

УДК 57.052:57.053:577.25:612.829

РОЛЬ МОДУЛЯТОРНОГО МЕДИАТОРА СЕРОТОНИНА В ИНДУКЦИИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ У *HELIX*

© 2014 г. Л.Н. Гринкевич, О.В. Воробьева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: Larisa_Gr_spb@mail.ru

Поступила в редакцию 30 сентября 2013 г. Принята к публикации 15 октября 2013 г.

Одним из перспективных направлений нейробиологии является изучение эпигенетических механизмов формирования долговременной памяти, к которым относится посттрансляционная модификация гистонов, приводящая к ремоделированию хроматина и, соответственно, к индукции или репрессии генов, вовлекаемых в обучение. Популярным объектом в нейробиологии являются моллюски, обладающие относительно просто устроенной ЦНС и гигантскими нейронами. Нами ранее показано, что при формировании условного рефлекса пищевой аверзии у моллюска *Helix* происходит значительная индукция ацетилирования и метилирования гистона H3. Предположено что эти процессы регулируются через модуляторный медиатор серотонин, играющий важную роль в формировании оборонительного поведения. С целью изучения влияния серотонина на индукцию эпигенетических процессов нами проведены исследования по воздействию неселективного антагониста серотониновых рецепторов метиотепина на ацетилирование и метилирование гистона H3 при обучении *Helix*. Показано, что введение метиотепина снижает индуцированное обучением увеличение ацетилирования и метилирования гистона H3 в ЦНС виноградной улитки и сопровождается ухудшением долговременной памяти. Формирование долговременной памяти у метиотепин-обработанных животных может быть реверсировано введением ингибитора гистон деацетилаз NaB. Наши данные свидетельствуют о важной роли серотонина в индукции эпигенетических процессов в формировании условного оборонительного рефлекса у *Helix*.

Ключевые слова: эпигенетика, метилирование и ацетилирование гистонов, метиотепин, серотонин, память, моллюск *Helix*, ингибитор HDAC NaB.

ВВЕДЕНИЕ

Выяснение молекулярно-генетических и эпигенетических механизмов обучения и памяти является одной из сложнейших задач фундаментальной нейробиологии. Показано, что формирование долговременной памяти определяется перестройками нейрональных сетей и увеличением эффективности синаптической передачи, причем эти процессы невозможны без включения работы генома (Kandel, 2001, 2012; Alberini, 2009). Таким образом, изучение механизмов регуляции экспрессии генов при обучении становится чрезвычайно актуальным. В последние годы обнаружено, что наряду с активацией или репрессией ДНК-связывающихся

транскрипционных факторов (ТФ) для индукции экспрессии генов необходимо также вовлечение эпигенетических процессов, связанных с ремоделированием хроматина (Strahl, Allis, 2000; Berger, 2007). Важнейшую роль в ремоделировании хроматина играют фосфорилирование, ацетилирование и метилирование гистонов, а также метилирование ДНК. При этом фосфорилирование и ацетилирование гистонов, как правило, приводят к индукции экспрессии генов, а метилирование – как к индукции, так и репрессии, в зависимости от того, какие сайты и по какой аминокислоте они метилируются. Показано, что эти эпигенетические процессы вовлекаются и в формирование долговременной памяти (Levenson, Sweatt, 2006; Wood *et*

al., 2006). В настоящее время в этой области ведутся широкомасштабные исследования.

Одним из популярных объектов для изучения молекулярно-клеточных механизмов пластичности являются животные с относительно простой нервной системой, в частности моллюски. Применение модели фасилитации синаптической связи между нейронами в культуре позволило Э. Канделу и соавт. (Kandel, 2001, 2012) открыть и описать ряд базовых механизмов пластичности. На моллюсках также впервые была показана важная роль ацетилирования гистонов в формировании долговременной памяти (Guan *et al.*, 2002), что стимулировало в дальнейшем целую серию работ на позвоночных животных (Alarson *et al.*, 2004; Korzus *et al.*, 2004; Levenson *et al.*, 2004).

Для изучения молекулярных механизмов памяти в течение многих лет в качестве модели обучения мы используем выработку условного рефлекса пищевой аверзии у моллюска *Helix* (Grinkevich, Vasil'ev, 2000; Grinkevich *et al.*, 2008; Kharchenko *et al.*, 2010). Нами показано, что при формировании рефлекса пищевой аверзии в ЦНС *Helix* индуцируются как фосфорилирование и ацетилирование гистона H3 (Danilova *et al.*, 2010; Danilova, Grinkevich, 2012; Гринкевич, 2012а), так и его метилирование (Гринкевич, 2012б). При этом ацетилирование гистона H3 индуцируется через митогенактивируемый внутриклеточный регуляторный каскад MAPK/ERK (Danilova, Grinkevich, 2012). У ювенильных животных, неспособных к формированию долговременных форм оборонительных рефлексов, подвергнутых обучению, в отличие от взрослых MAPK/ERK-каскад не активируется и индукции ацетилирования гистона H3 не происходит (Grinkevich *et al.*, 2008; Danilova, Grinkevich, 2012). Мы предположили, что в дисфункции MAPK/ERK-каскада может лежать незрелость определенных форм серотониновых рецепторов (Danilova, Grinkevich, 2012), так как серотонин играет важную роль в формировании оборонительного поведения моллюсков (Балабан, Захаров, 1992; Kandel, 2001; Barbas *et al.*, 2003; Гринкевич и др., 2006; Grinkevich *et al.*, 2008). У моллюсков серотонин опосредует действие ноцицептивных стимулов и вовлечен в формирование сенситизации и условных оборонительных рефлексов. Нами показано, что истощение пула серотонина

