

УДК 57.052:57.053:577.25:612.829

ИНДУКЦИЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ИНГИБИРОВАНИЕМ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗ РЕВЕРСИРУЕТ ФОРМИРОВАНИЕ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ У ПЛОХО ОБУЧАЮЩИХСЯ ЖИВОТНЫХ С ДИСФУНКЦИЕЙ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ

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

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 5 декабря 2013 г. Принята к публикации 16 января 2014 г.

Одной из актуальных задач нейробиологии является изучение механизмов формирования долговременной памяти и поиск путей ее улучшения. Удобной моделью для этих целей являются животные с нарушенным функционированием серотонинергической системы. Так, выключение серотонинергических нейронов введением нейротоксина 5,7-ДОТ приводит к неспособности моллюска *Helix* к образованию условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии. Причем нами было показано, что в формирование пищевой аверзии вовлекаются эпигенетические процессы, в частности ацетилирование и метилирование гистонов, а их нарушение делает животных неспособными к формированию долговременной памяти. Целью данной работы являлось исследование возможности реверсии формирования долговременной памяти у ДОТ-обработанных животных через индукцию процессов ацетилирования. Было показано, что введение ингибиторов гистондеацетилаз NaB и Трихостатина А значительно увеличивает способность ДОТ-обработанных животных к формированию рефлекса пищевой аверзии. Полученные данные свидетельствуют о важной роли серотонина в эпигенетических процессах, лежащих в основе формирования данного вида долговременной памяти, и возможности через индукцию процессов ацетилирования существенно улучшать ее характеристики. Модель «нейродегенерации», полученная на основе выключения серотонинергических нейронов, может быть полезной для дальнейшего изучения эпигенетических механизмов нарушения долговременной памяти и скрининга веществ, влияющих на ее формирование.

Ключевые слова: эпигенетика, ацетилирование гистонов, серотонин, память, моллюск *Helix*, нейротоксин 5,7-ДОТ, ингибиторы гистондеацетилаз NaB, TSA.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных задач нейробиологии является изучение механизмов формирования долговременной памяти и поиск путей ее улучшения. В последние годы в этой области наметился существенный прогресс, в значительной мере связанный с открытиями в области эпигенетики. Наибольший интерес исследователей прикован к ацетилированию гистонов, так как ацетилирование приводит к индукции экспрессии генов, вовлекаемых в формирова-

ние нейрональной пластичности, а нарушение ацетилирования лежит в основе ряда нейродегенеративных патологий, сопровождающихся значительным ухудшением памяти (Wood *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2007; Abel, Zukin, 2008). Уровень ацетилирования гистонов контролируется ферментами гистонацетилтрансферазами (НАТ) и гистондеацетилазами (HDAC) (de Ruijter *et al.*, 2003; Sweatt, 2009). НАТ катализируют перенос ацетильной группы с ацетил-КоА на лизиновый остаток белков, обладают специфичностью по ацетилированию различных сайтов гистонов

(Jin *et al.*, 2011) и, кроме того, участвуют в ацетилировании ряда негистоновых белков, в том числе транскрипционных факторов (ТФ), таких как p53, GATA-1, Myo-D и NFκB (Spange *et al.*, 2009). При этом ацетилирование увеличивает ДНК-связывающую активность ТФ и, соответственно, индуцирует транскрипцию. Гистондеацетилазы контролируют деацетилирование и также отличаются значительным разнообразием. HDACs класса I (1,2,3,8) – это ядерные белки, которые экспрессируются повсеместно. HDACs класса II (4,5,6,7,9,10) экспрессируются ткане- и клеточно-специфично и курсируют между ядром и цитоплазмой (de Ruijter *et al.*, 2003). Оба класса HDACs важны для работы нервной системы. Показано, что HDACs вовлекаются в регуляцию синаптической пластичности и формирование долговременной памяти (Alarson *et al.*, 2004; Korzus *et al.*, 2004). И, как обнаружено буквально в последние годы, при этом наблюдается избирательное вовлечение различных HDACs в формирование разных видов условных и безусловных рефлексов (Guan *et al.*, 2009; Bahari-Javan *et al.*, 2012; Mungenast, Tsai, 2012; Sando *et al.*, 2012).

