

Санкт-Петербургский государственный университет

Биологический факультет

Кафедра генетики и биотехнологии

Трофимова Ангелина Викторовна

Метилирование гистона H3 в нейронах грибовидных тел мозга медоносной пчелы при обучении

Выпускная квалификационная работа магистра

(Магистерская диссертация)

Работа выполнена в

Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН.

Научный руководитель:

Даев Е.В.

д.б.н., профессор СПбГУ

Научный консультант:

Зачепило Т. Г.

к.б.н., с.н.с. лаб. генетики ВНД Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

Санкт-Петербург

2018

АННОТАЦИЯ

ВКР магистра (магистерской диссертации)

Трофимовой Ангилины Викторовны

Биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии

Научный руководитель – д.б.н., профессор СПбГУ, Даев Евгений Владиславович.

Научный консультант – к. б.н., с.н.с. лаб. генетики ВНД Института физиологии им. И.П.

Павлова РАН, Зачепило Татьяна Геннадьевна.

Метилирование гистона H3 в нейронах грибовидных тел мозга медоносной пчелы при обучении

В настоящее время все больший интерес исследователей привлекают молекулярные механизмы, модулирующие структуру хроматина и определяющие транскрипционный статус нервной клетки. Известно, что ковалентные модификации ДНК и гистонов влияют как на состояние хроматина, так и на транскрипцию. Некоторые модификации вовлечены в патогенез нейродегенеративных заболеваний, шизофрении и депрессии и задействованы в механизмах формирования долговременной памяти и нейрональной пластичности у млекопитающих, моллюсков и насекомых.

Данная работа направлена на изучение регуляторных механизмов метилирования гистона H3 в нейронах мозга, в связи с сохранением в памяти пищевого условного рефлекса у медоносной пчелы *Apis mellifera*. Методами выделения ДНК, ОТ-ПЦР и последующей электрофоретической детекцией изучили экспрессию генов гистоновой метилтрансферазы *Setd1* и деметилазы *Kdm1A* в мозге. Долю нейронов в калликсах грибовидных тел, содержащих монометилированный гистон H3 по лизину 4 (H3K4me1), оценивали при помощи предварительного иммуногистохимического окрашивания срезов мозга антителами к монометилированному гистону H3.

Через 1 час после процедуры обучения у пчел с выработанной условнорефлекторной реакцией выявлена экспрессия гена гистоновой метилтрансферазы SETD1, что, вероятно связано с её участием в формировании памяти. Для гистоновой деметилазы KDM1A такая связь не обнаружена. Монометилирование гистона H3 по лизину 4 вовлечено в формирование памяти.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

Angelina V. Trofimova

Faculty of Biology SPbSU, Department of Genetics and Biotechnology

Supervisor – PhD, ScD, Professor SPbSU, Daev Evgeny Vladislavovich.

Scientific adviser - PhD, senior researcher of lab. GNI of genetics of the Institute of physiology.

I. P. Pavlov of the Russian Academy of Sciences, Zachepilo Tatiana Gennadievna.

Histone H3 methylation in the mushroom bodies neurons of the honeybee brain in the learning

Currently, the increasing interest of researchers is attracted to molecular mechanisms that modulate the structure of chromatin and determine the transcriptional status of nerve cells. Covalent modifications of DNA and histones are known to affect both the chromatin state and transcription. Some modifications are involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, schizophrenia and depression and are involved in the mechanisms of long-term memory formation and neuronal plasticity in mammals, mollusks and insects.

This work is aimed at studying the regulatory mechanisms of H3 histone methylation in brain neurons, in connection with the preservation of the memory of the food reflex in the honeybee *Apis mellifera*. Gene expression of histone methyltransferase *Setd1* and demethylase *Kdm1A* in the brain was studied by DNA extraction, RT-PCR and subsequent electrophoretic detection. The share of neurons in the calyx of fungal bodies containing monomethylated histone H3 by lysine 4 (H3K4me1) was assessed by preliminary immunohistochemical staining of brain sections with antibodies to monomethylated histone H3.

It was found that after 1 hour after the training procedure the gene of histone methyltransferase SETD1 was expressed, which is probably due to its participation in memory formation. For histone demethylase KDM1A such connection is not detected. Histone H3 monomethylation by lysine 4 is involved in memory formation.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 5 |
| 1. ВВЕДЕНИЕ | 7 |
| 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 9 |
| 2.1. Структурно-функциональная организация хроматина | 9 |
| 2.1.1. Гистоны | 9 |
| 2.1.2. Нуклеосомы | 10 |
| 2.1.3. Ремоделирование хроматина | 12 |
| 2.2. Хроматин и транскрипция | 13 |
| 2.2.1. Транскрипционно – активный хроматин | 13 |
| 2.2.2. Регуляция транскрипции у эукариот на уровне хроматина | 14 |
| 2.2.3. Типы посттрансляционных модификаций гистонов | 17 |
| 2.2.4. Метилирование H3K4 | 20 |
| 2.2.5. Ферменты, метилирующие/деметирующие гистоны | 21 |
| 2.3. Долговременная память и эпигенетическая регуляция экспрессии генов | 24 |
| 2.3.1. Молекулярно – генетические и физиологические основы обучения и памяти у животных | 24 |
| 2.3.2. Роль эпигенетических модификаций в процессе формирования памяти | 27 |
| 2.4. Условный пищевой обонятельный рефлекс вытягивания хоботка – модель для изучения памяти медоносной пчелы | 29 |
| 3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ | 32 |
| 3.1. Материал | 32 |
| 3.2. Методы | 32 |
| 3.2.1. Метод выработки пищевого условного рефлекса | 32 |
| 3.2.2. Иммуногистохимический метод | 34 |
| 3.2.3. Статистическая обработка | 35 |
| 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 36 |
| 5. ВЫВОДЫ | 40 |
| 6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 41 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция, совмещённая с обратной транскрипцией
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- UPP+ и UPP- - сформированная и несформированная условно-рефлекторная реакция соответственно
- CBP - CREB-связывающий белок
- CH₃ – метильная группа
- CHD1 – фактор ремоделирования хроматина
- CPBF – фактор, связывающий коровую последовательность РНК-полимеразы II
- HDM – гистоновые деметилазы
- DSIF (англ. DRB sensitivity inducing factor) – фактор негативной регуляции элонгации РНК-полимеразы II
- H2A – коровый гистон 2A
- H2B – коровый гистон 2B
- H3 – коровый гистон 3
- H4 – коровый гистон 4
- H3K4 – лизин 4 гистона H3
- H3K9 – лизин 9 гистона H3
- H3K27 – лизин 27 гистона H3
- H3K36 – лизин 36 гистона H3
- H3K79 – лизин 79 гистона H3
- H4K20 – лизин 20 гистона H4
- HAT – гистонацетилтрансфераза
- HDAC – гистон-деацетилаза
- HP1 – гетерохроматиновый белок
- ISWI – послеоперационная рана
- KDM – гистоновые лизин деметилазы
- KMT – гистоновые лизин метилтрансферазы
- me1, me2, me3 – моно-, ди-, триметилирование
- MMTV (англ. Mouse mammary tumor virus) - вирус опухоли молочной железы мыши
- NCBI - Национальный центр биотехнологической информации США
- NuRD (англ. nucleosome remodeling and deacetylation) – фактор ремоделирования хроматина, совмещённый с гистон-деацетилазой
- PHD (англ. Plant Homeo Domain) – гомеодомен, впервые обнаруженный у растений

SET (англ. Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax) – активный домен в гистоновой метилтрансферазе

Suv39h - гистоновая-лизин N-метилтрансфераза

SWI/SNF (англ. SWItch/Sucrose Non-Fermentable) – хроматин-ремоделлирующий комплекс

TFIID – базальный транскрипционный фактор IID

TSS – точка (сайт) инициации транскрипции

1. ВВЕДЕНИЕ

Бурное развитие нейронаук в последние десятилетия способствовало значительному прогрессу в понимании тонких механизмов функционирования мозга: нейротрансмиссии, активности цитоскелета, синаптогенеза, а также экспрессии генов. Исследования последних десятилетий не оставляют сомнений в том, что формирование долговременной памяти сопровождается изменением функционального состояния генома (Гринкевич. 2012). Важнейшим механизмом изменения транскрипционного состояния генов в процессе обучения является обратимая реорганизация хроматина, которая осуществляется посредством присоединения/удаления специфических химических групп к ДНК и к гистонам. Ферменты, вносящие или снимающие ковалентные посттрансляционные модификации в гистоновые терминалы, играют важную роль в регуляции генной активности.

