кДа. У ювенильных животных изменений в ацетилировании этих белков при обучении не происходит. Стимулирование процессов ацетилирования у ювенильных животных введением блокатора гистондеацетилаз бутирата натрия перед обучением индуцирует процесс ацетилирования белков с ММ 72кДа и, как показано нами ранее, приводит к улучшению формирования долговременной памяти. Полученные данные свидетельствуют о важной роли гистон-ацетилтрансфераз и гистондеацетилаз в регуляции ацетилирования белков в механизмах долговременной памяти у моллюска *Helix* и участии сигнального каскада МАРК/ЕРК в этих процессах.

Ключевые слова: ацетилирование негистоновых белков, МАРК/ЕРК, обучение, моллюск *Helix*, гистондеацетилазы.

Введение

Выяснение молекулярно-генетических механизмов обучения и памяти уже в течение длительного времени является одной из основных задач фундаментальной нейробиологии. Важную роль в исследовании этих механизмов благодаря уникальному строению ЦНС и размеру нейронов сыграли моллюски. На модели фасилитации синаптической связи между ней-

ронами Э. Канделом были обнаружены базовые механизмы пластичности (Kandel, 2001).

Показано, что как у моллюсков, так и у высших позвоночных животных значительную роль в формировании долговременной памяти играет внутриклеточный регуляторный каскад МАРК/ЕРК (Atkins *et al.*, 1998; Kandel, 2001). В нервной системе МАРК/ЕРК каскад контролирует процесс выживания нейронов, регенерацию отростков и синаптический спраунтинг

(Kaplan, Miller, 2000). Дисфункция MAPK/ERK является причиной ряда нейродегенеративных заболеваний (Kyoosseva, 2004). MAPK/ERK индуцирует фосфорилирование довольно широкого круга белков, в том числе ряда ДНК-связывающих транскрипционных факторов (ТФ) и гистонов. Активации ТФ и посттрансляционной модификации гистонов в последнее время отводится важное место в геном-зависимых пластических перестройках при обучении (Guan *et al.*, 2002; Levenson, Sweatt, 2006; Wood *et al.*, 2006; Sweatt, 2009).

Важнейшую роль в посттрансляционной модификации как гистонов, так и негистоновых белков играет также ацетилирование по лизину (Swank, Sweatt, 2001; Sweatt, 2009; Spange *et al.*, 2009). Уровень ацетилирования контролируется ферментами гистонацетилтрансферазами и гистондеацетилазами. Гистонацетилтрансферазы (НАТ) катализируют перенос ацетильной группы с ацетил-КоА на лизиновый остаток белков. Гистондеацетилазы (HDAC) контролируют деацетилирование. Ацетилированию могут подвергаться транскрипционные факторы, структурные и транспортные белки. Таким образом, ацетилирование регулирует многие процессы в клетке, в том числе перестройки цитоскелета, клеточный метаболизм и экспрессию генов. Известно, что ацетилированию кроме гистонов подвергается такой хорошо известный транскрипционный фактор, как p53, играющий важную роль в индукции апоптоза, а также транскрипционные факторы GATA-1, Myo-D и NFkB. При этом ацетилирование увеличивает их ДНК-связывающую активность и соответственно индуцирует транскрипцию (Spange *et al.*, 2009). Однако ацетилирование этих ТФ в связи с обучением остается неизученным.

В последнее время появились работы о возможном влиянии MAPK/ERK каскада на процессы не только фосфорилирования, но и ацетилирования. При этом может индуцироваться ацетилирование как гистонов, так и негистоновых белков (Levenson *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006; Sweatt, 2009; Spange *et al.*, 2009). Однако данные носят довольно фрагментарный характер. Предполагается, что MAPK/ERK каскад может вовлекаться в индукцию процессов ацетилирования через активацию транскрипционного коактиватора CREB-связывающего

белка СВР, обладающего ацетил-трансферазной активностью. При этом дисфункция СВР приводит к невозможности формирования долговременной памяти (Alarcon *et al.*, 2004; Korzus *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006).