нейротоксином 5,7-ДОТ лежит в основе дисфункции MAPK/ERK-каскада (Grinkevich *et al.*, 2008) и приводит к нарушению у *Helix* формирования условных оборонительных рефлексов (Балабан, Захаров, 1992; Grinkevich *et al.*, 2008). Однако изучение влияния серотонина на ацетилирование и метилирование гистонов при обучении *Helix* не проводилось.

Следует отметить, что серотонинергическая система играет важнейшую роль и в функционировании нервной системы позвоночных животных. Полагают, что ее нарушения являются одной из основ таких заболеваний, как депрессия (Шишкина, Дыгало, 2010; Zhao *et al.*, 2013) и шизофрения (Kurita *et al.*, 2012, 2013), характеризующихся значительными ментальными нарушениями (Kuhn *et al.*, 2013). В последние годы начались интенсивные исследования возможности лечения этих заболеваний через фармацевтические воздействия на эпигенетические процессы (Kurita *et al.*, 2012; Yamawaki *et al.*, 2012).

Таким образом, с целью изучения вовлечения серотонинергической системы в индукцию эпигенетических процессов при формировании рефлекса пищевой аверзии у *Helix* в представленной работе нами проведены исследования по влиянию дисфункции серотониновых рецепторов на процессы ацетилирования и метилирования гистона H3 путем введения неселективного антагониста серотониновых рецепторов метиотепина. Ранее показано, что введение метиотепина нарушает выработку как сенситизации оборонительной реакции виноградной улитки (Абрамова и др., 2005), так и ассоциативных рефлексов (Солнцева, Никитин, 2008). Кроме того, нами были проведены исследования по возможности реверсии долговременной памяти у животных, обработанных метиотепином, через индукцию процессов ацетилирования введением ингибитора гистондеацетилаз NaB.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на взрослых виноградных улитках *Helix lucorum*. В качестве модели обучения использовали условный рефлекс пищевого избегания (условный стимул – морковь, безусловный – удар током 8 мА, предъявление сочетаний с интервалом 15 мин). Перед

обучением животных трое суток содержали без корма. Спустя 1 час после получения животными 8 пар стимулов (по 4 сочетания в день) ЦНС извлекали и гомогенизировали.

Дисфункцию серотонинергической системы вызывали введением неспецифического антагониста серотониновых рецепторов метиотепина. Метиотепин вводили за 40 мин до обучения (доза 5 мкг/г веса). Инъекции производили в цефалопедалный синус через нечувствительную область тела улитки. Остальным животным вводили физиологический раствор.

Для индукции ацетилирования с целью влияния на процессы формирования долговременной памяти улиткам вводили ингибитор гистоновых деацетилаз бутират натрия (NaB) (Sigma). NaB растворяли в физиологическом растворе и вводили в количестве 1,2 мг на грамм веса животного (10 мкл) за час до обучения. Контрольной группе улиток вводили по 10 мкл физиологического раствора. Животных тестировали спустя 24 и 72 ч после обучения, предъявляя условный стимул (морковь), на который у улитки была выработана оборонительная реакция. При тестировании измерялся латентный период консумматорных реакций (время, которое улитка затрачивала на приближение к моркови до начала жевательных движений).

Вестерн-блот анализ. Исследования посттрансляционной модификации гистонов при обучении осуществляли методом Вестерн-блот анализа. Гомогенизацию ЦНС проводили в буфере: 10 mM Трис-HCl 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. Белковую фракцию, содержащую гистоны, выделяли, согласно Левенсону (Levenson *et al.*, 2004a). Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Брэдфорд. Экстракты, содержащие искомые белки, разделяли электрофорезом в 12 %-м полиакриламидном геле (система Лэмли) на трис-глицериновом буфере (pH = 8,3) в присутствии 0,1 % SDS. В качестве маркеров молекулярного веса использовали белки («Novex»). Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозные фильтры. 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 °C. Визуализацию и количественный анализ связавшихся антител проводили с использованием хемолуминесцентного метода (система ECL, фирма «Amersham»). Рентгеновские пленки сканировали. Количественный анализ осуществляли при помощи компьютерной программы Gel-Pro Analyzer.