Эпигенетические процессы, протекающие в мозге при обучении, стрессе, различных нейропсихических и нейродегенеративных заболеваниях в настоящий момент широко изучаются на различных животных моделях. В ряде работ показано участие метилирования гистона H3 по лизину 4 (H3K4me - модификации, связанные с активацией транскрипции генов) в работе ЦНС. Нарушения в H3K4me характерны для ряда нейропсихических патологий, таких как синдром Видеманна-Штайнера, синдром Клеефстры, синдром Кабуки, аутизм, при некоторых типах умственного отставания, афазиях, шизофрении, тревожности и депрессии (Shen et al., 2014).

Таким образом, данные полученные в ряде экспериментов на млекопитающих, свидетельствуют об участии посттрансляционных модификаций гистонов и ДНК в когнитивных процессах. Однако, несмотря на очевидную актуальность, на насекомых подобных исследований на сегодняшний день недостаточно. Основываясь на доказанном сходстве клеточных механизмов обучения и памяти позвоночных и беспозвоночных животных, была высказана идея о том, что эпигенетические механизмы регуляции функционального состояния генома, лежащие в основе когнитивных процессов, свойственны представителем обеих групп.

К настоящему моменту существует всего несколько работ, посвященных участию ковалентных модификаций ДНК и гистонов (метилование) в процессе формирования памяти у такого важного объекта в экологическом и экономическом аспектах как медоносная пчела *Apis mellifera*. Медоносная пчела, обладает богатым поведенческим репертуаром при относительно просто устроенной ЦНС. Пчела способна формировать угашать и переделывать сложные условные рефлексы. Морфологическим субстратом

формирования и хранения памяти у пчелы (и других насекомых) являются парные грибовидные тела.

Ранее в работе Швецова с соавторами (2013) было показано участие суммарного диметилирования гистона H3 по лизину 4 в нейронах грибовидных тел в формировании памяти у медоносной пчелы. Монометилирование гистона H3 по лизину 4 при формировании памяти ранее не исследовалось. Также до сих пор у медоносной пчелы не изучены ферменты, метилирующие гистоны.

В связи с этим **целью** данной работы было изучение регуляторных механизмов метилирования гистона H3 в нейронах мозга, в связи с сохранением в памяти пищевого условного рефлекса у медоносной пчелы.

Задачи:

У пчел, с выработанным условным рефлексом и без него, через час после процедуры обучения сопоставить:

- 1) Экспрессию генов гистоновой метилтрансферазы Setd1 и гистоновой деметилазы Kdm1 в мозге;
- 2) долю нейронов в калликсах грибовидных тел, содержащих монометилированный по лизину 4 гистон H3.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Структурно-функциональная организация хроматина

Отличительной особенностью организации генома эукариот является упаковка ДНК в хроматин и размещение его в особом компартменте — клеточном ядре. Упаковка в хроматин обеспечивает многократное сокращение линейных размеров ДНК, необходимое для размещения ее в ядре. Для размещения в ядре геномной ДНК ее линейные размеры должны многократно быть сокращены. При этом необходимо обеспечить доступность определенных последовательностей ДНК для регуляторных факторов и ферментов транскрипции. Упаковка ДНК в хроматин происходит в несколько этапов; наиболее изученными являются накручивание ДНК на нукleosомы, компактизация нукleosомной нити с образованием 30-нм фибриллы и сворачивание последней в гигантские (50-200 т. п. н.) петли, закрепленные на белковой скелетной структуре ядра — ядерном матриксе. Ниже этот процесс будет рассмотрен более подробно.

2.1.1 Гистоны

Наибольшую часть ядерных белков составляют гистоны. Выделяют пять основных типов гистонов: H1, H2A, H2B, H3 и H4. Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 входят в состав белковой глобулы минимальной нукleosомы. Это небольшие основные белки с молекулярными массами 10-15 кДа, богатые лизином и аргинином (Шевченко и др., 2009). Положительно заряженные аминокислоты сосредоточены преимущественно в С-концевых и N-концевых частях молекул нукleosомных гистонов, тогда как центральный домен относительно богат гидрофобными остатками. Вторичная структура всех нукleosомных гистонов характеризуется присутствием протяженного α -спирального домена, который фланкируют (с обоих концов) домены, содержащие короткие α -спирали и петли. Аминокислотные остатки (15-30), расположенные на N-концах нукleosомных гистонов, не организованы в какие-либо выраженные вторичные структуры. Эти части молекул нередко называют «хвостами» («tails»). Нукleosомные гистоны относятся к числу наиболее консервативных белков. Их аминокислотные последовательности имеют почти 100%-ю гомологию у всех эукариот.

Гистон H1 существенно отличается от четырех гистонов, входящих в состав минимальной нукleosомы (крупнее, больше остатков лизина, чем аргинина, положительно заряженные аминокислотные остатки сконцентрированы на длинном неструктурированном С-конце, N-конец H1 богат гидрофобными аминокислотными

остатками и в растворе образует глобулу, также неструктурирован (Разин, Быстрицкий, 2013)

Гистоны непосредственно контактируют с ДНК и способны нейтрализовать отрицательный заряд фосфатных групп ДНК за счёт положительных зарядов аминокислотных остатков. Последовательность аминокислот в этих белках является консервативной и практически не различается в организмах различных таксонов. Гистоны присутствуют в ядрах эукариотических клеток; у бактерий гистонов нет (Аппель, 2013).

2.1.2. Нуклеосомы

Открытие нуклеосом заложило основу современных представлений о хроматине. Нуклеосома является базовой структурной единицей первого уровня упаковки ДНК в хроматине. Она представляет собой белковую глобулу или, точнее говоря, некое подобие диска, на который намотан фрагмент ДНК протяженностью 146 п. н. Намотанная на нуклеосомную глобулу ДНК образует 1,65 супервитка. Глобула состоит из восьми молекул гистонов: тетрамера $(H3-H4)_2$ и двух димеров $H2A-H2B$. Диаметр глобулы-диска составляет ≈ 11 нм, а высота - 5,7 нм. Гистоны октамера уложены в левозакрученную суперспираль, стерически соответствующую суперспирали фрагмента ДНК в составе минимальной нуклеосомы. Важным принципом организации гистонового октамера является построение его из модулей: двух гетердимеров гистонов $H2A-H2B$ и тетрамера гистонов $(H3-H4)_2$. Расположение гистонов по ходу молекулы ДНК является следующим: димеры $H2A-H2B$ контактируют с ДНК на входе и выходе из нуклеосомной частицы, а тетрамер $(H3-H4)_2$ соприкасается с центральной частью накрученного на нуклеосомную глобулу фрагмента ДНК. Гистоны контактируют с фосфодиэфирным остовом молекулы ДНК. Контакты реализуются через каждые 10 пар оснований, когда малая бороздка ДНК оказывается развернутой внутрь. Накрученная на гистоновый октамер ДНК образует 14 прочных электростатических контактов с молекулами гистонов. Помимо электростатических контактов, существуют и гидрофобные взаимодействия с остатками рибозы. Азотистые основания не участвуют во взаимодействиях с гистонами, поэтому связывание ДНК с нуклеосомной глобулой не является специфичным в отношении последовательности ДНК. Два витка ДНК расположены на нуклеосомной глобуле параллельно, так что бороздки ориентированы одинаково. Благодаря этому между витками ДНК остается достаточно места для прохождения наружу N-терминальных доменов гистонов $H2B$ и $H3$; N-терминальные домены гистонов $H2A$ и $H4$ выходят за пределы глобулы со стороны плоских поверхностей нуклеосомной глобулы.

Гистон Н1 связывается с концами молекулы ДНК, входящей и выходящей из минимальной нуклеосомы, замыкая два полных витка двойной спирали (Разин, Быстрицкий, 2013).

Таким образом, нуклеосомная структура является крайне консервативной, а общие принципы организации нуклеосомной частицы универсальны.

Ковалентные посттрансляционные модификации гистонов существенно увеличивают потенциальное разнообразие нуклеосомных частиц. Основные мишени для модификаций находятся в N-концевых участках аминокислотной последовательности гистонов. Эти участки не входят в состав нуклеосомной глобулы и остаются экспонированными на поверхности нуклеосомы. Наиболее изученной модификацией является ацетилирование лизиновых остатков. В гистонах Н2В, Н3 и Н4 имеется по 4 экспонированных лизиновых остатка, в гистоне Н2А - две таких. Помимо ацетилирования, хорошо известны и другие ковалентные модификации гистонов: метилирование лизиновых и аргининовых остатков, фосфорилирование сериновых остатков, поли-АДФ-рибозилирование остатков глутаминовой кислоты, убиквитилирование и сумоилирование. Таким образом, потенциальное многообразие нуклеосомных частиц является почти неисчерпаемым.