Известно, что способность к формированию различных форм условных рефлексов как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных созревает неравномерно в процессе онтогенеза (Nolen, Carew, 1988; Figuero *et al.*, 1996; Stark, Carew, 1999; Barbas *et al.*, 2003). Так, у моллюска *Helix* механизмы сенситизации, лежащей в основе пластичности оборонительных рефлексов, созревают после 3-месячного возраста (Balaban, 2002). Поэтому для выявления критических звеньев механизмов долговременной памяти сравнительный онтогенетический подход является перспективным.

Ранее нами была показана необходимость активации MAPK/ERK для формирования долговременной памяти у улиток *Helix lucorum*. При обучении взрослых животных наблюдается активация как MAPK/ERK, так и нижележащих ТФ, а ее дисфункция предотвращает формирование долговременной памяти (Гринкевич и др., 2006; Grinkevich *et al.*, 2008). У ювенильных животных с незрелыми механизмами формирования долговременных форм пластичности оборонительного поведения, подвергнутых процедуре обучения, в отличие от взрослых активации MAPK/ERK не наблюдается (Grinkevich *et al.*, 2008). Кроме того, у этих животных изменен состав нижележащих ТФ (Grinkevich *et al.*, 2003).

Таким образом, для выяснения роли MAPK/ERK каскада в индукции ацетилирования негистоновых белков в обучении в работе поставлена задача: провести сравнительные онтогенетические исследования статуса ацетилирования белков в ЦНС взрослых и ювенильных животных при выработке рефлекса пищевой аверзии у *Helix*.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на взрослых и ювенильных виноградных улитках *Helix lucorum*. В качестве модели обучения использовали условный рефлекс пищевого избегания (условный стимул – морковь, безусловный –

удар током 6 мА (для ювенильных 1 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) спустя 1 час извлекали ЦНС и экстрагировали белки (буфер: 10 mM Трис-НСl pH 7,5, 1 mM EDTA, 2,5 mM натрийпирофосфат, 1 mM β -глицерофосфат, 0,1 mM PMSF, 1 % коктейль протеазных ингибиторов (Sigma), 0,1 mM Na_3VO_4 и 1 % Igepal CA-630). Для экстракции белков у ювенильных *Helix* в связи с их небольшими размерами объединяли ЦНС из 3 животных. Для изучения ацетилирования белков применяли метод Вестерн-блот-гибридизационного анализа с использованием антител к ацетилированному лизину. Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Брэдфорда. Экстракты, содержащие искомые белки, разделяли электрофорезом в 12 %-м полиакриламидном геле (система Лэмли) на трис-глициновом буфере (pH 8,3) в присутствии 0,1 % SDS. Предварительно белковые пробы кипятили с буфером нанесения (50 mM Трис-НСl 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 Ponceau. 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 хемоллюминесцентного метода (система ECL, фирма «Amersham»). Рентгеновские пленки сканировали. Количественный анализ осуществляли при помощи компьютерной программы Gel-Pro Analyzer. В работе использовали первичные поликлональные антитела к ацетилированному лизину (Cell Signaling) в

разведении 1 : 1000. Вторичные антитела фирмы «Amersham» (ECL-система) применяли в разведениях 1 : 1500.

Для изучения возможной связи ацетилирования изучаемых белков с индукцией регуляторного каскада MAPK/ERK применяли ингибитор MEK-киназы, лежащей над ERK, PD98095 (40 μM).

Статистическая обработка проводилась методом ANOVA. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты были представлены как значение \pm стандартная ошибка.

Результаты

В связи с важной ролью в функционировании клетки ацетилирования белков задачей данного исследования являлось выяснение роли регуляторного каскада MAPK/ERK в ацетилировании белков в ЦНС *Helix* при формировании условного рефлекса пищевой аверзии. В качестве подхода использовали сравнительное онтогенетическое исследование статуса ацетилирования белков у взрослых и ювенильных животных при обучении и влиянии на эти процессы ингибитора MEK киназы, предшествующей ERK, PD98095.

Анализ статуса ацетилирования белков в ЦНС взрослых виноградных улиток при выработке условного рефлекса пищевой аверзии

Ацетилирование белков оценивали методом Вестерн-блот анализа с применением антител к ацетилированному лизину. Эти антитела выявляют различные группы белков, содержащие ацетилированный лизин. Для нивелирования возможных погрешностей в переносе белка применяли антитела к MAPK/ERK-киназе, для которой был показан постоянный уровень экспрессии (Grinkevich *et al.*, 2008).