В настоящее время ведутся интенсивные исследования, направленные на возможность через индукцию процессов ацетилирования (путем применения блокаторов гистондеацетилаз) влиять на ментальные характеристики (Fischer *et al.*, 2007; Abel, Zukin, 2008). Исторически ингибиторы HDACs начали впервые применять для лечения раковых заболеваний у людей. Эти ингибиторы задерживают клеточный рост и индуцируют дифференцировку (Ververis *et al.*, 2013). Для блокирования HDACs используют бутираты, вальпроевую кислоту, а также Трихостатин А (ТСА) и SAHA, которые обладают некоторой специфичностью эффекта по отношению к определенным классам HDACs и различной проникающей способностью через гематоэнцефалический барьер. Показана принципиальная возможность применения ингибиторов HDACs для улучшения ментальных характеристик при заболеваниях, в патогенезе которых лежат эпигенетические нарушения, в том числе болезни Хантингтона, Паркинсона, Альцгеймера, ишемические инсульты, депрессия и шизофрения (Abel, Zukin, 2008). Высказываются оптимистические прогнозы

и по возможности применения блокаторов HDACs для улучшения ментальных процессов, нарушенных при старении (Peleg *et al.*, 2010). В этих областях в данное время ведутся широкомасштабные исследования. Однако в связи со сложностью устройства ЦНС и регуляторных систем, вовлеченных в индукцию экспрессии генов, полученные данные часто носят фрагментарный и противоречивый характер.

Существенную роль в изучении молекулярных механизмов долговременной памяти сыграли животные с простыми нервными системами, в том числе моллюски. Применение модели фасилитации синаптической связи между нейронами моллюска *Aplysia* в культуре позволило открыть и описать ряд базовых механизмов пластичности, в том числе показать важную роль ацетилирования гистонов в формировании долговременной памяти (Guan *et al.*, 2002; Levenson, Sweatt, 2006; Kandel, 2012).

Нами в качестве модели обучения используется выработка условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии у моллюска *Helix lucorum*. Было показано, что значительную роль в формировании этого рефлекса играют ацетилирование и метилирование гистона H3 (Danilova *et al.*, 2010; Danilova, Grinkevich, 2012; Гринкевич, 2012а, б), а также ацетилирование ряда негистоновых белков (Данилова и др., 2010). При этом ацетилирование индуцируется через внутриклеточный регуляторный каскад MAPK/ERK, который в свою очередь активируется медиатором серотонином (Grinkevich *et al.*, 2008; Danilova *et al.*, 2010; Гринкевич, 2012а). Серотонин в ЦНС моллюсков опосредует действие безусловного ноцицептивного стимула и играет важнейшую роль в формировании оборонительных рефлексов (Балабан, Захаров, 1992; Гринкевич и др., 2006; Grinkevich *et al.*, 2008; Kandel, 2012). Селективное выключение серотонинергических нейронов взрослых животных при введении нейротоксина 5,7-диокситриптамина (5,7-ДОТ) предотвращает активацию регуляторного каскада MAPK/ERK и значительно ухудшает способность животных к обучению (Гринкевич и др., 2006; Grinkevich *et al.*, 2008). Действие 5,7-ДОТ на поведенческом и клеточном уровнях у моллюсков подробно описано в литературе (Балабан, Захаров, 1992). Показано, что эффект 5,7-ДОТ на серотонинергические

нейроны и поведение животных сохраняется 1,5–2 месяца, что позволяет использовать ДОТ-обработанных животных в качестве модельных объектов для изучения механизма нейродегенерации и способов устранения ее механизма негативных последствий.

Следует отметить, что серотонинергическая система играет важнейшую роль и в функционировании нервной системы позвоночных животных. Полагают, что ее нарушение является 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). Предполагается возможность лечения этих заболеваний через влияние на процессы ацетилирования (Kurita *et al.*, 2012; Yamawaki *et al.*, 2012).