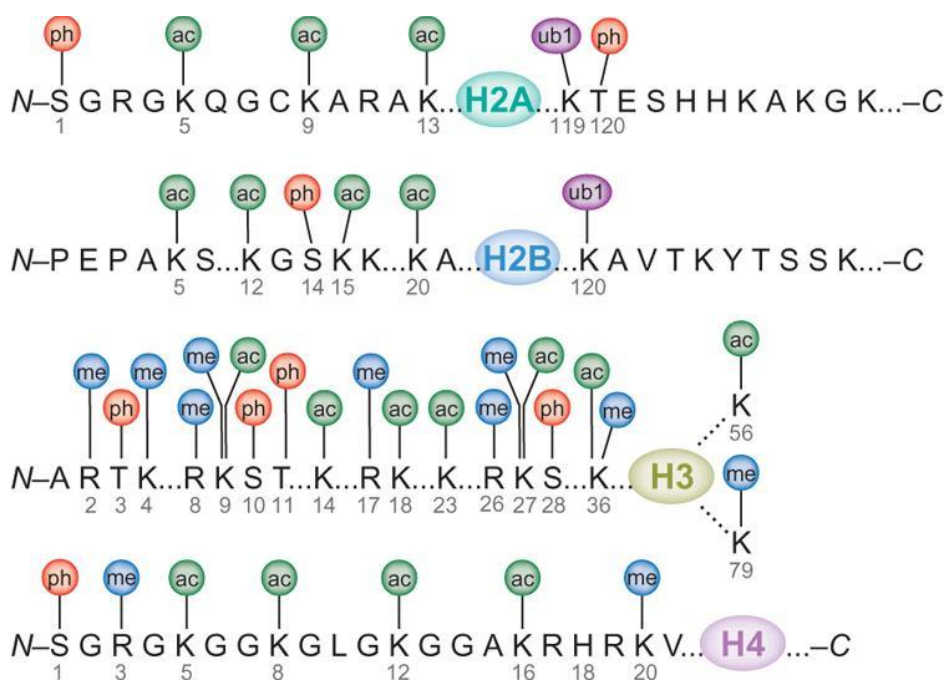


Рисунок 1. Гистоновый код.

Совокупность сигналов, экспонированных на поверхности нуклеосом, представляет особый эпигенетический код, называемый также гистоновым кодом. Этот код может считываться различными белками, регулирующими конденсацию хроматиновой фибриллы и участвующими тем или иным образом в репликации,

транскрипции, репарации ДНК и других генетических процессах. Значение различных комбинаций сигналов гистонового кода в настоящее время активно изучается (Разин, Быстрицкий, 2013).

В большинстве случаев нуклеосомы располагаются на молекуле ДНК случайным образом с сохранением стандартного размера спейсерных фрагментов. В ряде районов генома наблюдается, однако, фиксированное расположение нуклеосом на определенных нуклеотидных последовательностях – фэйзинг (промотор вируса ММТВ, участок начала репликации вируса SV-40, B^{major} -глобиновый ген мыши, сателлитная ДНК африканской зеленой мартышки). Регулярное расположение нуклеосом обычно возникает в результате наличия в определенном районе генома того или иного барьера для распространения нуклеосом либо последовательности ДНК, на которой нуклеосома располагается с гораздо большим предпочтением, чем на окружающих последовательностях.

По мере удаления от нуклеосомы, занимающей фиксированную позицию, регулярность в расположении нуклеосом относительно последовательности ДНК будет постепенно утрачиваться. Посадка нуклеосом на определенные последовательности ДНК часто делает эти последовательности недоступными для взаимодействия с другими ДНК-связывающими белками и может играть важную роль в регуляции активности генов.

В геномной ДНК существуют участки, свободные от нуклеосом. В подавляющем большинстве случаев это участки связывания одного или нескольких регуляторных белков, которые могут узнавать определенные последовательности ДНК.

Некоторые последовательности ДНК не способны наматываться на нуклеосомные глобулы. Это последовательности, обладающие пониженной гибкостью, и последовательности, склонные к образованию неканонических структур, например, шпилек. Примером могут служить АТ-гомополимеры, которые часто находятся в промоторных областях постоянно экспрессирующихся генов (Разин, Быстрицкий, 2013).

2.1.3. Ремоделирование хроматина

Статичная организация геномной ДНК в нуклеосомы и далее в 30-нм фибриллу накладывает существенные ограничения на доступность участков узнавания различных регуляторных белков.

Проблемы, которые нуклеосомная организация создает для осуществления различных функциональных процессов, преодолеваются с привлечением ферментных комплексов ремоделирования хроматина. Различные комплексы ремоделирования хроматина могут выполнять следующие задачи: (1) перемещение нуклеосом вдоль

молекулы ДНК и размещение нуклеосомных глобул на равных расстояниях друг от друга; (2) частичная декомпактизация нуклеосом, сопряженная с изменением спектра контактов ДНК и гистонов; (3) перемещение нуклеосомных глобул с одной молекулы ДНК на другую; (4) замена канонических гистонов на варианты формы. Большинство известных комплексов ремоделирования хроматина состоят из нескольких субъединиц, наиболее важной из которых является субъединица, обладающая АТФазной активностью. Другие субъединицы, входящие в состав комплексов ремоделирования хроматина, служат для привлечения этих комплексов к тем или иным областям хромосом (иными словами, для выбора мишеней ремоделирования). По типу АТФазной субъединицы все известные комплексы ремоделирования хроматина можно разделить на четыре большие группы: SWI/SNF, ISWI, CHD и INO80.

АТФазы всех четырех перечисленных выше групп способны генерировать негативные супервитки в ДНК, что может привести к мобилизации нуклеосомных глобул. Процесс перемещения нуклеосомной глобулы вдоль ДНК сопряжен с гидролизом АТФ (20 молекул) и носит ступенчатый характер. Это предсказание подтверждено экспериментально: размер шага составляет около 50 п. н. для SWI/SNF и около 10 п. н. для других комплексов ремоделирования (Разин, Быстрицкий, 2013).

2.2. Хроматин и транскрипция

2.2.1. Транскрипционно-активный хроматин

Выделяют 2 основных типа хроматина: гетеро- и эухроматин. Гетерохроматин можно увидеть при окраске ядер специфически ДНК-связывающими красителями в виде интенсивно окрашенных хроматиновых глыбок. А области ядра, где концентрация ДНК существенно ниже будут окрашены слабее – это эухроматин (Разин, Быстрицкий, 2013). Гистоны гетерохроматина характеризуются низким уровнем ацетилирования по лизиновым остаткам, что увеличивает их основные свойства и связывание с кислыми фосфатными группами в ДНК, что приводит к большей компактизации. Кроме этого, к гетерохроматинизации приводит метилирование 9 и 27 остатков лизина в гистоне H3 гистоновой метилтрансферазой Suv39h. У дрозофилы метилтрансфераза Suv39h функционально ассоциирована с гистоновой деацетилазой, а ацетилирование и метилирование 9 лизина гистона H3 являются взаимоисключающими. Таким образом обеспечивается баланс метилирования / деацетилирования гистона H3, приводящий к усилению связи между ДНК и гистоновым кором, а также с белком гетерохроматина HP1.

Эухроматин характеризуется меньшей спирализацией ДНК, чем в гетерохроматине. В эухроматине находятся активно транскрибирующиеся гены. Транскрипционно-активный эухроматин обогащен ацетилованными гистонами в нуклеосомах и обеднен гистоном H1.

Помимо ацетилирования, гистоны могут также метилироваться, фосфорилироваться, убиквитинилироваться, сумаоилироваться и поли-АДФ-рибозилироваться. Совокупность ковалентных посттрансляционных модификаций гистонов, экспонированных на поверхности нуклеосом, составляет особый гистоновый код. Этот код может распознаваться особыми белками, регулирующими спирализацию хроматиновой нити, важен для процессов репликации, транскрипции, репарации ДНК.

