

Серотонин и нейропептид FMRFамид играют противоположную роль в регуляции эпигенетических процессов, вовлеченных в формирование долговременной памяти

А.Н. Гринкевич✉, О.В. Воробьева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Эпигенетические модификации гистонов интенсивно изучаются в связи с механизмами долговременной памяти. Ранее мы показали, что метилирование гистона H3 по активаторным (H3K4me3) и ингибиторным (H3K9me2) сайтам играет важную роль в выработке оборонительного рефлекса пищевой аверзии у наземного моллюска *Helix lucorum*. Было предположено, что данные эпигенетические модификации находятся под контролем как активаторных, так и тормозных путей, вовлеченных в формирование долговременной памяти. Ключевым активаторным медиатором ЦНС моллюсков в формировании оборонительных рефлексов является медиатор серотонин, а тормозным – нейропептид FMRFамид. Инкубация ЦНС с этими веществами моделирует сенситизацию и привыкание соответственно. Оба этих процесса вовлечены в формирование долговременной памяти. С учетом противоположной роли серотонина и FMRFамида в пластичности оборонительных рефлексов нами были проведены сравнительные исследования по влиянию данных нейротрансмиттеров на метилирование гистона H3 в функционально различных ганглиях ЦНС *Helix*. Показано, что серотонин и FMRFамид оказывают реципрокный эффект на метилирование гистона H3 в подглобальном комплексе ганглиев ЦНС *Helix*, специализирующемся на оборонительном поведении. Так, инкубация ЦНС *Helix* с серотином индуцирует метилирование гистона H3 по активаторным (H3K4me3) и ингибиторным (H3K9me2) сайтам, тогда как инкубация с FMRFамидом снижает метилирование по обоим сайтам. Иную картину метилирования гистона H3 мы наблюдали в церебральных ганглиях, участвующих в обработке сигналов пищевых стимулов. Инкубация ЦНС с серотином не влияла на метилирование гистона H3 по активаторному сайту и снижала метилирование по ингибиторному, а FMRFамид на метилирование гистона H3 влияния не оказывал. Полученные данные свидетельствуют о том, что активаторные и ингибиторные пути, опосредуемые серотином и FMRFамидом, способны взаимодействовать на эпигенетическом уровне через влияние на метилирование гистона H3. Эти эпигенетические изменения могут лежать в основе конвергенции активаторных и тормозных путей, участвующих в формировании долговременной памяти, и влиять на экспрессию генов, необходимых для пластических перестроек.

Ключевые слова: эпигенетика; метилирование гистона H3; серотонин; нейропептид FMRFамид; долговременная память; торможение; моллюск *Helix*.

Opposite roles of serotonin and neuropeptide FMRFamide in the regulation of epigenetic processes involved in the long-term memory formation

L.N. Grinkevich✉, O.V. Vorobiova

Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia

Epigenetic modifications are studied intensively to understand mechanisms of long-term memory. We have shown that histone H3 methylation is important for the defensive reflexes formation in the mollusk *Helix lucorum*. We suggested that these epigenetic modifications are controlled by facilitatory and inhibitory pathways involved in the long-term memory formation. Serotonin and neuropeptide FMRFamide play opposite roles in the formation of defensive reflexes. Serotonin strengthens synaptic connections between neurons of the network, and FMRFamide is an inhibitory transmitter leading to long-term depression. To study the epigenetic regulation of the processes involved in the long-term memory formation, we performed comparative studies on the serotonin and FMRFamide effects on histone H3 methylation in the CNS of the *Helix*. We found that the incubation of the CNS with serotonin induces methylation of histone H3 at both activating (H3K4me3) and inhibitory (H3K9me2) sites, while incubation with FMRFamide has an opposite effect reducing methylation of histone H3 in the subesophageal complex of ganglia, important for defensive behaviour. We observed a different methylation pattern of histone H3 in the cerebral ganglia involved in signal processing of food stimuli, where serotonin did not affect the methylation of histone H3 at the activator site and reduced methylation at the inhibitory site, while FMRFamide had no effect on methylation. The data indicate that the facilitatory and inhibitory processes mediated by serotonin and FMRFamide can interact at the epigenetic level, through histone H3 methylation by activating or inhibiting it, respectively. This may underlie the convergence of the activator and inhibitory pathways involved in the long-term

memory formation and underlie following regulation of the expression of genes involved in long-term plasticity.

Key words: epigenetics; histone H3 methylation; serotonin; FMRFamid; memory formation; inhibition; mollusk *Helix*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Гринкевич Л.Н., Воробьева О.В. Серотонин и нейропептид FMRFамид играют противоположную роль в регуляции эпигенетических процессов, вовлеченных в формирование долговременной памяти. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):262-268. DOI 10.18699/VJ16.128

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Grinkevich L.N., Vorobiova O.V. Opposite roles of serotonin and neuropeptide FMRFamide in the regulation of epigenetic processes involved in the long-term memory formation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):262-268. DOI 10.18699/VJ16.128

Одной из сложнейших задач фундаментальной нейробиологии является выяснение роли эпигенетических (надгенетических) механизмов формирования долговременной памяти (ДП). Важнейшую роль в эпигенетической регуляции играет модификация гистонов, приводящая к изменению пространственной структуры хроматина. В результате меняется доступ к ДНК регуляторных белков и, соответственно, индуцируется экспрессия генов или их репрессия (Berger, 2007). При этом ацетилирование гистонов, как правило, приводит к индукции экспрессии генов, а метилирование – как к индукции, так и репрессии, в зависимости от того, какие сайты, по какой аминокислоте и насколько интенсивно метилируются (Berger, 2007; Xu, Andreassi, 2011).