В экспериментах применяли 3 типа антител: антитела к гистону H3, ацетилированному по лизину 14, антитела к гистону H3, триметилированному по лизину 4, и антитела к гистону H3, диметилированному по лизину 9 (Upstate Biotechnology, Millipore Corporation). Для оценки содержания гистонов применяли антитела к тотальным формам гистона H3 (Upstate Biotechnology, Millipore Corporation). Для каждого электрофореза рассчитывали отношения связывания антител к модифицированным формам гистона к тотальным формам. Контроли усреднялись. После чего в каждом электрофорезе рассчитывалось отношение к среднему контролю. Вторичные антитела фирмы «Amersham» (ECL-система) применяли в разведениях 1 : 1500.

Статистический анализ. Статистическая обработка проводилась методом ANOVA. Для сравнения средних в отдельных группах применяли следующие **post hoc-тесты: Scheffe, LSD, Tukey**. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ влияния антагониста серотониновых рецепторов метиотепина на ацетилирование гистона H3 при формировании рефлекса пищевой аверзии у *Helix*

Для изучения влияния метиотепина на ацетилирование гистона H3 при формировании рефлекса пищевой аверзии у *Helix* использовали

Вестерн-блот анализ с применением антител к гистону H3, ацетилованному по лизину 14. Анализ степени ацетилирования гистона H3, проводили в подглоточном комплексе ганглиев ЦНС виноградной улитки. Этот комплекс ганглиев составляет большую часть ЦНС моллюсков и контролирует оборонительное поведение. В нем находятся сенсорные, моторные, командные и модуляторные нейроны, включенные в сеть оборонительных рефлексов (Балабан, Захаров, 1992). ЦНС для экстракции гистонов извлекали спустя 1 час после обучения.

Проведенные анализы показали, что введение метиотепина значительно снижает индуцированное обучением увеличение ацетилирования гистона H3 в подглоточном комплексе ганглиев ЦНС *Helix* (рис. 1). Так, если у животных, которым перед обучением вводили физиологический раствор, уровень ацетилирования после обучения значительно превышал уровень у необученных животных ($2,4 \pm 0,4, p < 0,03$), то у животных, предварительно обработанных метиотепином, после обучения этот показатель снижался до ($0,9 \pm 0,4$) и достоверно не отличался от контроля ($p > 0,2$). При этом у обучавшихся животных, предварительно обработанных метиотепином, наблюдалось достоверное снижение уровня ацетилирования по отношению к обученным, которым вводили физиологический раствор ($p < 0,005$). Введение метиотепина не оказывало достоверного эффекта на ацетилирование гистона H3 у наивных животных ($0,9 \pm 0,5, p > 0,2$).

Анализ влияния метиотепина на метилирование гистона H3 при формировании рефлекса пищевой аверсии у *Helix*

Для оценки метилирования гистона H3 применяли антитела к гистону H3, триметилированному по лизину 4, и антитела к гистону H3, диметилированному по лизину 9. Эти модификации гистона H3 приводят к индукции экспрессии генов и их репрессии соответственно.

Исследования показали, что степень метилирования гистона H3, индуцируемая обучением под влиянием метиотепина, значительно снижалась как по активаторному, так и по ингибиторному сайтам (рис. 2) и составляла по активаторному сайту (лиз. 4) $0,74 \pm 0,02$, а по инги-

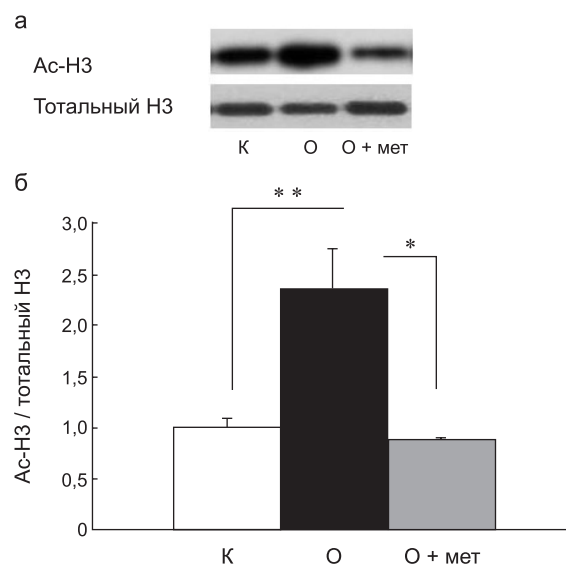


Рис. 1. Введение антагониста серотониновых рецепторов метиотепина предотвращает индуцированное обучением ацетилирование гистона H3.

а – репрезентативный иммуноблот с антителами к ацетилованному гистону H3 (Ас-Н3) и тотальным формам гистона H3; б – по оси ординат – содержание ацетилированных форм гистона H3, отнесенное к общему количеству гистона H3 и контролю. К – контроль; О – обучение; О + мет – обучение с введением метиотепина.

* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ (ANOVA Scheffe, LSD, Tukey).

биторному сайту (лиз. 9) – $0,85 \pm 0,01$. При этом у обученных животных, которым вводили физиологический раствор, уровень метилирования по активаторному сайту составлял $1,78 \pm 0,27$, а по ингибиторному сайту – $1,92 \pm 0,19$.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о важной роли серотонина как в индукции процессов ацетилирования гистона H3, так и его метилирования.

Ингибитор гистон деацетилаз NAB реверсирует формирование рефлекса пищевой аверсии у обработанных метиотепином животных *Helix*

Для оценки влияния антагониста серотониновых рецепторов метиотепина на формирование рефлекса пищевой аверсии улиткам за 40 мин до обучения вводили метиотепин (5 мкг/г). Животных тестировали через 24 и 72 ч после обучения, предъявляя условный стимул – морковку, на которую у улиток вырабатывали оборонительную реакцию. При тестировании

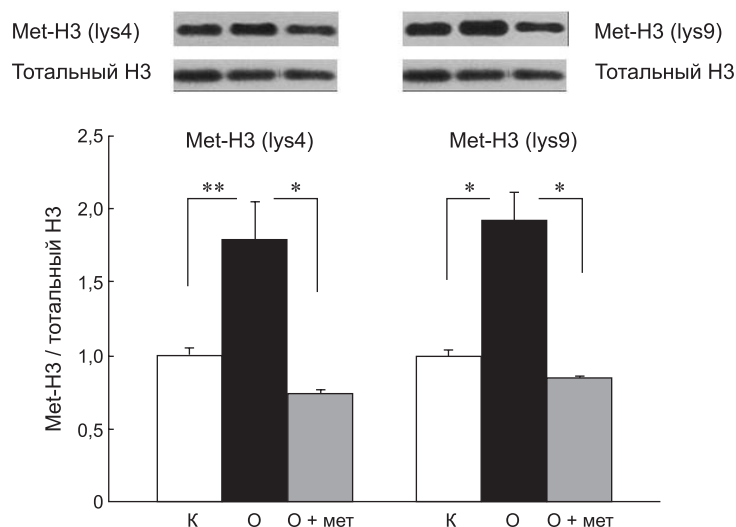


Рис. 2. Введение метиотепина предотвращает индуцированное обучением метилирование гистона H3.

Met-H3(lys4) – триметилирование гистона H3 по лизину 4; Met-H3(lys9) – диметилирование гистона H3 по лизину 9. К – контроль; О – обучение; О + мет – обучение с введением метиотепина.

* $p < 0,02$; ** $p < 0,01$ (ANOVA Scheffe Test; LSD Test; Tukey HSD test).

По оси ординат – содержание метилированных форм гистона H3, отнесенное к общему количеству гистона H3 и к контролю.

измерялся латентный период консуматорной реакции (время, которое улитка затрачивала на приближение к моркови до начала жевательных движений).

Было показано, что спустя 24 ч после обучения у животных, которым вводили физиоло-

гический раствор, латентный период консуматорной реакции увеличивался до $210 \% \pm 10 \%$ относительно наивных животных (100%). Увеличение достоверно при $p < 0,001$ (ANOVA) (рис. 3). У животных, которым вводили метиотепин, также наблюдается увеличение латентного

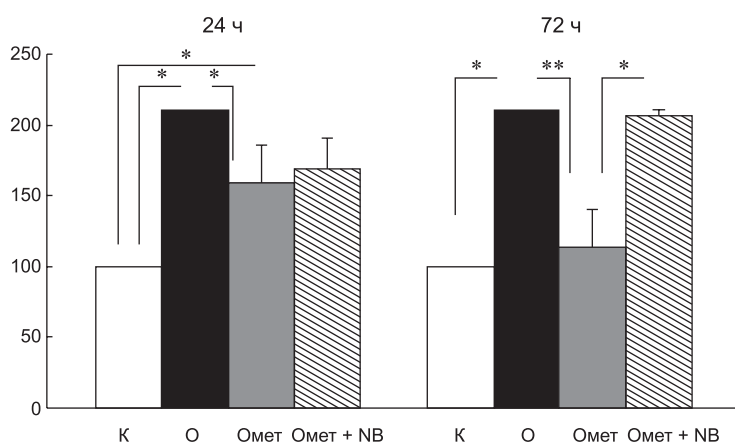


Рис. 3. Латентный период консуматорной реакции животных, подвергнутых процедуре обучения, относительно латентного периода до обучения.