В отличие от ацетилирования, эффекты метилирования гистонов могут быть противоположными: имеют значение мишени для метилирования и количество метильных групп (моно-, ди- или три-) на этой мишени. Метилирование H3 по лизинам 4, 36 и 79 присуще транскрипционно-активному хроматину. Триметилирование гистона H3 по лизину 4 обычно имеет место в промоторных областях транскрибирующихся генов. Моно- и диметилирование лизина гистона H3 по лизину 4 отмечено и для промоторных областей, и для 5'-нетранслируемых областей. Кроме того, монометилирование гистона H3 по лизину 4 характерно для энхансеров.

В заключение данного раздела следует сказать о том, что существует много различных путей активации хроматина путем внесения определенных модификаций в молекулы гистонов. Это обеспечивает возможность контроля экспрессии (Разин, Быстрицкий, 2013).

2.2.2. Регуляция транскрипции у эукариот на уровне хроматина

У эукариотических организмов существуют механизмы регуляции транскрипции генов через изменение структуры хроматина. Хроматин является динамичной структурой, которая способна быстро реагировать на внутриклеточные и внеклеточные сигналы, а также поддерживать состояние активности или неактивности генов (Разин, Быстрицкий, 2013). Ремоделирование хроматина вблизи промоторных участков генов участвует в переключении функционального состояния генов из активного в молчащее и наоборот.

Преобразования хроматина осуществляется с помощью трех основных взаимосвязанных механизмов:

1. Ковалентной модификации гистонов (гистоновый код);

2. АТФ-зависимого ремоделирования хроматина;
3. Включения вариантных гистонов в хроматин.

Комбинации таких изменений рассматриваются в качестве фундаментального эпигенетического дополнения к генетическому коду (<http://biod.pnpi.spb.ru/~konev/chromatin.html>).

Наиболее разработанной в настоящее время моделью функционирования хроматина считается «гистоновый код». Гипотеза «гистонового кода» была предложена Strahl и Allis в 2000 году (Strahl, Alis, 2000), согласно ей, существуют модификаций гистонов, способные влиять на активацию или репрессию транскрипции.

То есть, гистоновый код — это разнообразный набор посттрансляционных модификаций определенных аминокислотных остатков гистонов на N-терминальном конце, (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, рибозилирование), который вовлекаются в сборку, поддержание и изменение структуры хроматина и который можно передавать по наследству.

«Гистоновый код» является основным эпигенетическим механизмом, контролирующим включение или выключение генов и передачу программы этого контроля по наследству от клетки к клетке. Модификации гистонов не имеют прямого влияния на структуру хроматина, они либо понижают положительный заряд на хвостах гистонов, что приводит к их диссоциации от ДНК, либо способствуют связыванию белков, распознающими модифицированные гистоны. Например, хромодомен белка HP1 связывается с H3K9me. Подобный домен в белке Polysomb распознает H3K27me. Учитывая количество модификации, возможно существование нескольких тысяч различных изоформ нуклеосом, различающихся набором модифицированных аминокислотных остатков.

Эпигенетические модификации зависят от трёх групп белков: «ридеров» (read – англ. – читать), «райтеров» (write – англ. – писать), и «эрэйзеров» (erase – англ. – стирать).

«Ридеры» содержат домены, способные распознавать наличие определённых функциональных групп на терминалях гистонов. Взаимодействие между распознающим доменом «ридера» и модифицированной аминокислотой в гистоне позволяет различать различные химические модификации, например, моно-, ди- и триметилирование. К белкам-«ридерам» относятся хромодомены, бромодомены и некоторые другие белки.

Бромодомен – это структурный домен в белках, распознающий ацетилированные лизиновые остатки в гистонах, входят в состав гистоновых ацетилтрансферазных комплексов. Бромодомен также есть у некоторых других белков, участвующих в

активации транскрипции, например, у фактора транскрипции TFIIID. Хромодомен узнаёт метилированные лизиновые остатки в гистонах. Домен PHD (Plant Homeo Domain) также узнает метилированные лизины и является маркером активного хроматина.

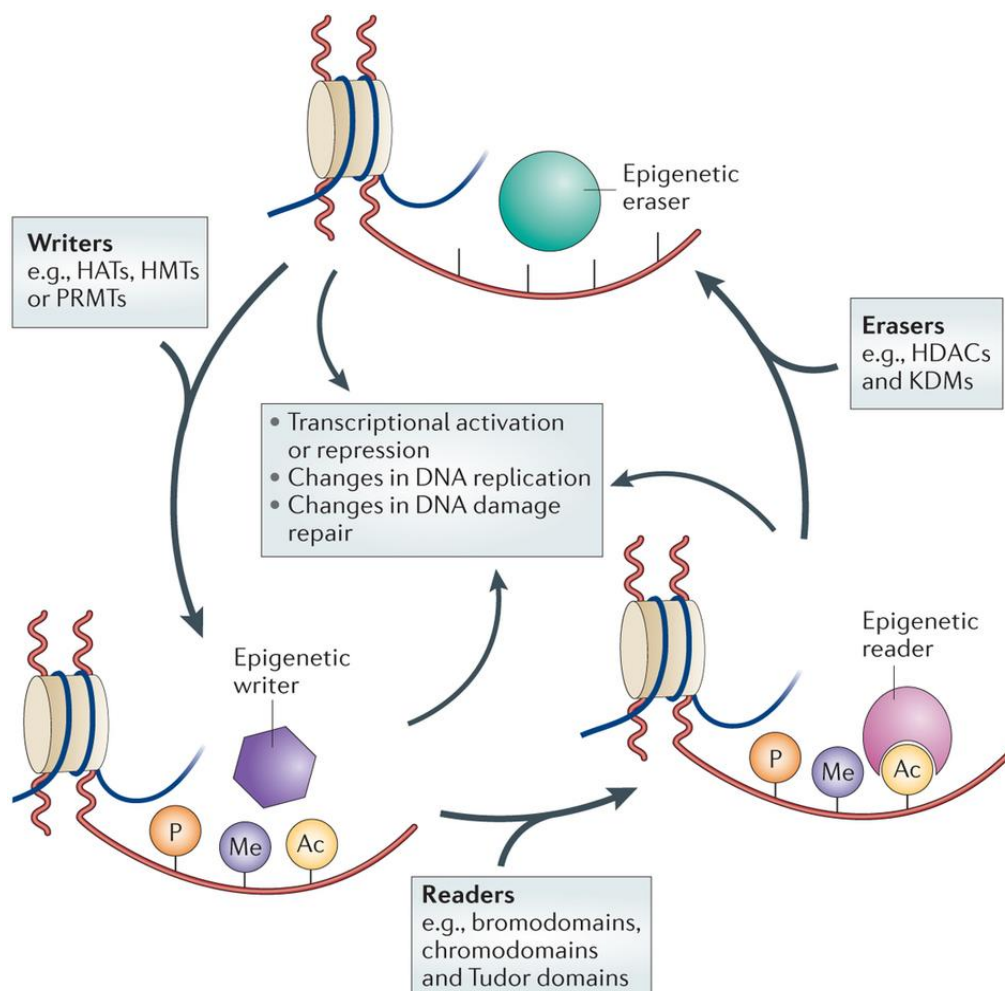


Рисунок 2. Белки, связанные с эпигенетическим статусом хроматина. Writers – вносят химическую посттрансляционную модификацию в терминаль гистона, Erasers – удаляют модификацию, Readers – распознают модификацию. (по Falkenberg & Johnstone, 2014).

Эпигенетические белки - «райтеры» катализируют присоединение химических групп либо на гистоны, либо на ДНК. К «ридерам» относятся ДНК-метилтрансферазы, гистоновые метил-, ацетилтрансферазы, некоторые киназы и т.д.

Эпигенетические модификации могут быть удалены с помощью группы ферментов, известных как эпигенетические белки-«эрэйзеры». В эту группу входят ДНК-деметилазы, гистоновые лизин/аргинин деметилазы, деацетилазы, гистоновые серин/треонин/тирозин фосфатазы, гистоновые деубиквитиназы и др.

2.2.3. Типы посттрансляционных модификаций гистонов

К посттрансляционным ковалентным модификациям гистонов относятся: ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, метилирование и фосфорилирование (Bartova et al., 2008; Ruthenburg et al., 2007). Влияние той или иной модификации на экспрессию генов зависит от ее типа и места, в котором она находится.