Показано, что эпигенетические модификации гистонов вовлекаются и в формирование долговременной памяти (Levenson, Sweatt, 2006; Wood et al., 2006; Danilova et al., 2010; Gupta et al., 2010; Гринкевич, 2012а, б; Danilova, Grinkevich, 2012; Kandel, 2012). В настоящее время наиболее интенсивно изучается ацетилирование и метилирование гистонов, так как показана принципиальная возможность через воздействие на эти процессы влиять на ментальные характеристики, нарушенные в ряде патологий (Abel, Zukin, 2008; Kurita et al., 2012).

Одним из популярных объектов для изучения молекулярных механизмов памяти являются животные с относительно простой нервной системой, в частности моллюски. Применение модели сенситизации (усиления) синаптической передачи между сенсорными и моторными нейронами моллюска *Aplysia* в культуре позволило Э. Канделу с коллегами открыть и описать ряд базовых механизмов пластичности (Kandel, 2012). На моллюсках также впервые была показана важная роль ацетилирования гистонов в формировании ДП (Guan et al., 2002), что стимулировало в дальнейшем целую серию работ на позвоночных животных (Levenson, Sweatt, 2006). Метилирование гистонов является более сложным процессом, контролируется гистоновыми метилтрансферазами и деметилазами, обладающими высокой специфичностью к определенным сайтам гистонов (Xu, Andreassi, 2011). Изучение метилирования гистонов в связи с участием в пластических перестройках в ЦНС начато значительно позже, чем изучение ацетилирования (Gupta et al., 2010; Grinkevich, 2012б; Jarome, Lubin, 2013).

В качестве модели долговременной памяти мы используем выработку условного рефлекса пищевой аверзии

у моллюска *Helix*. Было показано, что в формирование данного вида ДП вовлекается как ацетилирование, так и метилирование гистона H3, причем метилирование индуцируется как по активаторному, так и ингибиторному сайтам (Гринкевич, 2012б; Danilova, Grinkevich, 2012; Гринкевич, Воробьева, 2014; Grinkevich, Vorobiova, 2014). Было предположено, что данные эпигенетические модификации находятся под контролем как активаторных, так и тормозных путей, вовлеченных в формирование ДП. С нарушением процессов торможения, вызванных недостатком метилирования гистона H3 в промоторах генов ГАМКергической системы, связывают ментальные нарушения, часто присутствующие у больных шизофренией (Akbarian, Huang, 2009). Как известно, γ -аминомасляная кислота (ГАМК) является основным тормозным медиатором нервной системы. С другой стороны, гиперактивация ГАМКергической системы и дефицит когнитивных способностей наблюдаются у пациентов с дефицитом H3K4-деметилазы JARID1C, которая вовлечена в формирование ДП. Ее ингибирование у животных вызывает повышение экспрессии генов, связанных с выбросом ГАМК, и приводит к нарушению долговременной памяти. В норме обучение подавляет экспрессию этих генов (Xu, Andreassi, 2011).

Ключевым активаторным медиатором ЦНС моллюсков в формировании оборонительных рефлексов является модуляторный медиатор серотонин, который опосредует действие ноцицептивных стимулов (Балабан, Захаров, 1992; Grinkevich et al., 2008; Гринкевич, 2012а; Kandel, 2012). Инкубация ЦНС с серотином моделирует процесс сенситизации, являющейся необходимым компонентом формирования условных оборонительных рефлексов. Дисфункция серотонинергической системы приводит к нарушениям в эпигенетической регуляции и невозможности формирования долговременных форм оборонительных рефлексов (Grinkevich et al., 2008; Danilova, Grinkevich, 2012; Гринкевич, Воробьева, 2014; Grinkevich, Vorobiova, 2014). Противоположную роль в пластичности оборонительных рефлексов играет нейропептид FMRFамид (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂), который тормозит синаптические реакции у моллюсков *Aplysia* (Belardetti et al., 1987) и *Helix* (Balaban, Chase, 1991). Инкубация ЦНС моллюсков с FMRFамидом моделирует процесс привыкания (депрессии синаптической передачи) (Montarolo et al., 1988).