Целью данной работы является изучение возможности реверсии формирования долговременной памяти у моллюска *Helix* с дисфункцией серотонинергических нейронов, вызванной введением нейротоксина 5,7-ДОТ через индукцию процессов ацетилирования. Индукцию ацетилирования осуществляли путем введения животным перед обучением двух различных ингибиторов гистондеацетилаз – натрия бутирата (NaB) и Трихостатина (ТСА).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При выработке условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии у виноградной улитки условным стимулом являлась морковь, безусловным – удар электрическим током (8 мА). Морковь располагали на расстоянии 1 см от головы животного. Сочетанные предъявления пищи и тока осуществляли каждые 15–20 минут. Животные получали 8 сочетаний в течение двух дней. Тестирование проводили спустя четверо суток после обучения, предъявляя условный стимул – морковь. При тестировании измерялся латентный период консуматорной реакции (время, которое улитка затрачивала на приближение к моркови до начала жевательных движений). Если животное не начинало поедать пищу в течение 150 с, тест прекращали.

Дисфункцию серотонинергических нейронов осуществляли путем введения нейротоксина 5,7-диокситриптамина. Этот нейроток-

син вызывает истощение пула серотонина в серотонинергических нейронах, что приводит к селективному выключению серотонинергических нейронов, дегенерации серотониновых терминалей и на поведенческом уровне – к невозможности формирования долговременных форм условных оборонительных рефлексов. Нейротоксин 5,7-ДОТ вводили в дозе 20 мкг на 1 грамм веса животного в два этапа с интервалом 6 дней. Животных брали в эксперимент спустя 7 дней после последней инъекции. 5,7-ДОТ растворяли в физиологическом растворе для моллюсков. Инъекции производили в цефалопедалный синус через нечувствительную область тела улитки. Остальным животным, используемым в эксперименте, вводили физиологический раствор.

Для индукции ацетилирования с целью влияния на процессы формирования долговременной памяти улиткам перед каждой серией обучения вводили ингибитор гистоновых деацетилаз бутират натрия (NaB) или Трихостатин А (ТСА). NaB растворяли в физиологическом растворе и вводили в количестве 1,2 мг на 1 грамм веса животного (10 мкл) за час до обучения. ТСА вводили в количестве (2 мкг/г). Контрольной группе улиток инъецировали по 10 мкл физиологического раствора.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние ингибитора гистондеацетилаз NaB на формирование рефлекса пищевой аверзии у животных с дисфункцией серотонинергических нейронов

Проведенные сравнительные исследования показали, что при формировании условного рефлекса пищевой аверзии рефлекса у виноградной улитки происходит значительное увеличение латентного периода консуматорной реакции. При этом у животных с дисфункцией серотонинергических нейронов введением ней-

ротоксина 5,7-ДОТ, подвергнутых процедуре обучения, увеличения латентного периода не наблюдалось. Тестирование через 4 суток после обучения (рис. 1). Так, латентный период консуматорной реакции у обученных животных, не обработанных ДОТ, значительно возрастал и достоверно отличался от латентного периода у этих животных до обучения (143 ± 16 с и 50 ± 6 с соответственно, $p < 0,004$). При этом у ДОТ-обработанных животных, подвергнутых обучению, латентный период составлял всего 76 ± 18 с и достоверно не отличался от латентного периода у этих животных до обучения. Более того, латентный период консуматорной реакции ДОТ-обработанных животных, подвергнутых обучению, при $p < 0,02$ достоверно отличался от латентного периода обученных животных, не обработанных ДОТ. Таким образом, введение 5,7-ДОТ приводило к неспособности этих животных к формированию долговременной памяти.

С целью изучения возможности реверсии долговременной памяти у ДОТ-обработанных животных этим животным перед обучением ввели ингибитор гистон деацетилаз NaB (1,2 мг/г),

который ингибирует HDAC классов 1 и 2. При этом у животных значительно возрастал латентный период консуматорной реакции, который достоверно отличался как от латентного периода этих животных до обучения ($p < 0,003$), так и по отношению к ДОТ-обработанным животным, которым NaB не вводили ($p < 0,03$) (рис. 1). Более того, латентный период консуматорной реакции у подвергнутых обучению ДОТ-обработанных животных, которым вводили NaB, достоверно не отличался от латентного периода обученных животных, не обработанных ДОТ. Таким образом, введение NaB реверсировало формирование долговременной памяти у ДОТ-обработанных животных.