Введение антагониста серотониновых рецепторов метиотепина ухудшает формирование долговременной памяти у *Helix*. Введение ингибитора гистон деацетилаз NaB способно ее реверсировать. По оси ординат – латентный период консуматорной реакции животных, подвергнутых процедуре обучения относительно латентного периода этих же животных до обучения (100%) – в процентах. К – необученные животные; О – обученные животные; Омет – животные, которым перед обучением вводили метиотепин; Омет + NaB – животные, которым перед обучением вводили метиотепин и NaB.

* $p < 0,01$; ** $p < 0,002$ (ANOVA).

периода ($159\% \pm 26\%$), отличие от наивных – при $p < 0,01$. Однако введение метиотепина приводит к достоверному уменьшению латентного периода по сравнению с обученными животными, которым вводили физиологический раствор ($p < 0,024$). Таким образом, введение метиотепина снижает латентный период консуматорной реакции животных спустя 24 ч после обучения по отношению к обученным животным, которым вводили физиологический раствор.

Значительно больший эффект оказывает введение метиотепина на более длительные сроки хранения долговременной памяти. Спустя 72 ч после обучения латентный период консуматорной реакции животных, которым вводили метиотепин, составляет $114 \pm 26\%$ и не отличается от наивных животных. По отношению к обученным животным, которым вводили физиологический раствор, уменьшение латентного периода составляет 94% (210% против 114%) ($p < 0,0002$). Таким образом, введение метиотепина значительно ухудшает формирование долговременной памяти.

С целью проверки возможности улучшения долговременной памяти у обработанных метиотепином животных мы провели серию экспериментов с ингибированием гистондеацетилаз натрием бутиратом (NaB). Ранее нами было показано, что введение этого ингибитора способствует улучшению формирования долговременной памяти у ювенильных животных (Danilova, Grinkevich, 2012). NaB вводили за 1 ч до обучения ($1,2$ мг/г). Контрольной группе улиток инъецировали физиологический раствор. Животных тестировали спустя 24 и 72 ч после обучения.

Показано, что введение NaB на фоне введения метиотепина вызывает увеличение латентного периода консуматорной реакции по отношению к наивным животным (169% через 24 ч после обучения и 206% спустя 72 ч после обучения, отличие достоверно при $p < 0,005$ по отношению к наивным животным (100%)). То есть эти животные стали обучаться. Более того, спустя 72 ч после обучения у животных, которым вводился NaB на фоне введения метиотепина, наблюдается увеличение латентных периодов по сравнению с животными, которым вводился только метиотепин ($114\% \pm 24\%$ метиотепин и $206\% \pm 4\%$ метиотепин + NaB),

отличие достоверно при $p < 0,01$. Таким образом, введение NaB предотвращает ухудшение памяти у животных с дисфункцией серотонин-эргической системы, вызванной блокадой серотониновых рецепторов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечалось выше, серотонин играет исключительно важную роль в формировании оборонительных рефлексов моллюсков. Этот модуляторный медиатор вовлечен в формирование как ассоциативных, так и неассоциативных механизмов долговременной памяти (Балабан, Захаров, 1992; Kandel, 2001; Barbas *et al.*, 2003; Абрамова и др., 2005; Гринкевич и др., 2006; Grinkevich *et al.*, 2008). Нами было показано, что при формировании рефлекса пищевой аверзии у *Helix* серотонин вовлечен в активацию регуляторного каскада MAPK/ERK (Гринкевич и др., 2006; Grinkevich *et al.*, 2008). Блокада MAPK/ERK сопровождается снижением ацетилирования гистона H3, индуцируемого обучением, и приводит к неспособности формирования рефлекса (Danilova *et al.*, 2010; Danilova, Grinkevich, 2012; Гринкевич, 2012a). Наши новые данные об ингибирующем влиянии антагониста серотониновых рецепторов метиотепина на индуцируемое обучением ацетилирование гистона H3 расширяют полученные нами ранее данные и свидетельствуют о важной роли серотонина и серотониновых рецепторов в эпигенетических процессах, происходящих в нервной системе *Helix*.

Наиболее близко к нашим исследованиям лежит работа, выполненная на модели неассоциативного обучения – фасилитации синаптической связи нейронов моллюска *Aplysia* в культуре (Guan *et al.*, 2002). Авторами впервые было показано, что на промоторе гена *C/EBP*, экспрессия которого индуцируется при фасилитации, стимулируется серотонин-зависимое ацетилирование гистона H4. Позже на этой же модели была описана стимуляция серотонином ацетилирования гистонов H4 и H3 в промоторном участке гена синапсина (Hart *et al.*, 2011).

В 2004 г. появилась целая серия работ по формированию долговременной памяти у позвоночных животных, связанных с ацетилированием как гистона H3, так и H4 (Alarson *et al.*,

2004; Korzus *et al.*, 2004; Levenson *et al.*, 2004). Сравнительные исследования различных структур мозга при формировании различных типов условных рефлексов показали избирательность вовлечения гистонов H3 и H4 для разных форм обучения и для различных структур (Levenson *et al.*, 2004; Bredy *et al.*, 2007). Полагают, что данная специфичность обусловлена экспрессией различных форм гистон деацетилаз в различных клеточных популяциях (Takase *et al.*, 2013), а также различием регуляторных путей, вовлеченных в индукцию ацетилирования (Levenson *et al.*, 2004; Bredy *et al.*, 2007).