К настоящему времени описано множество эндогенных FMRFамид-подобных пептидов с общим названием FaRPs

(FMRFamide-related peptides), или RFамиды, которые представлены в ЦНС широкого круга животных, в том числе и позвоночных, идентифицированы их специфические рецепторы и кодирующие эти нейропептиды гены (Raffa, 1988; Zatylny-Gaudin, Favrel, 2014). Спектр действия FMRFамидов широк. Они играют важную роль в развитии нервной системы, вовлечены в регуляцию пищевого поведения и боли (Raffa, 1988; Röszer, Bánfalvi, 2012). Введение FMRFамида позвоночным животным способно вызывать амнезийный эффект (Telegdy, Bollók, 1987). Показано также, что химерные конструкции, включающие опиоиды и FMRFамид-подобные пептиды, способны подавлять боль без развития эффектов привыкания и могут останавливать апоптоз нервных клеток, вызываемый длительным применением опиоидов, что предполагает возможность их применения для обезболивания (Röszer, Bánfalvi, 2012). Однако молекулярные механизмы действия FMRFамидов остаются в значительной мере невыясненными.

Таким образом, представлялось важным провести сравнительные исследования по влиянию серотонина и нейропептида FMRFамида (играющих различную роль в механизмах пластичности) на процессы метилирования гистона H3 в ЦНС *Helix* по активаторному (триметилирование по лизину 4 (H3K4me3)) и ингибиторному (диметилирование по лизину 9 (H3K9me2)) сайтам. Эти модификации гистона H3 приводят к индукции экспрессии или репрессии генов соответственно (Xu, Andreassi, 2011). Для проведения исследования имелись следующие предпосылки: 1) в ЦНС виноградной улитки идентифицировано порядка 1100 FMRFамид-содержащих нейронов (Elekes, Ude, 1993; Kobayashi et al., 2010), среди которых командные нейроны оборонительного поведения, являющиеся основным пластическим звеном условного рефлекса пищевой аверзии, а также нейроны процеребрума, вовлеченного в обработку ольфакторных стимулов; 2) еще в начале 1990-х годов было предположено, что «при функционировании рефлекторной дуги оборонительной реакции происходит противоборство двух систем»: серотониновой, опосредующей действие опасных ноцицептивных стимулов, и FMRFамидной, которая приводит к торможению поведенческой реакции при неопасных для животного стимулах (Балабан, Захаров, 1992), однако молекулярных исследований на эту тему не проводили.

Материалы и методы

Эксперименты по определению влияния серотонина и FMRFамида на эпигенетические процессы в ЦНС виноградных улиток *Helix lucorum* выполняли на взрослых особях. ЦНС *Helix* выделяли, удаляли оболочку и предварительно в течение 30 мин инкубировали в физиологическом растворе для беспозвоночных (80 mM NaCl; 4 mM KCl; 7 mM CaCl₂; 5 mM MgCl₂; 5 mM TRIS-HCl; pH = 7,8), затем в течение 1,5 ч в физиологическом растворе для беспозвоночных, содержащем серотонин (0,2 мМ) или FMRFамид (10 мкМ). После этого биологически активные вещества отмывали физиологическим раствором, спустя один час разделяли церебральные и подглоточные комплексы ганглиев, проводили гомогенизацию

и подготовку образцов согласно М. Монси с коллегами (Monsey et al., 2011). Исследования модификации гистонов осуществляли методом Вестерн-блот анализа. Экстракты, содержащие искомые белки, разделяли электрофорезом в 14 %-м полиакриламидном геле (система Лэмбли). Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозные фильтры, которые после проведения процедур, уменьшающих неспецифическую сорбцию (инкубация с 3 %-м молоком), последовательно инкубировали в растворах, содержащих первичные и вторичные (конъюгированные с пероксидазой хрена) антитела. 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.

Для оценки степени метилирования применяли антитела к гистону H3, триметилированному по лизину 4 (H3K4me3), и антитела к гистону H3, диметилированному по лизину 9 (H3K9me2). Для оценки содержания гистонов применяли антитела к тотальным формам гистона H3. Все использованные антитела произведены фирмой Upstate Biotechnology (США). Для каждого электрофореза рассчитывали отношения связывания антител к модифицированным формам гистона к тотальным формам. Контроли усредняли, после чего в каждом электрофорезе рассчитывали отношение к среднему контролю. Статистическую обработку проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Результаты

Анализ влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 проводили в подглоточном и церебральном комплексах ганглиев ЦНС *Helix*. Подглоточный 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. В церебральных ганглиях обрабатывается информация, приходящая со стороны пищевых стимулов. Нейроны обоих комплексов ганглиев вовлечены в формирование условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии (Балабан, Захаров, 1992). Анализ статуса метилирования гистона H3 проводили по активаторным и ингибиторным сайтам спустя 1 ч после 1,5-часовой инкубации ЦНС с серотонином или FMRFамидом. Данное время инкубации вызывает долговременные изменения эффективности синаптической передачи в нейрональной сети оборонительных рефлексов. Инкубация ЦНС с серотонином в течение данного времени моделирует процесс долговременной сенситизации, а с FMRFамидом – процесс долговременной синаптической депрессии. В качестве контроля использовали ЦНС, которую инкубировали в физиологическом растворе для беспозвоночных, не содержащем серотонин или FMRFамид.