Влияние ингибитора гистондеацетилаз ТСА на формирование рефлекса пищевой аверсии у животных с дисфункцией серотонинергических нейронов

Другой группе ДОТ-обработанных животных перед обучением ввели Трихостатин А. Этот блокатор гистондеацетилаз ингибирует HDAC классов 1, 2 и 4. Как видно из рис. 2,

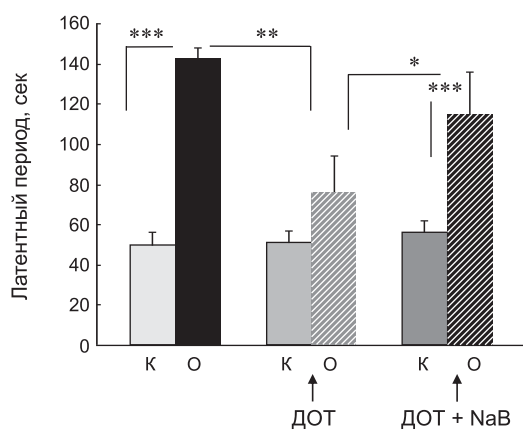


Рис. 1. Влияние нейротоксина 5,7-ДОТ и ингибитора гистондеацетилаз NaB на формирование рефлекса пищевой аверсии у *Helix*.

Введение нейротоксина 5,7-ДОТ нарушает формирование долговременной памяти. Введение ингибитора гистондеацетилаз NaB ее реверсирует. По оси ординат – латентный период консуматорной реакции животных до обучения и после процедуры обучения. К – животные до обучения; О – обученные животные; ДОТ – животные, которым вводили 5,7-ДОТ; ДОТ + NaB – животные, которым вводили 5,7-ДОТ и NaB. * $p < 0,04$; ** $p < 0,02$; *** (ANOVA). $F(5,28) = 10,719$ $p < 0,0001$.

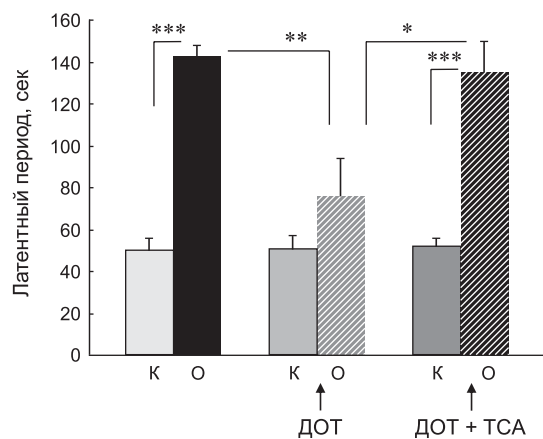


Рис. 2. Влияние нейротоксина 5,7-ДОТ и ингибитора гистондеацетилаз ТСА на формирование рефлекса пищевой аверсии у *Helix*.

Введение ингибитора гистондеацетилаз ТСА реверсирует формирование долговременной памяти у ДОТ-обработанных животных. По оси ординат – латентный период консуматорной реакции животных до и после обучения. К – животные до обучения; О – обученные животные; ДОТ – животные, которым вводили 5,7-ДОТ; ДОТ + TSA – животные, которым вводили 5,7-ДОТ и TSA. * $p < 0,03$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,003$ (ANOVA). $F(5,27) = 17,224$ $p < 0,00001$.

введение ТСА также оказывает значительный протектирующий эффект.

Показано, что латентный период консуматорной реакции у ДОТ-обработанных животных, которым вводили ТСА, значительно возрастает как по отношению к латентному периоду этих животных до обучения (52 ± 4 и 135 ± 4 соответственно, $p < 0,002$), так и к латентному периоду (76 ± 18) ДОТ-обработанных животных, подвергнутых обучению, которым ТСА не вводили (достоверно при $p < 0,03$). Кроме того, введение ТСА ДОТ-обработанным животным перед обучением, как и в случае введения NaВ, приближало их латентный период к уровню обученных животных, не обработанных ДОТ. То есть ДОТ-обработанные животные, которым вводили ингибитор гистондеацетилаз ТСА, также стали обучаться.

Таким образом, введение перед обучением ингибиторов HDAC как NaВ, так и ТСА, реверсирует формирование долговременной памяти у животных с дегенерацией серотонинергических терминалей, вызванной введением нейротоксина 5,7-ДОТ. Эффективность воздействия этих ингибиторов гистондеацетилаз на формирование долговременной памяти сравнима.

ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из важнейших задач современности является поиск веществ, способных улучшить формирование долговременной памяти, особенно в случае ее нарушения при различных заболеваниях, в том числе и нейродегенеративных. В этой связи интенсивно исследуются ингибиторы гистондеацетилаз, которые влияют на формирование долговременной памяти через индукцию эпигенетических процессов, главным образом процессов ацетилирования. В нашей работе в качестве модели «нейродегенерации» использовалось выключение работы серотониновых нейронов у моллюска *Helix lucorum* нейротоксином 5,7-ДОТ. Эти животные не способны к формированию долговременных форм условных оборонительных рефлексов. Нами было показано, что введением ингибиторов гистондеацетилаз NaВ и ТСА перед обучением можно реверсировать формирование долговременной памяти у этих ДОТ-обработанных животных. Причем эффективными оказались оба

используемых HDAC ингибитора. Особенно наглядно эффект проявляется при тестировании животных спустя 4 дня после обучения, что подтверждает данные, полученные на позвоночных, о возможности индукции долговременной памяти ингибиторами HDAC даже при значительных ее нарушениях, в том числе и связанных с нейродегенерацией (Fischer *et al.*, 2007), и свидетельствует об эволюционной консервативности эпигенетических процессов.

Ранее нами было показано, что ацетилирование как гистона H3, так и негистоновых белков играет значительную роль в формировании пищевой аверзии у *Helix* (Danilova *et al.*, 2010; Danilova, Grinkevich, 2012). При этом ацетилирование индуцируется через внутриклеточный регуляторный каскад MAPK/ERK, который, в свою очередь, активируется медиатором серотонином (Grinkevich *et al.*, 2008; Danilova *et al.*, 2010). Более того, позднее созревание серотонинергической системы у ювенильных моллюсков является одной из причин их неспособности к формированию долговременных форм оборонительных рефлексов (Балабан, Захаров, 1992). При этом у ювенильных животных наблюдается MAPK/ERK-зависимая дисрегуляция ацетилирования гистона H3 и ряда негистоновых белков (Данилова и др., 2010; Danilova, Grinkevich, 2012). Стимулирование ацетилирования введением NaВ способно значительно улучшить у них формирование долговременной памяти.

Наши новые данные об эффективности применения ингибиторов HDAC для реверсии долговременной памяти взрослых животных с дисфункцией серотонинергических нейронов свидетельствуют, с одной стороны, о важной роли серотонина в эпигенетических механизмах долговременной памяти, а с другой, о возможности применения ингибиторов HDAC для коррекции памяти не только у ювенильных, но и у взрослых животных с «нейродегенерацией» серотонинергических нейронов. При этом ингибиторы HDAC могут оказывать комплексный эффект на формирование долговременной памяти через стимулирование ацетилирования как гистонов, так и ряда негистоновых белков с дальнейшим изменением экспрессии нижележащих генов, вовлекаемых в формирование длительных пластических перестроек. В настоящее время ведутся интенсивные исследования

по скринингу белков, вовлекаемых в процессы формирования долговременной памяти, экспрессия которых связана с ацетилизацией. Такие данные уже получены для раннего гена *C/ebp* (Guan *et al.*, 2002), *Bdnf promoter1/2*, *Erg1*, *Fos*, *Camk2a*, *Creb1* и субъединиц MNDA рецепторов (Guan *et al.*, 2009).

Однако дискуссионными остаются вопросы о специфичности индукции процессов ацетилирования через введение ингибиторов HDAC и их побочных эффектах, так как применяемые в настоящее время блокаторы, такие как TSA, бутираты и SAHA, ингибируют широкие классы HDAC и теоретически должны вызывать массовое гиперацетилирование и, соответственно, массовую индукцию экспрессии генов. Однако интересным и пока плохо объяснимым фактом является то, что индукция гиперацетилирования ингибиторами HDACs влияет на экспрессию не более 20 % генов (Ververis *et al.*, 2013). Главным образом изменение касается от 1 до 7 % генов (Ruijter *et al.*, 2003). При этом наблюдается индукция экспрессии примерно половины из них, а остальные, напротив, ингибируются (Ververis *et al.*, 2013). Предполагается, что одной из причин этого явления может быть различие корепрессорных комплексов, связывающихся с различными HDAC, которые, в свою очередь, подвергаются модификациям через различные механизмы (Ruijter *et al.*, 2003). А с другой стороны, для изменения экспрессии генов еще требуется, как минимум, активация или ингибирование соответствующих ТФ, а их наборы различны в промоторах разных генов. И более того, их активация регулируются через различные внутриклеточные регуляторные системы, которые, соответственно, должны быть синхронно активируемы (Alberini, 2009; Гринкевич, 2012а).