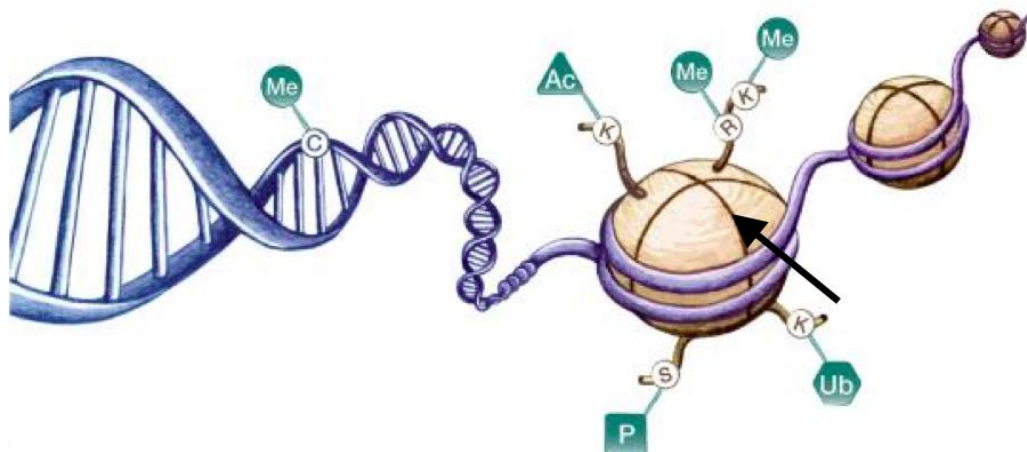


Рисунок 3. Посттрансляционные модификации гистонов. (по материалам <https://worldwide.promega.com>).

Ацетилирование – модификация гистонов, при которой к лизиновым остаткам ковалентно присоединяются ацетильные группы. Ацетилированные гистоны находятся в промоторной области генов и всегда играют активирующую роль в регуляции транскрипции (Grunstein et al., 1997, Mizzen et al., 1998, Struhl et al., 1998). Ацетилирование декомпактизует структуру хроматина и облегчает взаимодействие ацетилированных нуклеосом с различными факторами транскрипции и ремоделирования хроматина (Jones et al., 1998). Таким образом, ацетилирование-деацетилирование прямо влияет на подвижность хроматина, на белок - белковые взаимодействия разных факторов с белками хроматина и на транскрипционный статус ДНК (Wolffe et al., 1999). Степень ацетилирования гистонов определяют два типа ферментов – гистоновые ацетилтрансферазы (НАТ) и деацетилазы (HDAC) (Archer et al., 1999).

Фосфорилирование – посттрансляционная модификация, заключающаяся в присоединении к белку фосфата с АТФ на гидроксильную группу серина или треонина, что повышает отрицательный заряд и снижает сродство ДНК к гистону. Главная роль фосфорилирования гистонов заключается в его влиянии на другие модификации в гистоне. Фосфорилирование связано с киназным переносом сигнала из цитоплазмы в клетку и изменением экспрессии генов. N-терминалы гистонов подвергаются фосфорилированию во время деления клетки. Функциональная роль фосфорилирования

является двойной: в период интерфазы фосфорилирование гистонов приводит к декомпактизации хроматина и часто наблюдается в активированных промоторах, тогда как при делении клетки фосфорилирование приводит к конденсации хромосом (<http://estnauki.ru/biology/2-biology/10617-fosforilirovanie-gistonov.html>).

Убиквитинирование – присоединение к белку молекул убиквитина (убиквитин – играет роль маркера отработанных белков для протеасом, которые впоследствии их разрушают). Влияние убиквитинирования на транскрипцию может быть либо репрессирующим, либо активирующим в зависимости от сайтов связывания (Henry et al., 2003; Kao et al., 2004).

Метилирование N-терминали гистонов вместе с другими модификациями вносит свой вклад в регуляцию транскрипции, влияя на доступность хроматина для РНК-полимеразы. Метилирование гистонов может происходить по лизинам и аргининам. К каждому остатку лизина может присоединяться до трех метильных групп (Bannister et al., 2005), в результате чего лизин может быть монометилированным (me1), диметилированным (me2) или триметилированным (me3). Аргинины могут быть моно- (me1) и ди- (me2) метилированными.

Таблица 1. Влияние различных типов метилирования на молекулярно-генетические процессы (по Martin, Zhang, 2005).

| Сайт метилирования | Функция |
|--------------------|---|
| H3K4 | Активация транскрипции, связь с активными генами и энхансерами; |
| H3K9 | Репрессия транскрипции; Усиление метилирования ДНК; |
| H4K20 | Репрессия транскрипции, присутствует в перичентромерном гетерохроматине; |
| H3K27 | Репрессия транскрипции, связь и энхансерами; |
| H3K36 | Способствует элонгации РНК-полимеразы II через кодирующий участок гена; Репрессия индуцибельных генов; |
| H3K79 | Активация транскрипции; Участие в репарации ДНК; |

В зависимости от положения и степени метилирования аминокислотного остатка, влияние этой модификации на транскрипцию может быть активирующим или репрессирующим (см. табл. 1). Метилированные гистоны располагаются по всей области генов. На коровых гистонах существует не менее 24 сайтов метилирования лизинов и

аргининов, а общее число комбинаций метилированных нуклеосом очень велико. Помимо этого, конечный результат зависит от наличия других модификаций. Такой потенциал необходим для регуляция сложнейшего процесса транскрипции (Jenuwein, Allis, 2001; Zhang, Reinberg, 2001; Lee et al., 2005; Martin, Zhang, 2005; Wysocka et al., 2006).

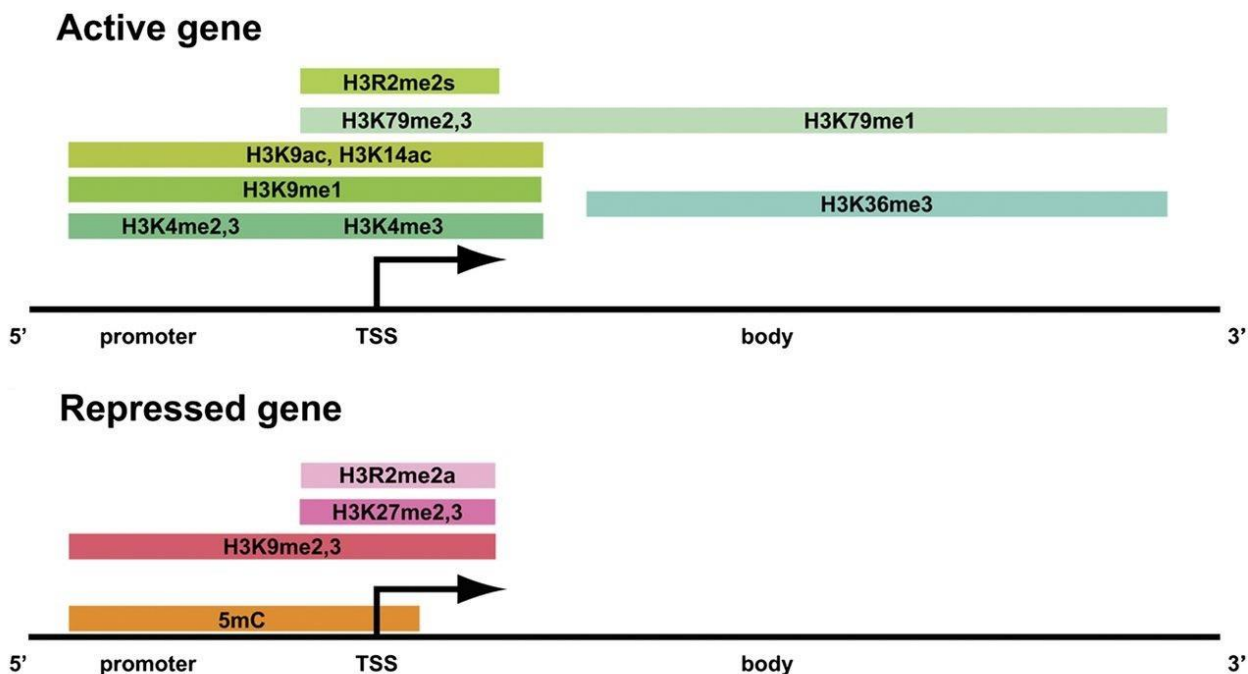


Рисунок 4. Участие метилирования гистонов в активации/репрессии генной экспрессии. Показано распределение различных типов метилирования в промоторе (promoter), вдоль гена (body) и относительно точки инициации транскрипции (TSS) (по Butler and Dent, 2013).