Анализ влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 по активаторному сайту (H3K4me3) в подглоточном комплексе ганглиев ЦНС *Helix*

Для оценки метилирования гистона H3 по активаторному сайту применяли антитела к гистону H3, триметилированному по лизину 4 (H3K4me3). Эти модификации гистона H3 приводят к индукции экспрессии генов. Для оценки содержания гистона H3 использовали антитела к тотальным формам этого гистона. Исследования показали, что спустя 1 ч после инкубации ЦНС с серотонином происходит индукция метилирования гистона H3 по лизину 4 (H3K4me3). Уровень метилирования составляет $1,31 \pm 0,11$ относительно контроля. Достоверно при $p < 0,02$ (рис. 1, а).

Противоположная картина наблюдается при инкубации ЦНС с нейропептидом FMRFамидом. Степень метилирования гистона H3 по лизину 4 под влиянием FMRFамида снижается. Уровень метилирования составляет $0,83 \pm 0,02$. Достоверно при $p < 0,01$ (рис. 1, б).

Анализ влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 по ингибиторному сайту (H3K9me2) в подглоточном комплексе ганглиев ЦНС *Helix*

Для анализа влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 по ингибиторному сайту исследовали статус метилирования гистона H3 спустя 1 ч после 1,5-часовой инкубации ЦНС с серотонином или FMRFамидом. Для оценки метилирования гистона H3 по ингибиторному сайту применяли антитела к гистону H3, диметилированному по лизину 9 (H3K9me2). Эти модификации гистона H3 приводят к репрессии генов. Показано, что спустя 1 ч после инкубации ЦНС с серотонином наблюдается индукция метилирования гистона H3 по ингибиторному сайту (H3K9me2). Уровень метилирования составляет $1,38 \pm 0,07$ по отношению к контролю. Достоверно при $p < 0,001$ (рис. 2, а).

Исследование влияния FMRFамида на метилирование гистона H3 продемонстрировало противоположную картину. Степень метилирования гистона H3 под влиянием инкубации ЦНС с FMRFамидом снижалась по изучаемому ингибиторному сайту (рис. 2, б) и составляла $0,84 \pm 0,06$ ($p < 0,001$).

Таким образом, инкубация ЦНС *Helix* с серотонином в течение 1,5 ч приводит к индукции метилирования гистона H3 в подглоточном комплексе ганглиев, причем как по активаторному, так и ингибиторному сайтам. Инкубация ЦНС *Helix* с FMRFамидом вызывает снижение метилирования гистона H3 в подглоточном комплексе ганглиев по обоим сайтам.

Анализ влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 в церебральном комплексе ганглиев ЦНС *Helix*

Для анализа влияния серотонина и нейропептида FMRFамида на метилирование гистона H3 в церебральном комплексе ганглиев исследовали статус метилирования гистона H3 по активаторному и ингибиторному сайтам спустя 1 ч после 1,5-часовой инкубации ЦНС с серотонином или FMRFамидом. Для каждой точки $N = 6$.

Исследования показали, что инкубация ЦНС с серотонином не оказывает влияния на степень метилирования гистона H3 в церебральных ганглиях по активаторному сайту (H3K4me3): $0,90 \pm 0,08$; $p = 0,24$, тогда как по ингибиторному сайту (H3K9me2) наблюдается снижение метилирования ($0,65 \pm 0,12$) по отношению к контролю ($p < 0,03$). Под влиянием FMRFамида степень метилирования гистона H3 в церебральных ганглиях не изменялась ни по активаторному, ни по ингибиторным сайтам и составляла по активаторному сайту (H3K4me3) $0,94 \pm 0,09$ относительно контроля ($p = 0,54$), а по ингибиторному (H3K9me2) $1,06 \pm 0,14$ ($p = 0,67$).

Таким образом, в церебральных ганглиях инкубация ЦНС с серотонином не оказывала влияния на степень метилирования гистона H3 по активаторному сайту, однако индуцировала снижение метилирования по ингибиторному.

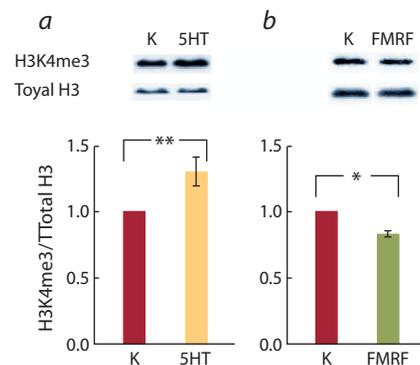


Fig. 1. Serotonin and FMRFamide exert opposite effects on histone H3 methylation at the activator (H3K4me3) site of the subesophageal ganglion complex in *Helix*.

Top: representative Western blotting image with antibodies against methylated histone H3 (H3K4me3) and total histone H3 (Total H3). K, control; 5HT, CNS incubation with serotonin; FMRF, CNS incubation with FMRFamide; H3K4me3, H3 trimethylated at lysine 4. Y-axis; the proportion of the methylated H3 form with respect to the total amount of histone and to the control. For each point, $N = 6$. Significant differences: * $p < 0,01$; ** $p < 0,02$ (t-test).