Анализ степени ацетилирования белков в ЦНС проводили спустя 1 час после обучения. Обнаружили 2 класса белков с молекулярной массой 72кДа и 53кДа, ацетилирование которых значительно изменяется спустя один час после обучения (рис. 1).

Для белков с молекулярным весом 72кДа: $F(1, 13) = 27,11$, $p < 0,0002$ (one-way Anova).

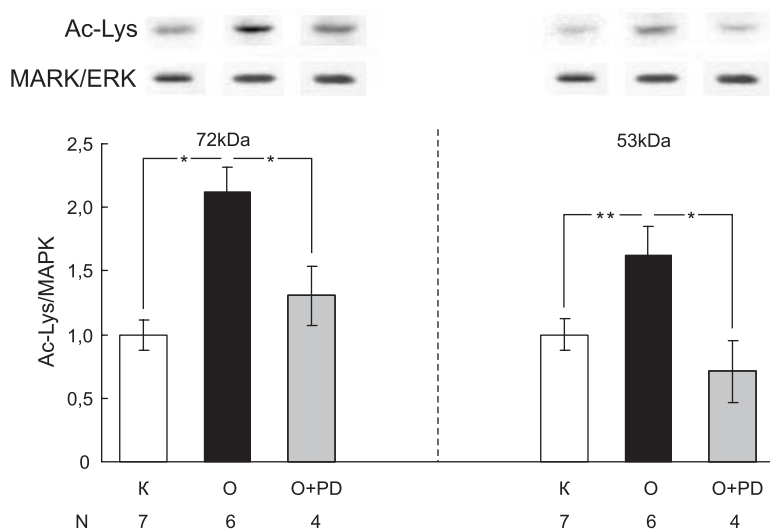


Рис. 1. Ацетилирование белков с молекулярным весом 72кДа и 53кДа в ЦНС взрослых улиток при обучении.

При обучении у взрослых улиток индуцируется ацетилирование белков с молекулярным весом 72кДа и 53кДа, которое снимается введением ингибитора MAPK/ERK-киназного каскада PD-98059. К – контроль, О – обучение, О+PD – обучение с введением PD-98059. * $p < 0,01$, ** $p < 0,03$ (Anova). По оси ординат – содержание ацетилированных белков 72кДа и 53кДа, отнесенное к MAPK/ERK и контролю.

Разница контроля с обучением достоверна при $p < 0,0001$ (тест Фишера). Для белков с молекулярным весом 53кДа: $F(1, 13) = 6,06$, $p < 0,03$ (one-way Anova). Разница контроля с обучением достоверна при $p < 0,03$ (тест Фишера).

С учетом важной роли MAPK/ERK-киназного каскада в формировании долговременной памяти у *Helix* (Grinkevich *et al.*, 2008) и данных литературы о возможности вовлечения этого каскада в индукцию ацетилирования (Swank, Sweatt, 2001; Sweatt, 2009), представлялось интересным проверить влияние MAPK/ERK на ацетилирование белков с 72кДа и 53кДа. Для того чтобы исследовать этот вопрос, улиткам за 30 минут до обучения был введен ингибитор MEK киназы, предшествующей ERK, PD98059 (40 μ M). Как видно из рис. 1, введение PD98059 снимает ацетилирование белков молекулярным весом как 72кДа, так и 53кДа. Для белка 72кДа: $F(2, 16) = 13,36$, $p < 0,0004$ (one-way Anova). Обучение достоверно отличается от обучения + PD при $p < 0,01$ (тест Фишера). Для белка 53кДа: $F(2, 16) = 5,26$, $p < 0,02$. Обучение достоверно отличается от обучения + PD при $p < 0,01$ (тест Фишера).

Таким образом, в процессе обучения взрослых улиток наблюдается MAPK/ERK-зависимая

индукция ацетилирования белков молекулярным весом 72кДа и 53кДа.

Анализ статуса ацетилирования белков в ЦНС ювенильных *Helix* при выработке условного рефлекса пищевой аверзии

Далее был проведен сравнительный анализ ацетилирования белков в ЦНС ювенильных улиток. Для этого использовали улиток возрастом 2–3 месяца, так как было показано, что они не способны к формированию долговременных форм оборонительных рефлексов (Balaban, 2002). В связи с малым размером ювенильных улиток для исследований объединяли ЦНС из 3 животных.