Для различных типов метилирования показано различное распределение по участкам активных и репрессированных генов. Например, ди- и триметилирование лизина 4 по гистону H3 связано с промоторной областью активных генов, а с точкой начала транскрипции – только преимущественно триметилирование. В свою очередь у репрессированных генов, с промоторной областью и точкой начала транскрипции связано ди- и триметилирование гистона H3 по лизину 9 (Butler, Dent, 2013).

Метилирование лизинов регулируется действием белков с противоположными свойствами – гистоновыми лизин-специфичными метилтрансферазами и деметилазами. Белки семейства гистоновых метилтрансфераз SET метилируют H3K4, тогда как деметилирование осуществляется лизин-специфичными гистоновыми деметилазами (Klose et al., 2007; Ruthenburg et al., 2007).

Метилирование аргининов осуществляется гистоновыми аргинин-специфичными метилтрансферазами, которые добавляют метильные группы к аргинину. Метилтрансфераза 6 действует как репрессор транскрипции, а аргинин метилтрансфераза 1 – как ее активатор (Di Lorenzo et al., 2011).

2.2.4. Метилирование гистона H3 по лизину 4

Метилирование гистона H3 по лизину 4 (H3K4) играет важную роль в эпигенетической регуляции и связано с активацией транскрипции. H3K4 метилирование впервые было выявлено в семенниках форели (Honda et al., 1975). Механизм действия метилирования гистонов в отличие от ацетилирования регулирует транскрипцию через привлечение положительных белковых факторов и блокирования негативных, а не только с локальным изменением заряда в нуклеосоме. Так, H3K4me3 привлекает фактор ремоделирования хроматина CHD1, который связывается с H3K4me2 и me3 (Flanagan et al., 2005) и BPTF (Li et al., 2006). Эти факторы способствуют декомпактизации хроматина, предотвращая связывание с репрессирующим комплексом NuRD (Nishioka et al., 2002) и INHAT комплексами (Schneider et al., 2004). Домены, распознающие метилирование H3K4, это тандемный набор хромодоменов в Chd1 (Sims et al., 2006) и «цинковый палец» в NURF (Li et al., 2006).

Гистон H3 может иметь три разных степени метилирования по 4 лизиновому остатку: моно-, ди- и триметилирование. Диметилирование (H3K4me2) связано с активными и потенциально активными генами, а триметилирование (H3K4me3) – преимущественно с сайтом начала транскрипции (Bernstein et al., 2002; Ng et al., 2003). Высокие уровни триметилирования H3K4 связаны с 5'-областью большинства активных генов, также показана связь между триметилированием и скоростью транскрипции, активностью РНК-полимеразы II и ацетилированием гистонов. Помимо этого, известно, что в ходе активной транскрипции поддерживается триметилированное состояние гистона H3 (Santos-Rosa et al., 2002; Schubeler et al., 2004; Bernstein et al., 2005; Pokholok et al., 2005). Монометилирование гистона H3 связано с промоторной 5'-областью активных генов, а также с активными энхансерами и энхансерами, находящимися в состоянии динамического равновесия (poised enhancer) (Calo, Wysocka, 2013).

Метилирование по H3K4 взаимодействует с другими модификациями. Например, метилирование H3 по лизину 9 не происходит, если H3 метилирован по лизину 4 и H3 по серину 10 фосфорилирован. Такое взаимодействие модификаций наблюдается в нуклеосомах активно транскрибируемых генов. Тогда как в нуклеосомы репрессированных генов обогащены H3K9. Также показано, что на H3K4me3 может

влиять моноубиквитинилирование H2BK123. Как это происходит - неясно, но одно из предположений заключается в том, что комплекс Set1 не может триметилировать H3K4, если нуклеосома не находится в определенном конформационном состоянии, которое определяется убиквитинилированием H2B (Zhang, Reinberg, 2001; Lee et al., 2005).

В ряде работ показано участие H3K4me в работе ЦНС. Нарушения в H3K4me характерны для ряда нейropsychических патологий, таких как синдром Видеманна-Штайнера, синдром Клеефстры, синдром Кабуки, аутизм, при некоторых типах умственного отставания, афазиях, шизофрении, тревожности и депрессии (Shen et al., 2014).

В работах Gupta et al. (2010) и Швецова с соавторами (2013) показано участие H3K4me3 и суммарного H3K4me2+H3K4me3 в формировании памяти у мышей и медоносной пчелы соответственно.

2.2.5. Ферменты, метилирующие/деметирующие гистоны

Существует большое разнообразие ферментов, метилирующих (метилтрансферазы) и деметилирующих (деметилазы) гистоны. Некоторые из них хорошо изучены у дрожжей, в меньшей степени – у дрозофилы и млекопитающих. Гистоновые метилтрансферазы и деметилазы у медоносной пчелы на сегодняшний день остаются неизученными. Единственные данные о таких ферментах – это предсказанные нуклеотидные и аминокислотные последовательности в базе данных GenBank (NCBI).

Метилирование эпсилон-аминогруппы лизиновых остатков является основным регуляторным механизмом, влияющим на структуру и функции хроматина, катализируемое суперсемейством ферментов S-аденозилметионина-зависимых метилтрансфераз. Индивидуальные лизин-метилтрансферазы обладают высокой субстрат- и продукт-специфичностью (моно-, ди- и / или триметилирование), что лежит в основе их регуляторных функций. Действительно, лизинметилтрансферазы регулируют множество ядерных процессов, включая образование гетерохроматина, транскрипцию, репликацию ДНК и репарацию ДНК.

Метилирование гистона H3 у лизина 4 (H3K4) является хорошо изученной модификацией, связанной с хроматином в его активном или динамично-равновесном состоянии. На различных объектах было показано, что наличие метилирования H3K4 связано с транскрипционной активностью. В многочисленных исследованиях было продемонстрировано, что H3K4me3 локализуется вблизи точки начала транскрипции транскрипционно активных генов, тогда как H3K4me2 и H3K4me1 встречаются более широко вдоль транскрипционно активных генов и энхансерных элементов. Известно,

метиляции H3K4 оказывает положительные эффекты на транскрипционную активность.

Одной из первых обнаруженных метилтрансфераз была SET1 дрожжей, являющаяся единственной метилтрансферазой H3K4 в этом организме. Нокаут гена метилтрансферазы SET1 приводил к тому, что у дрожжей этого штамма полностью отсутствовало метилирование H3K4me1, H3K4me2 и H3K4me3. У этих мутантов наблюдались дефекты роста и структуры теломерного хроматина.

Set1 и ее ортологи в высших эукариот рекрутируются на хроматин фосфорилированным С-терминальным доменом РНК-полимеразы II. Это взаимодействие с иницирующей формой pol II приводит к посадке Set1 вблизи 5'-конца активных генов, что тесно коррелирует с пиком H3K4me. У многоклеточных организмов белки SET1A / B, по-видимому, функционируют аналогично Set1 дрожжей при выполнении большинства связанных с транскрипцией метилирования H3K4, обнаруженных в активных генах, предположительно посредством котранскрипционного рекрутинга.

У эукариотов гистоновые Set-метилтрансферазы работают в составе мультисубъединичного комплекса COMPASS (complex of proteins associated with Set1). У дрожжей в состав COMPASS консервативные белки Swd3, Bre2 / Spp1, Swd1 и Sdc1, у млекопитающих - ортологи WDR5, ASH2L, RbBP5 и DPY-30 (WRAD) соответственно. Делеция любого WRAD-кодирующего гена у дрожжей приводит к фенотипам и изменениям в экспрессии генов, которые напоминают те, которые наблюдаются у мутантов SET1, что указывает на функционально релевантное взаимодействие между этими белками *in vivo*. Кроме того, компоненты WRAD также необходимы для поддержания глобального метилирования H3K4 в клетках. В исследованиях, проведенных на дрожжах и млекопитающих было обнаружено, что WDR5 и RbBP5 необходимы для поддержания H3K4me1, H3K4me2 и H3K4me3, тогда как ASH2L и DPY-30 принципиально необходимы для H3K4me3 и в меньшей степени H3K4me2. WRAD представляет собой консервативный набор белков, которые связываются с SET-метилтрансферазами H3K4 для повышения их стабильности и / или каталитической активности (Ernst, Vako, 2012).