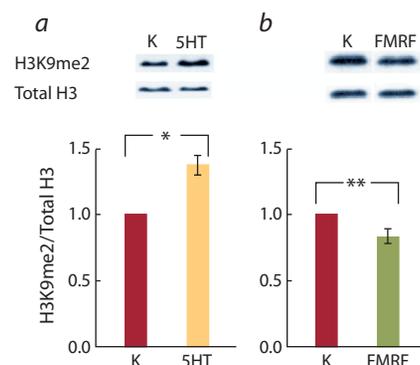


Fig. 2. Serotonin and FMRFamide exert opposite effects on histone H3 methylation at the inhibitory (H3K9me2) site of the subesophageal ganglion complex in *Helix*.

Top: representative Western blotting image with antibodies against methylated histone H3 (H3K9me2) and total histone H3 (Total H3). K, control; 5HT, CNS incubation with serotonin; FMRF, CNS incubation with FMRFamide. Y-axis; the proportion of the methylated H3 form with respect to the total amount of histone and to the control. H3K9me2, H3 dimethylated at lysine 9. For each point, $N = 6$. Significant differences: * $p < 0,001$; ** $p < 0,02$ (t-test).

Инкубация ЦНС с FMRФамидом не влияла на степень метилирования гистона H3 ни по одному из исследованных сайтов.

Обсуждение

С целью изучения влияния активаторных и ингибиторных путей на эпигенетические процессы в ЦНС мы провели сравнительный анализ влияния серотонина и тормозного нейропептида FMRФамида на метилирование гистона H3 в функционально отличных ганглиях ЦНС *Helix*. Показано, что серотонин и FMRФамид оказывают противоположный эффект на метилирование гистона H3 в подглоточном комплексе ганглиев ЦНС, специализирующемся на оборонительном поведении. Так, инкубация ЦНС *Helix* с серотонином в течение 1,5 ч приводит к значительной индукции метилирования гистона H3 спустя час после инкубации, причем как по активаторному (H3K4me3), так и ингибиторному (H3K9me2) сайтам, тогда как инкубация ЦНС *Helix* с FMRФамидом в течение 1,5 ч снижает метилирование по обоим сайтам. Как отмечалось выше, эти биологически активные вещества играют противоположную роль в формировании оборонительных рефлексов моллюсков. Серотонин индуцирует усиление синаптической связи между нейронами данной сети, а нейропептид FMRФамид является тормозным медиатором, вовлеченным в формирование привыкания. Инкубация с этими веществами в течении 1,5 ч моделирует долговременную сенситизацию и привыкание соответственно. Сенситизация и привыкание относятся к неассоциативным формам обучения и вовлекаются в формирование условных оборонительных рефлексов (Kandel, 2012).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что серотонин и FMRФамид могут оказывать свое действие на работу генома в подглоточных ганглиях ЦНС через одни и те же мишени, а именно через изменение уровня метилирования гистона H3. Однако эффект их действия разнонаправленный. При этом активационные процессы, опосредуемые серотонином, активируют метилирование и по активаторным, и по ингибиторным сайтам, а тормозные, опосредуемые FMRФамидом, ингибируют метилирование по обоим сайтам. Синхронную активацию метилирования гистона H3 по активаторным и ингибиторным сайтам, как и в случае инкубации ЦНС с серотонином, мы наблюдали ранее при выработке рефлекса пищевой аверзии в условиях *in vivo* (Гринкевич, 2012б). Сходные данные по синхронному метилированию активаторных и ингибиторных сайтов в аналогичные временные интервалы были получены и при выработке условных рефлексов у высших позвоночных (Gupta et al., 2010; Morse et al., 2015). Как отмечалось выше, метилирование гистонов способно влиять как на индукцию экспрессии генов, так и их репрессию, в зависимости от того, какие сайты метилируются, активаторные или ингибиторные. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в формировании как условных оборонительных рефлексов, так и долговременных форм сенситизации вовлекаются не только активация экспрессии генов, но и ингибирование. Оценочные эксперименты на позвоночных животных показывают, что количество генов, экспрессия которых активируется или снижается

при формировании ДП, практически совпадает (этих генов около 1500) (Gupta-Agarwal et al., 2012).

Что же касается долговременной депрессии, индуцируемой FMRФамидом, то деметилирование активаторных сайтов может приводить к ингибированию экспрессии генов (в том числе, возможно, включенных в формирование сенситизации), а деметилирование ингибиторных, наоборот, активировать гены, необходимые для формирования долговременной депрессии.

Несколько иную картину метилирования гистона H3 мы наблюдали в церебральных ганглиях, вовлеченных в обработку сигналов ольфакторных и пищевых стимулов, используемых при формировании оборонительного рефлекса пищевой аверзии в качестве условных. Инкубация ЦНС с серотонином не влияла на метилирование гистона H3 по активаторному сайту и снижала его по ингибиторному, т. е. в церебральных ганглиях серотонин в целом, вероятно, активирует экспрессию генов через выключение ингибиторных сайтов. FMRФамид в исследованный временной интервал не оказывает влияние на метилирование гистона H3 в церебральных ганглиях ни по одному из исследованных сайтов. Таким образом, серотонин и FMRФамид избирательно влияют на эпигенетические процессы в функционально различных ганглиях.