Следует отметить, что изучение регуляторных процессов, связанных с обучением, крайне сложно и еще плохо изучено в связи с их многообразием и конвергенцией друг с другом. Особенно это относится к регуляции метилирования гистонов. Как показано в последние годы, метилирование гистонов играет важнейшую роль в функционировании мозга (Akbarian, Huang, 2009; Gupta *et al.*, 2010). Идентифицировано несколько специфических гистоновых лизин-метилтрансфераз и деметилаз, которые контролируют метилирование и деметилирование определенных специфических сайтов гистонов (Akbarian, Huang, 2009). Изучение посмертного мозга больных с ментальными нарушениями и аутизмом показало наличие у этих пациентов мутаций в генах, кодирующих как H3K9-специфические метилтрансферазы (вовлечены в метилирование гистона H3 по ингибиторному сайту лизина 9), так и H3K4-гистондеметилазы (деметилирующие активаторный сайт лизина 4) (Akbarian, Huang, 2009). Кроме того, показано, что одной из причин шизофрении могут быть нарушения в процессе дифференцировки экспрессии генов глутаматных (Stadler *et al.*, 2005) и GABA-эргических рецепторов (Akbarian, Huang, 2009), вызванные нарушениями метилирования гистона H3 по лизину 4.

Метилирование гистонов играет важную роль и в формировании долговременной памяти. Так, в промоторных участках генов фактора роста *bdnf* и ТФ *zif268*, экспрессия которых индуцируется обучением, наблюдается увеличение метилирования гистона H3 по активаторному сайту лизина 4 (Gupta *et al.*, 2010). При этом у мышей, лишенных H3K4-специфической гистон метилтрансферазы, долговременная

память нарушена. В этой же работе впервые показано, что при обучении может происходить увеличение степени метилирования гистона H3 и по ингибиторному сайту (H3K9). Увеличение степени метилирования по обоим этим сайтам наблюдалось и нами при обучении *Helix* (Гринкевич, 2012б), что позволяет говорить о вовлечении в обучение как экспрессии генов, так и репрессии. К настоящему времени описано несколько генов, экспрессия которых при обучении регулируется в противоположном направлении (Ressler *et al.*, 2002). Так, индуцируется экспрессия генов *c-fos*, *zif268*, *Nurr1*, кодирующих ТФ, а также стабилизатора NMDA-рецептора альфа-актинина и протеиназного ингибитора 16с8. При этом ингибируется экспрессия ингибитора Са-кальмодулинового сигналинга Rс3/нейрогранина и стабилизатора GABA/Gly-рецепторов. Репрессия может касаться и ингибиторных транскрипционных факторов. Дальнейшие исследования в этой области представляются перспективными и могут пролить свет также на сложнейшие взаимодействия возбуждающих и тормозных путей в формировании долговременной памяти.

Интересными представляются полученные нами данные по вовлечению серотониновых рецепторов в индукцию не только процессов ацетилирования, но и метилирования, причем как по активаторному, так и ингибиторному сайтам. Параллельно с нами были получены сходные данные на мышах, нокаутных по серотониновому рецептору 5HT-2A. У этих животных при обучении наблюдается синхронное изменение как ацетилирования, так и метилирования гистона H3 в промоторном участке гена глутаматного рецептора (Kurita *et al.*, 2012). Однако в данной работе, в отличие от нашей, изменения затрагивают другие сайты ацетилирования и метилирования гистона H3. Наблюдаемое нами угнетение метиотепином метилирования гистона H3 по ингибиторному сайту, вероятно, свидетельствует о вовлечении серотонина и в тормозные системы, которые играют важную роль в формировании условных оборонительных рефлексов.

Таким образом, изучение регуляторных механизмов индукции метилирования гистонов при формировании долговременной памяти только начинается. Наша работа, демонстри-

рующая участие серотониновых рецепторов в индукции процессов метилирования, является одним из первых шагов в этом направлении.

Кроме того, нами показано, что нарушение формирования долговременной памяти, вызванное введением антагониста серотониновых рецепторов у *Helix*, может быть реверсировано через индукцию процессов ацетилования введением ингибитора гистондеацетилаз NaB. Ранее нами была показана возможность индукции механизмов долговременной памяти у ювенильных животных с незрелой серотонинергической системой через введение этого же ингибитора (Danilova, Grinkevich, 2012). В настоящее время ингибиторы гистондеацетилаз интенсивно изучаются в связи с возможностью улучшения ментальных характеристик при их нарушениях (Fischer *et al.*, 2007; Abel, Zukin, 2008). Ингибиторы гистондеацетилаз влияют и на процессы метилирования. Так, в культуре нейронов, обработанных ингибитором деацетилаз NaB, происходит не только увеличение ацетилования гистона H3, но и увеличение его метилирования по лизину 4 (Akbarian, Huang, 2009). Введение NaB перед обучением влияет также и на уровень метилирования гистона H3 по ингибиторному сайту лизина 9 (Gupta *et al.*, 2010). Таким образом, введение ингибиторов гистон деацетилаз может оказывать аддитивный эффект на улучшение ментальных процессов как через ацетилование гистонов, так и через метилирование. Однако механизмы влияния индукции ацетилования на процессы метилирования гистонов остаются плохо изученными.