Показано, что у ювенильных улиток в отличие от взрослых индукция ацетилирования белков молекулярным весом 72кДа не происходит (рис. 2). Текущий эффект: $F(1, 4) = 3,77$, $p = 0,12$ (Anova). Также не наблюдалось ацетилирование белков 53кДа. Текущий эффект: $F(1, 4) = 0,01$, $p = 0,91$ (Anova).

С учетом полученных нами ранее данных о возможности стимулирования долговременной памяти *Helix* через индукцию процессов ацетилирования (статья на рецензии) введением

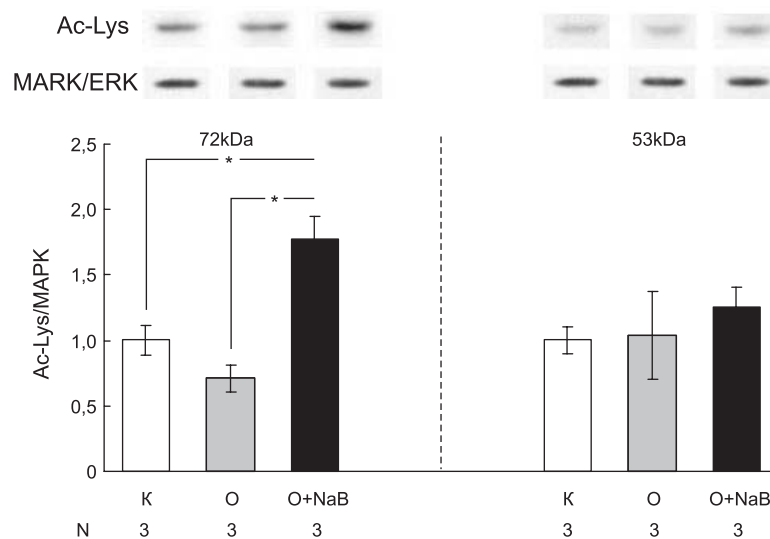


Рис. 2. Ацетилирование белков с молекулярным весом 72кДа и 53кДа в ЦНС ювенильных улиток при обучении.

У ювенильных улиток в отличие от взрослых индукция ацетилирования белков молекулярным весом 72кДа и 53кДа при обучении не происходит. Введение ювенильным улиткам блокатора деацетилаз бутирата натрия (NaB) стимулирует ацетилирование белка 72кДа, но не 53кДа. * $p < 0,01$ (Anova). К – контроль, О – обучение, О+NaB – обучение с введением бутирата натрия.

блокатора деацетилаз бутирата натрия (NaB) представлялось интересным проверить, влияет ли этот блокатор HDAC на ацетилирование белков 72кДа 53кДа. Было обнаружено, что введение бутирата натрия (NaB) стимулирует ацетилирование белков 72кДа в ЦНС ювенильных улиток (рис. 2, а). Текущий эффект: $F(2, 6) = 16,72, p < 0,004$ (Anova); контроль против обучения + NaB, $p < 0,01$, обучение против обучения + NaB, $p < 0,01$ (тест Фишера).

При этом стимулирование ацетилирования белка 53кДа введением бутирата натрия не наблюдается (рис. 2). Текущий эффект: $F(2, 6) = 0,37, p = 0,7$ (Anova). Обучение против обучения + NaB, $p = 0,52$ (тест Фишера).

Таким образом, у ювенильных улиток в отличие от взрослых при обучении не происходит индукции ацетилирования белков 72кДа и 53кДа. Введение блокатора деацетилаз бутирата натрия стимулирует ацетилирование белка 72кДа, но не влияет на ацетилирование белка 53кДа.