SETD1

SETD1 (SET domain 1) - гистоновая метилтрансфераза, относящаяся к семейству лизинных метилтрансфераз, содержащих домен SET (**S**u(var)3-9, **E**nhancer-of-zeste, **T**rithorax) domain). Гистоновые SET-метилтрансферазы в качестве источника метильных групп используют S-аденозил-L-метионин. Осуществляет моно-, ди- и триметилирование H3K4. Показано участие SETD1 в патогенезе шизофрении (Shen et al., 2014).

SETD1 пчелы состоит из 1503 а.к. Содержит 5 доменов: 1. N-терминальный РНК-распознающий домен RRM (133-225 а.к.) (RRM - RNA recognition motif), также называемый RBD - РНК-связывающим (RBD - RNA binding domain) или RNP - рибонуклеопротеиновым (RNP - ribonucleoprotein domain); 2. Usher (281-400 а.к) – консервативный домен, сходный с бактериальными белками – поринами, содержит остатки цистеинов, участвующие в образовании дисульфидных связей между N- и С-терминалями белка; N-SET (1207-1358 а.к) – домен, необходимый для связывания белка Spp1 комплекса COMPASS; SET (1366-1487 а.к) – собственно каталитический метилтрансферазный домен, метилирует гистон H3 по лизину 4; postSET (1487-1503 а.к) – С-терминальный домен, содержит остатки цистеина, связывающие атомы цинка и стабилизирующие белок. SET-каталитическая область состоит из β -листов. Взаимодействие между pre-SET и SET имеет решающее значение для функционирования фермента (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=XP_395451.4).

Ген *Setd1* (GenBank Gene ID: 411985) пчелы локализован на хромосоме LG1 (GenBank NC_007070.3, 7362 п.н.). С этого гена транскрибируется единственная мРНК (GenBank XM_395451, 5890 п.н.), транслирующаяся в один белок SETD1 (GenBank XP_395451, 1503 а.к.). Согласно BLAST, гистоновая метилтрансфераза SETD1 медоносной пчелы *Apis mellifera* на 58% идентична таковой у *Drosophila melanogaster*, на 59% - *Homo sapiens*.

KDM1A

KDM1A (lysine (K)-specific demethylase 1A, lysine-specific histone demethylase 1A - LSD1) - гистоновая деметилаза, деметилирует 4 и 9 лизиновые остатки в гистоне H3. Может играть роль в подавлении нейрональных генов. Показано участие этой деметилазы в формировании памяти у мышей (Neelamegam et al., 2012).

Является ФАД-зависимой моноаминоксидазой. Деметилирует моно- и диметилированный H3K4me. Для эффективного деметилирования KDM1A требуются вспомогательные компоненты. Эта деметилаза работает в составе двух мультибелковых комплексов: CoREST (состоящий из RCOR1, HDAC1, HDAC2, ZNF217, PHF21A и HMG20B) - комплекс репрессии транскрипции, NuRD (ZMYM2, ZMYM3, GSE1 и GTF2I, CTBP1, HMG20A, HSPA1A, PHF21B, RCOR3, RREB1, Mi-2, MLL) (Maiques-Diaz, Somervaille, 2016). В целом играет роль репрессора транскрипции.

Эта деметилаза относится к семейству флавиновых моноаминоксидаз. Состоит из 790 а.к. Содержит два домена – SWIRM (SWI3, RSC8 and MOIRA) и моноаминоксидазный. Домен SWIRM (170-255 а.к.) представляет собой альфа-спираль.

Необходим для белок-белковых взаимодействий. Моноаминоксидазный домен (364-755 а.к.) окисляет моноамины (оксидоредуктаза, дезаминирующая моноамины) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=XP_016769858.1).

Ген *Kdm1A* (*Lsd1A*) (GenBank Gene ID: 726469) медоносной пчелы локализован на хромосоме LG10 (GenBank NC_007079, 101635 п.н.). С этого гена транскрибируется единственная мРНК (GenBank XM_016914369, 2981 п.н.), транслирующаяся в один белок SETD1 (GenBank XP_016769858, 790 а.к.). Согласно BLAST, гистоновая деметилаза KDM1A медоносной пчелы *A. mellifera* на 65% идентична KDM1A у *H. sapiens*, для *D. melanogaster* не описана.

2.3. Долговременная память и эпигенетическая регуляция экспрессии генов

2.3.1 Молекулярно-генетические и физиологические основы обучения и памяти

Память - это способность организмов, восприняв внешнее воздействие, сохранять и воспроизводить изменения функционального состояния, вызываемые этими воздействиями. Формирование памяти сопровождается структурно-функциональными изменениями в нервной системе, которые сохраняются в течение некоторого времени и влияют на характер протекания будущих рефлекторных реакций, а совокупность этих изменений называют следом памяти, или энграммой (Батуев, 2002).

Обычно в качестве основного изменения при формировании памяти рассматривают морфологическую (перестройка цитоскелета, изменение количества рецепторов, увеличение количества синапсов и дендритных шипиков) и функциональную (облегчение передачи информации через синапс) модификацию синаптических связей (рис. 5, 6).

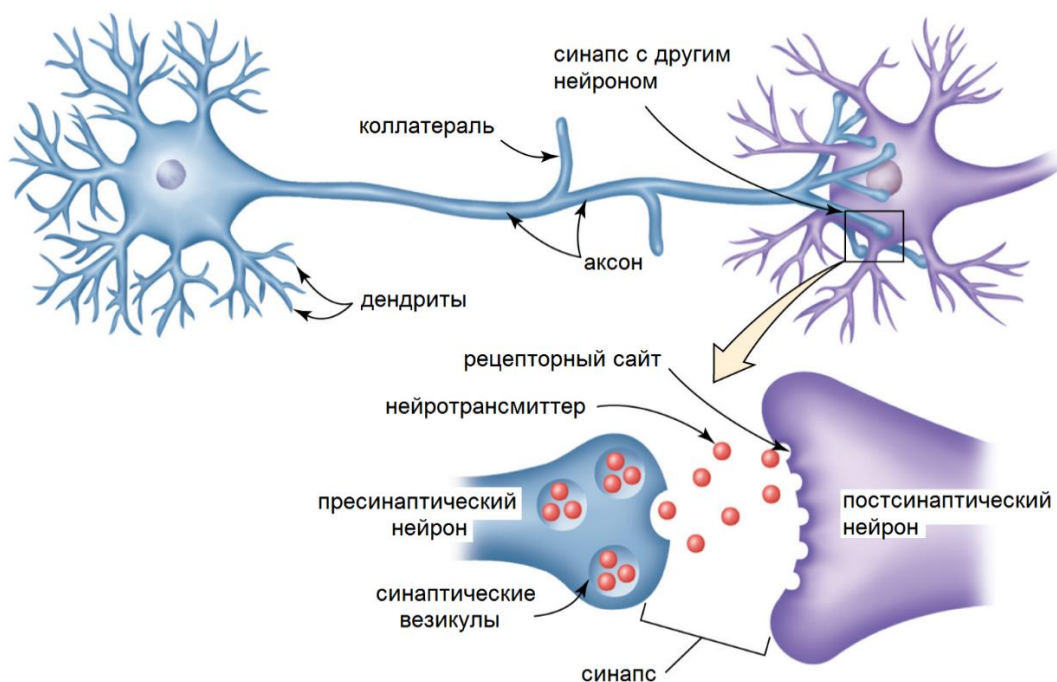


Рисунок 5. Схема синапса.

По времени существования различают 2 типа памяти: кратковременную и долговременную. Кратковременная память неустойчива, существует минуты. Долговременная память стабильна, информация в ней хранится и хранится часами, неделями, месяцами. Основой кратковременной памяти являются электрофизиологические процессы, связанные с многократным прохождением нервных импульсов по замкнутому нейронному контуру. Это приводит к стойким изменениям, закладывающим основу для формирования долговременной памяти. Формирование долговременной памяти кроме электрофизиологических явлений требует активации генома и синтеза макромолекул – нуклеиновых кислот и белков (Батуев, 2002).

У позвоночных и беспозвоночных (аплизия, виноградная улитка, дрозофила, пчела, мышь, человек) продемонстрирована общность нейромедиаторных, сигналинговых, биоэлектрических и молекулярных механизмов, лежащих в основе процессов обучения и памяти (Guan et al., 2002).

У медоносной пчелы кратковременная память образуется уже после 1 сеанса обучения и длится около 15 мин. Кратковременная память замещается в долговременной примерно через 1 час. При этом окончательное формирование долговременной памяти занимает не менее 7 часов (Menzel, 2001; 2012).