Следует отметить, что в отличие от серотонина (Балабан, Захаров, 1992; Grinkevich et al., 2008; Kandel, 2012; Grinkevich, Воробьева, 2014; Grinkevich, Vorobiova, 2014) функции FMRФамидов и механизмы их воздействия на внутриклеточные процессы остаются еще плохо изученными. Наиболее полно описано действие FMRФамида на формирование долговременной депрессии синаптической связи между нейронами моллюска *Aplysia* в культуре (Guan et al., 2002). Показано, что FMRФамид индуцирует формирование долговременной депрессии через влияние на фосфорилирование K⁺ каналов S-типа (Belardetti et al., 1987) и более того, способен подавлять серотонин-зависимую долговременную сенситизацию (фасилитацию), связанную с усилением ацетилирования гистона H4 через его деацетилирование и вовлечение ингибиторного транскрипционного фактора CREB2 (Guan et al., 2002). Таким образом, из данных работ следует, что сенситизация, лежащая в основе формирования условных оборонительных рефлексов, может быть подавлена эндогенным ингибиторным нейропептидом FMRФамидом, т. е. в ряде случаев процессы торможения могут доминировать над активационными. Наши впервые полученные данные по метилированию гистона H3 в условиях инкубации ЦНС *Helix* с FMRФамидом свидетельствуют о том, что FMRФамид способен влиять на эпигенетические процессы через ингибирование не только ацетилирования гистона H4, но и метилирования гистона H3, причем в нашем случае также наблюдаются реципрокные отношения с серотонином. Способность FMRФамида оказывать противоположный серотонину эффект на метилирование гистона H3 может отражать роль FMRФамида в целомном поведении животного, а именно в торможении стимулов, утративших значимость в том числе и при формировании условных рефлексов. Вовлечение FMRФамид-подобных пептидов в формирование привыкания было показано для нематоды (Li et al., 2013), однако эпигенетические исследе-

дования в данной работе не проводили. Полученные нами данные о вовлечении FMRFамида в регуляцию метилирования гистонов расширяют базовые знания о механизмах воздействия пептидов на функционирование ЦНС.

Отметим, что механизмы индукции процессов метилирования гистонов при формировании ДП остаются еще практически неисследованными. Первая работа по вовлечению метилирования в формирование ДП была опубликована в 2010 г. Было показано, что метилирование гистона H3 по активаторным и ингибиторным сайтам вовлечено в формирование условных оборонительных рефлексов у крыс (Gupta et al., 2010), а у мышей, лишенных H3K4-специфической гистоновой метилтрансферазы *Mll*, данный вид ДП не формируется (Akbarian, Huang, 2009). Нарушение метилирования гистонов наблюдается и при возрастных ухудшениях ДП. И что важно, память в данном случае может быть значительно улучшена через нормализацию метилирования путем предварительного содержания животных в условиях обогащенной различными предметами среды (Morse et al., 2015). К настоящему времени идентифицировано несколько десятков специфических гистоновых лизин метилтрансфераз и деметилаз, которые контролируют метилирование и деметилирование определенных специфических сайтов гистонов. Часть из них вовлекается в формирование ДП (Gupta et al., 2010; Xu, Andreassi, 2011; Gupta-Agarwal et al., 2014). Механизмы привлечения данных ферментов к определенным регуляторным районам генов остаются практически неисследованными в связи как с многообразием регуляторных систем, вовлеченных в формирование ДП, так и наличием большого числа форм ферментов с различными уровнями экспрессии в разных клетках и специфичностью их сродства к различным сайтам гистонов. Опубликована первая работа, показывающая участие сигнального каскада MAPK/ERK (The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) в индукции метилирования гистона H3 по ингибиторному сайту H3K9me2 при формировании ДП, вызываемой страхом. При этом происходит двунаправленная регуляция формирования комплекса H3K9me2-специфической метилтрансферазы (G9a) и деметилазы (LSD1) на промоторах генов, а ингибирование этих ферментов приводит к угнетению или улучшению формирования ДП соответственно (Gupta-Agarwal et al., 2014). Следует отметить, что MAPK/ERK каскад играет чрезвычайно важную роль в формировании долговременной памяти как у позвоночных животных, так и беспозвоночных (Levenson, Sweatt, 2006; Wood et al., 2006; Grinkevich et al., 2008).