Что касается долговременной памяти, то исследования последних лет показали избирательное вовлечение различных HDACs в формирование различных видов условных и безусловных рефлексов (Guan *et al.*, 2009; Mungenast, Tsai, 2012; Bahari-Javan *et al.*, 2012). Эта специфика может объясняться опять же как отличием их корепрессорных комплексов, так и различным профилем экспрессии HDACs в функционально отличных нейронах (Takase *et al.*, 2013). HDAC1 (но не другие виды HDACs)

вовлечена в затухание гиппокамп-зависимой памяти, связанной с боязнью окружения (Bahari-Javan *et al.*, 2012). При этом ее индукция сопровождается деацетилизацией гистона H3 по лизину 9 и увеличением метилирования гистона H3 по этой же позиции в гиппокампе. Установлена различная роль HDAC1 и HDAC2 в формировании долговременной памяти (Guan *et al.*, 2009). Эти HDAC дифференциально регулируют подгруппы генов, вовлекаемых в синаптическую пластичность и память. При этом HDAC2 в отличие от HDAC1 более эффективно экспрессируется в нервной системе, подвергается посттрансляционной модификации и более эффективно ингибируется ингибиторами HDAC. Кроме того, *Hdac1*-дефицитные мыши гибнут в эмбриогенезе, тогда как *Hdac2*-дефицитные мыши живучи и обладают улучшенной памятью.

Очень интересной HDAC является HDAC4, принадлежащая ко второму классу. Она курсирует между ядром и цитоплазмой и негативно влияет на синтез белков, включенных в синаптическую пластичность и память (Sando *et al.*, 2012). Ее активация достигается транслокацией, которая регулируется через NMDA рецепторы и фосфорилирование. На HDAC4 не действуют ингибиторы HDAC.

Показано, что активность гистондеацетилаз увеличивается при старении в структурах, связанных с памятью, в гиппокампе и коре (Dos Santos *et al.*, 2013). При этом с возрастом нарушается ацетилизация гистона H4 по лизину 12 (Peleg *et al.*, 2010). Применение ингибиторов HDAC способно реверсировать ацетилизацию по этому сайту и улучшить долговременную память.

В настоящее время ведутся поиски селективных ингибиторов HDAC. Так, описан ингибитор Crebinostat (Fass *et al.*, 2013), который ингибирует преимущественно деацетилазы класса I. При этом Crebinostat индуцирует ацетилизацию гистонов H3 и H4, CREB-зависимую экспрессию нижележащих генов и формирование гиппокамп-зависимых видов условных рефлексов.

Эффекты применения ингибиторов могут носить достаточно сложный характер воздействия на молекулярные события в мозге. Так, показано, что TSA оказывает положительный

эффект на экспрессию гена *Bdnf* экзона 1 в нейронах гиппокампа и, соответственно, на ментальные процессы через увеличение ацетилирования гистона H3 по лиз 9 и 14 (Tian *et al.*, 2010). При этом, однако, происходит также синхронное TCA-зависимое ацетилирование гистона H3 по этим же позициям в промоторе *Hdac1*, что, соответственно, индуцирует экспрессию этой гистондеацетилазы. То есть индуцируется компенсаторная реакция (отрицательная обратная связь). Более того, показано, что индукция ацетилирования бутиратом натрия может приводить к затуханию рефлекса (Stafford *et al.*, 2012). Таким образом, в ЦНС происходит конвергенция эпигенетических процессов, отражающих взаимодействие активаторных и тормозных путей, вовлеченных в формирование долговременной памяти.