Обсуждение

В данном исследовании нами обнаружено, что при формировании рефлекса пищевой

аверзии в ЦНС взрослых *Helix* индуцируется MAPK/ERK-зависимое ацетилирование белков с ММ 53кДа и 72кДа. У ювенильных животных изменений в ацетилировании этих белков при обучении не происходит. Полученные данные свидетельствуют о важной роли процессов ацетилирования в обучении и зависимости ацетилирования белков с ММ 53кДа и 72кДа от индукции регуляторного каскада MAPK/ERK. Ранее нами показано, что дисфункция MAPK/ERK предотвращает формирование рефлекса пищевой аверзии у взрослых *Helix* и является одной из причин неспособности ювенильных животных к формированию долговременных форм пластичности оборонительного поведения (Grinkevich *et al.*, 2008). Таким образом, результаты нашей работы подтверждают данные Swank и Sweatt (2001) о возможности MAPK/ERK-зависимой индукции ацетилирования негистоновых белков.

Одним из возможных механизмов влияния MAPK/ERK каскада на индукцию процессов ацетилирования при обучении может быть вовлечение MAPK/ERK-зависимых протеинкиназ RSK и MSK в активацию коактиватора транскрипции CREB-связывающего белка CBP, обладающего ацетилтрансферазной активностью (Alarcon *et*

al., 2004; Korzus *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006). Показано, что гистонацетилтрансферазы, в том числе и СВР, могут индуцировать ацетилирование как гистонов, так и негистоновых белков. С дисфункцией СВР связывают ментальные нарушения у больных с синдромом Рубинштейна–Тейби и невозможность формирования долговременной памяти у нокаутных мышей (Alarcon *et al.*, 2004; Korzus *et al.*, 2004).

К сожалению, функции белков с ММ 53кДа и 72кДа, посттрансляционная модификация которых происходит при обучении *Helix*, не известны. Это могут быть и группы белков со сходной молекулярной массой. В настоящее время описан ряд транскрипционных факторов, ацетилирование которых может влиять на экспрессию генов. Например, ацетилирование p53 (53кДа), играющего ключевую роль в регуляции апоптоза, повышает эффективность связывания ДНК и, таким образом, увеличивает экспрессию подконтрольных ему генов. Среди других молекул-кандидатов можно назвать GATA-1 (46кДа), Myo-D (45кДа) и E2F1 (47кДа). Предполагается, что ацетилирование этих ТФ может осуществляться через гистонацетилтрансферазу СВР.

Подтверждением важной роли MAPK/ERK являются полученные нами сведения об отсутствии у ювенильных животных с незрелыми механизмами пластичности оборонительных рефлексов изменений в ацетилировании белков 53кДа и 72кДа. Как отмечалось выше, у ювенильных животных при обучении MAPK/ERK не активируется (Grinkevich *et al.*, 2008). Таким образом, дисфункция MAPK/ERK каскада у ювенильных животных, предположительно связанная с незрелостью серотониновых рецепторов (Grinkevich *et al.*, 2008), через дисфункцию транскрипционного коактиватора СВР, может являться причиной недостатка экспрессии генов, необходимых для формирования долговременной памяти.

Интересными представляются полученные нами данные по стимулированию процессов ацетилирования у ювенильных животных введением блокатора гистондеацетилаз бутирата натрия. Ранее нами было обнаружено, что ингибитор деацетилаз бутират натрия стимулирует формирование долговременной памяти у ювенильных животных. В данной

работе показано, что введение бутирата натрия индуцирует процесс ацетилирования белков с ММ 72кДа, но не 53кДа. Учитывая, что бутират натрия ингибирует не все классы деацетилаз (Sweatt, 2009), представляется вероятным, что в процессы регуляции ацетилирования данных белков вовлечены разные классы деацетилаз. Наши исследования подтверждают уникальную работу Фишера о возможности улучшения долговременной памяти введением ингибиторов НДАС даже у животных со значительной потерей нейронов (Fischer *et al.*, 2007).

Полученные данные свидетельствуют о важной роли гистонацетилтрансфераз и гистондеацетилаз в регуляции ацетилирования белков при формировании долговременной памяти у моллюска *Helix* и участии внутриклеточного регуляторного каскада MAPK/ERK в этих процессах. Дисфункция MAPK/ERK каскада у ювенильных животных через нарушение процессов фосфорилирования и ацетилирования нижележащих белков-мишеней, в том числе ТФ и гистонов, может являться причиной недостатка экспрессии генов, необходимых для формирования долговременной памяти.

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-01325.