Индукция метилирования гистона H3 как при обучении *Helix*, так и при инкубации ЦНС с серотонином может осуществляться через MAPK/ERK. Ранее мы показали, что MAPK/ERK активируется при обучении *Helix*, и эта активация серотонин-зависима (Grinkevich et al., 2008). Блокада MAPK/ERK каскада приводит к неспособности формирования ДП и сопровождается снижением ацетилирования гистона H3, индуцируемого обучением (Danilova et al., 2010; Grinkevich, 2012a; Danilova, Grinkevich, 2012). Известно, что MAPK/ERK каскад играет важную роль в индукции ацетилирования через активацию ацетилтрансфераз фосфорилированием (Гринкевич,

2012a). С другой стороны, в литературе имеются данные о влиянии ацетилирования на метилирование гистонов (Akbarian, Huang, 2009; Gupta et al., 2010). Таким образом, гипотетически серотонин может индуцировать метилирование по активаторному сайту через ERK-зависимое ацетилирование гистона H3, а по ингибиторному сайту – через ERK-зависимое ингибирование деметилаз аналогично описанному в работе Gupta-Agarwal et al., 2014. В литературе имеются данные о вовлечении фосфорилирования в функционирование гистоновых деметилаз (Toffolo et al., 2014). Способность серотонина индуцировать метилирование гистона H3 по ингибиторному сайту лизина 9 показана для гиппокампа (Hunter et al., 2009). Что же касается FMRFамида, то его действие на геном, по крайней мере у моллюсков, может опосредоваться через протеинкиназный каскад p38, который потенциально способен ингибировать метилирование по активаторным (и возможно, ингибиторным) сайтам через привлечение к регуляторным комплексам генов деметилаз (Guan et al., 2002). На позвоночных животных показано, что деметилаза LSD1 вовлекается в деметилирование как активаторного H3K4, так и ингибиторного H3K9 сайтов гистона H3 (Xu, Andreassi, 2011), метилирование которых изучалось и нами в настоящем и предыдущих исследованиях (Гринкевич, 2012b; Grinkevich, Воробьева, 2014; Grinkevich, Vorobiova, 2014). FMRFамид теоретически способен ингибировать метилирование гистона H3 и через ингибирование регуляторного каскада MAPK/ERK посредством активации протеинкиназы p38. Показано, что p38-зависимое ингибирование MAPK/ERK вовлечено в формирование FMRFамид-зависимой депрессии у моллюска *Aplysia* (Fioravante et al., 2006). Кроме того, FMRFамид способен влиять на внутриклеточные процессы через регуляцию синтеза оксида азота (NO) (Röszer et al., 2004), который широко вовлекается в формирование ДП (Korneev et al., 2005).

Полученные данные свидетельствуют о том, что активаторные и ингибиторные процессы, опосредуемые серотонином и FMRFамидом, могут взаимодействовать на эпигенетическом уровне, активируя или ингибируя метилирование гистона H3 соответственно. Таким образом, эпигенетические модификации гистонов могут лежать в основе конвергенции активаторных и тормозных путей, участвующих в формировании долговременной памяти, и, соответственно, регулировать экспрессию генов, вовлекаемых в пластические перестройки.

Изучению метилирования гистонов в функционировании ЦНС в настоящее время придается исключительно важное значение как в связи с участием метилирования в ментальных процессах, так и с потенциальной возможностью восстановления когнитивных функций, связанных с нарушением метилирования. Наибольшее число работ в этой области посвящено исследованию механизмов нарушения ДП и их восстановлению при депрессиях, аутизме и нейродегенеративных патологиях (Akbarian, Huang, 2009; Xu, Andreassi, 2011; Jarome, Lubin, 2013).