Появились первые исследования, показывающие, что ингибиторы HDAC могут оказывать и прямое влияние на функционирование серотонинергической системы, в частности через изменение экспрессии транспортера серотонина (SERT) (Gill *et al.*, 2013), что может лежать в основе улучшения долговременной памяти, в формирование которой, как и в нашем случае, вовлечена серотонинергическая система.

ВЫВОДЫ

Введение неселективного антагониста серотониновых рецепторов метиотепина перед обучением снижает индуцированное обучением

увеличение ацетилования и метилирования гистона H3 в ЦНС виноградной улитки и приводит к значительному ухудшению долговременной памяти. Таким образом, наши данные свидетельствуют о важной роли серотонина в индукции эпигенетических процессов при формировании рефлекса пищевой аверзии у *Helix*.

Нарушение формирования долговременной памяти, связанное с дисфункцией серотониновых рецепторов, может быть реверсировано индукцией процессов ацетилования введением блокатора гистондеацетилаз NaB. Животные с дисфункцией серотонинергической системы могут служить удобной моделью для изучения дефектов долговременной памяти и использоваться для поиска веществ, ее улучшающих.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-01681.

ЛИТЕРАТУРА

- Абрамова М.С., Нистратова В.Л., Москвитин А.А., Пивоваров А.С. Метиотепин-чувствительные серотониновые рецепторы вовлечены в постсинаптический механизм сенситизации оборонительной реакции виноградной улитки // Журн. высш. нерв. деятельности. 2005. Т. 55. № 3. С. 385–392.
- Балабан П.М., Захаров И.С. Обучение и развитие: общая основа двух явлений. М.: Наука, 1992. 152 с.
- Гринкевич Л.Н. Эпигенетика и формирование долговременной памяти // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2012а. Т. 98. № 5. С. 553–574.
- Гринкевич Л.Н. Исследование метилирования гистона H3 при формировании долговременной памяти // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2012б. Т. 98. № 9. С. 1111–1118.
- 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. журн. им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 92. № 5. С. 536–545.
- Солнцева С.В., Никитин В.П. Нейрохимические механизмы консолидации ассоциативного аверсивного обучения на пищу у виноградной улитки // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94. № 11. С. 1259–1269.
- Шишкина Т.Г., Дыгалю Н.Н. Нейробиологические основы депрессивных расстройств и действия антидепрессантов // Журн. высш. нерв. деятельности. 2010. Т. 60. № 2. С. 138–152.
- Abel T., Zukin R.S. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders // Curr. Opin. Pharmacol. 2008. V. 8. No. 1. P. 57–64.
- Akbarian S., Huang H.S. Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation // Biol. Psychiatry. 2009. V. 65. No. 3. P. 198–203.