Литература

- Гринкевич Л.Н., Лисачев П.Д., Баранова К.А., Харченко О.А. Сравнительный анализ активации MAPK/ERK-киназ в ЦНС животных, обладающих разной способностью к обучению // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 87. Вып. 6. С. 762–768.
- 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.
- 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.
- Balaban P.M. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail // Neurosci. Biobehav. Rev. 2002. V. 26. № 5. P. 597–630.
- Barbas D., Des Croseillers L., Castellucci V.F. *et al.* Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization in Aplysia: evidence of diverse

- serotonin receptor subtypes // *Learn. Mem.* 2003. V. 10. P. 373–386.
- Figurov A., Pozzo-Miller L.D., Olafsson P. *et al.* Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus // *Nature*. 1996. V. 381. P. 706–709.
- Fischer A., Sananbenesi F., Wang X. *et al.* Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodeling // *Nature*. 2007. V. 447. P. 178–182.
- Grinkevich L.N., Lisachev P.D., Merkulova T.I. Formation of AP-1 transcription factors during learning in *Helix* // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2003. V. 33. P. 39–47.
- 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. Neurotrophins signal transduction in the nervous system // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. V. 10. P. 381–391.
- 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.
- Levenson J.M., Sweatt J.D. Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation // *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. P. 1009–1016.
- Nolen T.G., Carew T.J. The cellular analog of sensitization in *Aplysia* emerges at the same time in development as behavioral sensitization // *J. Neurosci.* 1988. V. 8. P. 212–222.
- Spange S., Wagner T., Heinzl T., Kramer O.H. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signaling at multiple levels // *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 2009. V. 41. P. 185–198.
- Stark L.L., Carew T.J. Developmental dissociation of serotonin-induced spike broadening and synaptic facilitation in *Aplysia* sensory neurons // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. P. 334–346.
- Swank M.W., Sweatt J.D. Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 10. P. 3383–3391.
- Sweatt J.D. Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system // *Biol. Psychiatry*. 2009. V. 65. P. 191–197.
- Wood M.A., Hawk J.D., Abel T. Combinatorial chromatin modifications and memory storage: A code for memory // *Lern. Mem.* 2006. V. 13. P. 241–244.

COMPARATIVE STUDY OF MAPK/ERK-DEPENDENT PROTEIN ACETYLATION IN THE CNS OF ADULT AND JUVENILE *HELIX* DURING LONG-TERM MEMORY FORMATION

A.B. Danilova¹, P.D. Lisachev², L.N. Grinkevich¹

¹ Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia;

² Design Technological Institute of Digital Techniques, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: larisa_gr_spb@mail.ru

Summary

Animals with simple nervous systems are among the main model objects to study the molecular grounds of memory. It is known that the ability to form different conditioned reflexes does not mature simultaneously in the development of vertebrate and invertebrate animals. Thus, the sensitization mechanisms underlying the plasticity of the defensive reflexes in mollusk *Helix* become mature as late as 3 months after birth. Therefore, the ontogenetic

approach is very promising for detection of the principal units of long-term memory formation. We have shown the important role of the MAPK/ERK pathway in the formation of the conditioned food aversion reflex in the adult mollusk *Helix*. In juvenile animals possessing immature mechanisms of avoidance reflex plasticity, neither MAPK/ERK nor downstream TFs are activated after learning. The aim of this study is to investigate the role of the MAPK/ERK pathway in the induction of protein acetylation in *Helix* CNS during food aversion reflex formation. We applied here comparative ontogenetic approach.

Western blot analysis indicates that MAPK/ERK-dependent induction of the 53kDa и 72kDa protein acetylation occurs in the CNS of adult animals during food aversion formation. No change in acetylation of these proteins is recorded in juvenile snails after training. Stimulation of acetylation processes by injection of histone deacetylase (HDAC) inhibitor sodium butyrate prior training induces acetylation of 72kDa proteins in juveniles and, as shown before, improves long-term memory formation. Our data suggest an important role of histone acetyltransferases (HATs) and HDACs in the regulation of protein acetylation during long-term memory formation in *Helix* and involvement of the MAPK/ERK regulatory pathway in these processes.

Key words: nonhistone protein acetylation, MAPK/ERK, learning, mollusk *Helix*, histone deacetylases.