Дальнейшие исследования взаимодействия серотонин-индуцируемых и FMRFамидных сигнальных путей на уровне эпигенетической модификации гистонов могут пролить свет на механизмы конвергенции регуляторных систем, вовлеченных в формирование долговременной памяти.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 14-04-01681.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abel T., Zukin R.S. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2008; 8(1):57-64.
- Akbarian S., Huang H.S. Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation. *Biol. Psychiatry.* 2009;65(3):198-203.
- Balaban P.M., Chase R. Interrelationships of the emotionally positive and negative regions of the brain of the edible snail. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1991;21(2):172-180.
- Balaban P.M., Zakharov I.S. Obucheniye i razvitiye: obshchaya osnova dvukh yavleniy [Learning and Development: the Common Ground of Two Phenomena]. Moscow, Nauka, 1992.
- Belardetti F., Kandel E.R., Siegelbaum S.A. Neuronal inhibition by the peptide FMRFamide involves opening of S K⁺ channels. *Nature.* 1987;325(7000):153-156.
- Berger S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature.* 2007;447:407-412.
- 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;7(7): e41828:1-8.
- 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;4(180):1-7.
- Elekes K., Ude J. An immunogold electron microscopic analysis of FMRFamide-like immunoreactive neurons in the CNS of *Helix pomatia*: ultrastructure and synaptic connections. *J. Neurocytol.* 1993; 22(1):1-13.
- Fioravante D., Smolen P.D., Byrne J.H. The 5-HT- and FMRFa-activated signaling pathways interact at the level of the Erk MAPK cascade: potential inhibitory constraints on memory formation. *Neurosci Lett.* 2006;396(3):235-240.
- Grinkevich L.N. Epigenetics and long-term memory formation. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova=Russian Journal of Physiology.* 2012a;98(5):553-574
- Grinkevich L.N. Study of histone H3 methylation in long-term memory formation. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova=Russian Journal of Physiology.* 2012b;98(9):1111-1118.
- 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;1187:12-19.
- Grinkevich L.N., Vorobiova O.V. Role of modulatory mediator serotonin in induction of epigenetic processes during long-term memory formation in *Helix*. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2014;4(6):526-532.
- Grinkevich L.N., Vorobiova O.V. Role of the modulatory mediator serotonin in the induction of epigenetic processes during long-term memory formation in *Helix*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2014;18(2):298-307.
- 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;111(4):483-493.
- Gupta S., Kim S.Y., Artis S., Molfese D.L., Schumacher A., Sweatt J.D., Paylor R.E., Lubin F.D. Histone methylation regulates memory formation. *J. Neurosci.* 2010;30(10):3589-3599.
- Gupta-Agarwal S., Franklin A.V., Deramus T., Wheelock M., Davis R.L., McMahon L.L., Lubin F.D. G9a/GLP histone lysine dimethyltransferase complex activity in the hippocampus and the entorhinal cortex is required for gene activation and silencing during memory consolidation. *J. Neurosci.* 2012;32(16):5440-5453.
- Gupta-Agarwal S., Jarome T.J., Fernandez J., Lubin F.D. NMDA receptor- and ERK-dependent histone methylation changes in the lateral amygdala bidirectionally regulate fear memory formation. *Learn. Mem.* 2014;21(7):351-362.
- Hunter R.G., McCarthy K.J., Milne T.A., Pfaff D.W., McEwen B.S. Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009;106(49):20912-20917.
- Jarome T.J., Lubin F.D. Histone lysine methylation: critical regulator of memory and behavior. *Rev. Neurosci.* 2013;24(4):375-387.
- Kandel E. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and C/EBP. *Mol. Brain.* 2012;5(14):1-12.
- Kobayashi S., Hattori M., Elekes K., Ito E., Matsuo R. FMRFamide regulates oscillatory activity of the olfactory center in the slug. *Eur. J. Neurosci.* 2010;32(7):1180-1192.
- Korneev S.A., Straub V., Kemenes I., Korneeva E.I., Ott S.R., Benjamin P.R., O'Shea M. Timed and targeted differential regulation of nitric oxide synthase (NOS) and anti-NOS genes by reward conditioning leading to long-term memory formation. *J. Neurosci.* 2005; 25(5):1188-1192.
- Kurita M., Holloway T., Garcia-Bea A., Kozlenkov A., Friedman A.K., Moreno J.L., Heshmati M., Golden S.A., Kennedy P.J., Takahashi N., Dietz D.M., Mucci 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;15(9):1245-1254.
- Levenson J.M., Sweatt J.D. Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. *Cell Mol. Life Sci.* 2006;63:1009-1016.
- Li C., Timbers T.A., Rose J.K., Bozorgmehr T., Rankin C.H. The FMRFamide-related neuropeptide FLP-20 is required in the mechanosensory neurons during memory for massed training in *C. elegans*. *Learn. Mem.* 2013;20(2):103-108.
- Monsey M.S., Ota K.T., Akingbade I.F., Hong E.S., Schafe G.E. Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PLoS One.* 2011;6(5): 1-13.
- Montarolo P.G., Kandel E.R., Schacher S. Long-term heterosynaptic inhibition in *Aplysia*. *Nature.* 1988;333(6169):171-174.
- Morse S.J., Butler A.A., Davis R.L., Soller I.J., Lubin F.D. Environmental enrichment reverses histone methylation changes in the aged hippocampus and restores age-related memory deficits. *Biology (Basel).* 2015;4(2):298-313.
- Raffa R.B. The action of FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) and related peptides on mammals. *Peptides.* 1988;9(4):915-922.
- Röszer T., Bánfalvi G. FMRFamide-related peptides: anti-opiate transmitters acting in apoptosis. *Peptides.* 2012;34(1):177-185.
- Röszer T., Jenei Z., Gáll T., Nagy O., Czimmerer Z., Serfözö Z., Elekes K., Bánfalvi G. A possible stimulatory effect of FMRFamide on neural nitric oxide production in the central nervous system of *Helix lucorum*. *Brain Behav. Evol.* 2004;63(1):23-33.
- Telegdy G., Bollók I. Amnesic action of FMRFamide in rats. *Neuropeptides.* 1987;10(2):157-163.
- Toffolo E., Rusconi F., Paganini L., Tortorici M., Pilotto S., Heise C., Verpelli C., Tedeschi G., Maffioli E., Sala C., Mattevi A., Battaglioli E. Phosphorylation of neuronal Lysine-Specific Demethylase 1LSD1/KDM1A impairs transcriptional repression by regulating interaction with CoREST and histone deacetylases HDAC1/2. *J. Neurochem.* 2014;128(5):603-616.
- Wood M.A., Hawk J.D., Abel T. Combinatorial chromatin modifications and memory storage: A code for memory. *Learn. Mem.* 2006; 13:241-244.
- Xu J., Andreassi M. Reversible histone methylation regulates brain gene expression and behavior. *Horm. Behav.* 2011;59(3):383-392.
- Zatylny-Gaudin C., Favrel P. Diversity of the RFamide peptide family in mollusks. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2014;5(178):1-14.