Появились первые работы, показывающие, что ингибиторы HDAC способны стимулировать экспрессию генов не только через увеличение степени ацетилирования гистонов, но и через индукцию метилирования активаторных сайтов гистонов (Akbarian, Huang, 2009). Однако механизмы взаимодействия еще плохо изучены. Нами ранее обнаружено, что в формирование рефлекса пищевой аверзии у *Helix* наряду с ацетилированием вовлекается и метилирование гистона H3 (Гринкевич, 2012б). Дальнейшие исследования на моделях нейродегенерации (введение нейротоксина 5,7 ДОТ) позволят нам понять взаимосвязь процессов ацетилирования гистонов с их метилированием. Кроме того, высказываются положения, 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, в свою очередь, может лежать в основе улучшения долговременной памяти, в формирование которой, как и в нашем случае, вовлечена серотонинергическая система.

Полученные нами новые данные о возможности реверсии долговременной памяти у ДОТ-обработанных взрослых животных с нарушенной работой серотониновой системы через введение ингибиторов гистондеацетилаз свидетельствует о важной роли серотонина в эпигенетических процессах, лежащих в основе формирования условного рефлекса пищевой аверзии у моллюс-

ка *Helix*. Модель «нейродегенерации», полученная на основе выключения серотонинергических нейронов, может быть полезной для дальнейшего изучения эпигенетических механизмов долговременной памяти и скрининга веществ, влияющих на ее формирование.

Работа поддержана грантами РФФИ № 14-04-01681 и № 11-04-01968.

ЛИТЕРАТУРА

- Балабан П.М., Захаров И.С. Обучение и развитие: общая основа двух явлений. М.: Наука, 1992. 152 с.
- 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.
- 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.
- Данилова А.Б., Лисачев П.Д., Гринкевич Л.Н. Сравнительные исследования MAPK/ERK-зависимого ацетилирования белков в ЦНС взрослых и ювенильных *Helix* при формировании долговременной памяти // Информ. вестн. ВОГиС. 2010. Т. 14. № 2. С. 312–319.
- Шишкина Т.Г., Дыгало 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., Vronskaya S., Ishii S., Kandel E.R., Barco A. 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.
- Bahari-Javan S., Maddalena A., Kerimoglu C., Wittnam J., Held T., Bähr M., Burkhardt S., Delalle I., Kügler S., Fischer A., Sananbenesi F. HDAC1 regulates fear extinction in mice // J. Neurosci. 2012. V. 32. No. 15. P. 5062–5073.
- 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.
- 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.
- Dos Santos Sant' Anna G., Rostrirola Elsner V., Moysés F., Reck Cechinel L., Agustini Lovatel G., Rodrigues Siqueira I. Histone deacetylase activity is altered in brain areas from aged rats // *Neurosci. Lett.* 2013. pii: S0304-3940(13)00920-8. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.016.
- Fass D.M., Reis S.A., Ghosh B., Hennig K.M., Joseph N.F., Zhao W.N., Nieland T.J., Guan J.S., Kuhnle C.E., Tang W., Barker D.D., Mazitschek R., Schreiber S.L., Tsai L.H., Haggarty S.J. Crebinostat: a novel cognitive enhancer that inhibits histone deacetylase activity and modulates chromatin-mediated neuroplasticity // *Neuropharmacology*. 2013. V. 64. P. 81–96.
- Fischer A., Sananbenesi F., Wang X., Dobbin M., Tsai L.H. 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., Maher D., Singh V., Dudeja P.K., Alrefai W., Saksena S. 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., 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., Kim J.H., Miniaci M.C., Schwartz J.H., Thanos D., Kandel E.R. 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., Dannenberg J.H., Joseph N., Gao J., Nieland T.J., Zhou Y., Wang X., Mazitschek R., Bradner J.E., DePinho R.A., Jaenisch R., Tsai L.H. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity // *Nature*. 2009. V. 459. No. 7243. P. 55–60.
- Jin Q., Yu L.R., Wang L., Zhang Z., Kasper L.H., Lee J.E., Wang C., Brindle P.K., Dent S.Y., Ge K. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation // *EMBO J.* 2011. V. 30. No. 2. P. 249–62.
- 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.
- 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., Moreno J.L., Holloway T., Kozlenkov A., Mocchi G., García-Bea A., Hanks J.B., Neve R., Nestler E.J., Russo S.J., González-Maeso J. 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.
- Kurita M., Holloway T., García-Bea A., Kozlenkov A., Friedman A.K., Moreno J.L., Heshmati M., Golden S.A., Kennedy P.J., Takahashi N., Dietz D.M., Mocchi G., Gabilondo A.M., Hanks J., Umali A., Callado L.F., Gallitano A.L., Neve R.L., Shen L., Buxbaum J.D., Han M.H., Nestler E.J., Meana J.J., Russo S.J., González-Maeso J. HDAC2 regulates atypical antipsychotic responses through the modulation of mGlu2 promoter activity // *Nat. Neurosci.* 2012. V. 15. No. 9. P. 1245–1254.
- 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.
- Mungenast A.E., Tsai L.H. Cognitive function in health and disease: the role of epigenetic mechanisms // *Neurodegener. Dis.* 2012. V. 10. No. 1/4. P. 191–194.
- Peleg S., Sananbenesi F., Zovoilis A. *et al.* Altered histone acetylation is associated with age dependent memory impairment in mice // *Science*. 2010. V. 328. No. 5979. P. 753–756.
- de Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family // *Biochem. J.* 2003. V. 370. Pt 3. P. 737–749.
- Sando R., Gounko N., Pieraut S., Liao L., Yates J., 3rd, Maximov A. HDAC4 governs a transcriptional program essential for synaptic plasticity and memory // *Cell*. 2012. V. 151. No. 4. P. 821–834.
- Spange S., Wagner T., Heinzl T., Kramer O.H. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009. V. 41. P. 185–198.
- Stafford J.M., Raybuck J.D., Ryabinin A.E., Lattal K.M. Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction // *Biol. Psychiatry*. 2012. V. 72. No. 1. P. 25–33.
- Sweatt J.D. Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system // *Biol. Psychiatry*. 2009. V. 65. P. 191–197.
- Takase K., Oda S., Kuroda M., Funato H. Monoaminergic and neuropeptidergic neurons have distinct expression profiles of histone deacetylases // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. 3. P. 1–19.
- Tian F., Marini A.M., Lipsky R.H. Effects of histone deacetylase inhibitor Trichostatin A on epigenetic changes and transcriptional activation of Bdnf promoter 1 by rat hippocampal neurons // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010. No. 1199. P. 186–193.
- Ververis K., Hiong A., Karagiannis T.C., Licciardi P.V. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents // *Biologics*. 2013. V. 7. P. 47–60.
- 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., Segawa M., Matsumoto T., Yamawaki S. 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.