- 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. No. 6. P. 947–959.
- Alberini C.M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. No. 1. P. 121–145.
- Barbas D., DesGroseillers 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.
- Berger S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription // *Nature*. 2007. V. 447. P. 407–412.
- Bredy T.W., Wu H., Crego C. *et al.* Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear // *Learn Mem.* 2007. V. 14. No. 4. P. 268–276.
- Danilova A.B., Grinkevich L.N. Inability of juvenile snails for long-term memory formation depends on acetylation status of histone H3 and can be improved by NaB treatment // *PLoS ONE*. 2012. V. 7. Issue 7. e41828. P. 1–8.
- Danilova A.B., Kharchenko O.A., Shevchenko K.G., Grinkevich L.N. Histone H3 acetylation is asymmetrically induced upon learning in identified neurons of the food aversion network in the mollusk *Helix lucorum* // *Front. Behav. Neurosci.* 2010. V. 4. No. 180. P. 1–7.
- Fischer A., Sananbenesi F., Wang X. *et al.* Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodeling // *Nature*. 2007. V. 447. No. 7141. P. 178–182.
- Gill R.K., Kumar A., Malhotra P. *et al.* Regulation of intestinal serotonin transporter expression via epigenetic mechanisms: role of HDAC2 // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013. V. 304. No. 4. P. 334–341.
- Grinkevich L.N., Vasil'ev G.V. Possible mechanisms of the regulation of genes expression during learning // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2000. V. 30. No. 3. P. 277–292.
- 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. No. 4. P. 483–493.
- Guan J.S., Haggarty S.J., Giacometti E. *et al.* HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity // *Nature*. 2009. V. 459. No. 7243. P. 55–60.
- Gupta S., Kim S.Y., Artis S. *et al.* Histone methylation regulates memory formation // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. No. 10. P. 3589–3599.
- Hart A.K., Fioravante D., Liu R.Y. *et al.* Serotonin-mediated synapsin expression is necessary for long-term facilitation of the Aplysia sensorimotor synapse // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. No. 50. P. 18401–18411.
- Kandel E. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB // *Mol. Brain*. 2012. V. 5. No. 14. P. 1–12.
- Kandel E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses // *Science*. 2001. V. 294. No. 5544. P. 1030–1048.
- Kharchenko O.A., Grinkevich V.V., Vorobiova O.V., Grinkevich L.N. Learning-induced lateralized activation of the MAPK/ERK cascade in identified neurons of the food-aversion network in the mollusk *Helix lucorum* // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2010. V. 94. No. 2. P. 158–166.
- Korzus E., Rosenfeld M.G., Mayford M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation // *Neuron*. 2004. V. 42. No. 6. P. 961–972.
- Kuhn M., Popovic A., Pezawas L. Neuroplasticity and memory formation in major depressive disorder: An imaging genetics perspective on serotonin and BDNF // *Restor. Neurol. Neurosci.* 2013. [Epub ahead of print].
- Kurita M., Holloway T., Garcia-Bea A. *et al.* HDAC2 regulates atypical antipsychotic responses through the modulation of mGlu2 promoter activity // *Nat. Neurosci.* 2012. V. 15. No. 9. P. 1245–1254.
- Kurita M., Moreno J.L., Holloway T. *et al.* Repressive epigenetic changes at the mGlu2 promoter in frontal cortex of 5-HT2A knockout mice // *Mol. Pharmacol.* 2013. V. 83. No. 6. P. 1166–1175.
- 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.
- Ressler K.J., Paschall G., Zhou X.L., Davis M. Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. No. 18. P. 7892–7902.
- Stadler F., Kolb G., Rubusch L. *et al.* Histone methylation at gene promoters is associated with developmental regulation and region-specific expression of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in human brain // *J. Neurochem.* 2005. V. 94. No. 2. P. 324–336.
- Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications // *Nature*. 2000. V. 403. No. 6765. P. 41–45.
- Takase K., Oda S., Kuroda M., Funato H. Monoaminergic and neuropeptidergic neurons have distinct expression profiles of histone deacetylases // *PLoS One*. 2013. V. 8. No. 3. e58473 P. 1–19.
- Wood M.A., Hawk J.D., Abel T. Combinatorial chromatin modifications and memory storage: A code for memory // *Learn. Mem.* 2006. V. 13. P. 241–244.
- Yamawaki Y., Fuchikami M., Morinobu S. *et al.* Antidepressant-like effect of sodium butyrate (HDAC inhibitor) and its molecular mechanism of action in the rat hippocampus // *World J. Biol. Psychiatry*. 2012. V. 13. No. 6. P. 458–467.
- Zhao J., Goldberg J., Bremner J.D., Vaccadrino V. Association between promoter methylation of serotonin transporter gene and depressive symptoms: a monozygotic twin study // *Psychosom. Med.* 2013. V. 75. No. 6. P. 523–529.

**ROLE OF THE MODULATORY MEDIATOR SEROTONIN
IN THE INDUCTION OF EPIGENETIC PROCESSES
DURING LONG TERM MEMORY FORMATION IN *HELIX*****L.N. Grinkevich, O.V. Vorobiova**

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia,
e-mail: Larisa_Gr_spb@mail.ru

Summary

Epigenetic mechanisms controlling long-term memory formation are a promising field in neurobiology. They include posttranslational histone modifications, which lead to chromatin remodeling and thereby influences gene expression involved in learning. Mollusks are a popular model in neurobiology, because they have relatively simple CNSs with giant neurons. Previously, we found strong induction of histone H3 acetylation and methylation during food aversion conditioning in *Helix*. We think that these processes are regulated by modulatory mediator serotonin, playing an important role in avoidance behavior. To study the influence of serotonin on induction of epigenetic processes, we investigated the action of an unselective antagonist of serotonin receptors, metitepine, on the acetylation and methylation of histone H3 during *Helix* learning. We found that metitepine treatment prevented activation of methylation and acetylation of H3 induced by learning in the CNS of the snail and deteriorates long term memory formation. Long-term memory formation in metitepine-treated animals can be improved by treatment with histone deacetylase inhibitor NaB. Our data confirm the important role of serotonin in the induction of epigenetic processes during aversion conditioning in *Helix*.

Key words: epigenetics, histone methylation and acetylation, metitepine, serotonin, memory, *Helix* mollusk, NaB HDAC inhibitor.