INDUCTION OF ACETYLATION PROCESSES IN ANIMALS WITH SEROTONERGIC NEURON DYSFUNCTION REVERSES THEIR CAPABILITY OF LONG-TERM MEMORY FORMATION

O.V. Vorobiova, L.N. Grinkevich

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

Summary

The major tasks of neurobiology include the understanding of mechanisms governing long-term memory formation and search for means to improve memory. Animals with dysfunction of the serotonergic system are a convenient model for investigation of memory processes. The ablation of serotonergic neurons by the neurotoxin 5,7-DOT leads to inability of the mollusks to form an aversive food avoidance reflex. Previously we have found that epigenetic processes, such as histone methylation and acetylation, are involved in the formation of food aversion, and that disturbance of these processes leads to inability to form long-term memory. The goal of the current study was to investigate the possibility to reverse long-term memory in DOT-treated animals through the induction of acetylation processes. We found that treatment with histone deacetylase inhibitors NaB and Trichostatin A significantly increased the ability of DOT-treated animals to form the food aversion reflex. The results point to an important role of serotonin in the induction of the epigenetic processes mediating the formation of this type of long-term memory. By induction of acetylation processes, we managed to improve memory parameters significantly. Our “Neurodegeneration” model, based on ablation of serotonergic neurons, can be useful in studies of the epigenetic mechanisms underlying long-term memory destruction and screening of compounds crucial for memory formation.

Key words: epigenetics, histone acetylation, serotonin, memory, *Helix* mollusk, neurotoxin 5,7-DOT, histone deacetylase inhibitors NaB and TCA.