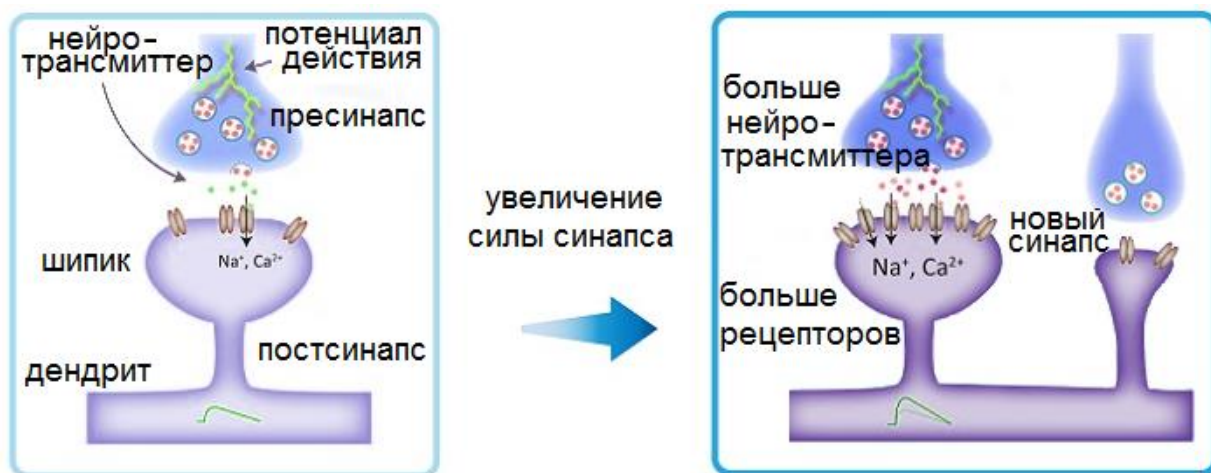


Рисунок 6. Синаптическая пластичность – основа долговременной памяти.

Совместное одновременное действие безусловного и условного стимулов при ассоциативном обучении приводит к стойкой активации нейронов с последующим запуском экспрессии генов. Сначала запускается экспрессия генов раннего ответа, продукты которых (преимущественно транскрипционные факторы) в дальнейшем активируют экспрессию генов позднего ответа (Guan et al., 2002). Продуктами генов позднего ответа являются самые различные нейрональные белки (рецепторы, каналы, ферменты, белки цитоскелета, транскрипционные факторы и др.). Благодаря этим белкам происходит фиксация синаптических изменений (Корочкин, Михайлов, 2000).

У медоносной пчелы первая волна транскрипции начинается через 10-15 минут после обучения и длится около 1 часа. Вторая волна транскрипции возникает через 3 часа и длится около 5 часов (рис.7).

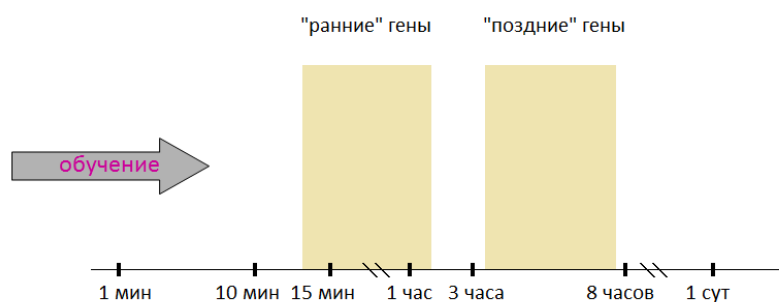


Рисунок 7. Две волны транскрипции при формировании памяти у медоносной пчелы (по Lefer et al., 2012).

В нервной системе экспрессия генов регулируется сложнейшими многокомпонентными каскадами, которые опосредуют действие разнообразных внешних стимулов.

Недавно выяснилось, что активации транскрипционных факторов недостаточно для индукции экспрессии генов. Был обнаружен дополнительный уровень регуляции экспрессии генов, связанный с модификациями и ремоделированием хроматина.

2.3.2. Роль эпигенетических модификаций при формировании памяти

Известно, что все клетки организма содержат одинаковую ДНК, однако нейрон существенно отличается от клеток других типов. Дифференциальная экспрессия генов обеспечивается транскрипционным аппаратом, транскрипционными факторами и хроматином, который обеспечивает не только упаковку ДНК, но и избирательное извлечение из нее генетической информации. Эпигенетическое маркирование генома (адресное метилирование ДНК и посттрансляционные модификации гистонов) многоклеточных животных связано с дифференцировкой.

С другой стороны, через эпигенетические механизмы обеспечивается взаимодействие клетки с внешней средой, благодаря чему клетки адаптируются к изменяющимся условиям. Все известные на данный момент модификации коррелируют с активирующей или репрессирующей транскрипцию генов функцией и могут регулировать функциональный статус генома на основе совместного действия. В экспериментах по изучению механизмов эпигенетической регуляции транскрипции и сайленсинга в процессах обучения и памяти были использованы мутантные модели животных, а также ингибиторы специфических энзимов, ответственных за присоединение или удаление исследуемых химических групп (Гринкевич, 2012).

На основании консервативности молекулярно-клеточных механизмов работы нервной системы у позвоночных и беспозвоночных животных, была высказана идея, о том, что эпигенетическая регуляция дифференциальной экспрессии генов, лежит в основе обучения и памяти, и присуща представителям обеих таксономических групп (Sando et al., 2012).

Участие метилирования ДНК в консолидации памяти было установлено относительно недавно. Формирование долговременной памяти у грызунов в модели условно-рефлекторного страха сопровождалось увеличением экспрессии метилаз DNMT3a и DNMT3b в CA1 поле гиппокампа (Miller et al., 2007). Эксперименты на мышах с двойным нокаутом генов *dnmt1* и *dnmt3a*, показали, что дефицит метилтрансфераз DNMT1 и DNMT3a в нейронах вызывает нарушения синаптической пластичности и формирования пространственной памяти (Feng et al., 2010). Роль метилирования ДНК и ДНК-метилтрансфераз в формировании памяти подробно рассмотрены в обзорах Morris, Monteggia (2014) и Bayraktar et al. (2018).

Сходные данные были получены в работе Biergans et al. (2017) на модели условного обонятельного пищевого рефлекса вытягивания хоботка у пчелы: метилтрансферазы DNMT1 и DNMT3 были вовлечены в формирование памяти.

Также было продемонстрировано участие метилирования гистонов в формировании памяти: через 1 час после выработки условного рефлекса замирания на обстановочный сигнал у мышей наблюдалось достоверное увеличение уровня H3K4me3 (маркер транскрипционно активного эухроматина) и H3K9me2 (маркер гетерохроматина) в нейронах гиппокампа. Через 24 часа уровень H3K4me3 возвращался к исходным значениям, а уровень H3K9me2 достоверно снижался (Gupta et al., 2010).

Ацетилирование гистонов протекает по остаткам лизинов гистонового хвоста. Повышение количества ацетилированных гистонов усиливает транскрипцию, снижение – ослабляет. Участие ацетилирования гистонов в формировании памяти было изучено на модели синдрома Рубинштейна-Тойби, одним из симптомов которого является умственная отсталость. Причина этого синдрома – гаплонедостаточность CREB-связывающего белка (CBP), обладающего ацетилтрансферазной активностью. У гаплонедостаточных и гетерозиготных по гену *cbp* мышей дефицит белка CBP оказывает ингибирующее влияние на формирование долговременной памяти распознавания и памяти в модели условно-рефлекторного страха, а также является причиной изменений синаптической пластичности (Alarcon et al., 2004).

Сходные результаты были получены при исследовании мышей с полностью выключенной НАТ активностью (CBP (НАТ)) (Korzus et al., 2008). Левенсоном с соавторами были получены экспериментальные данные, свидетельствующие об участии ацетилирования гистона H3 в формировании долговременной памяти (Levenson et al., 2004) через 1 час после выработки реакции условного замирания у мышей в нейронах поля CA1 гиппокампа повышался уровень ацетилирования гистона H3 по лизину 14, через 24 часа уровень – снижался до исходных значений. Также было показано, что для удаления ацетильных групп необходим специфическая деацетилаза HDAC2, ее ингибирование приводит к консолидации долговременной памяти, а сверхэкспрессия, наоборот, к нарушениям памяти (Wood et al., 2006). Также было обнаружено, что формирование условно-рефлекторного страха сопровождается повышением уровня ацетилирования гистона H4 в промоторе и экзонах I и IV гена *bdnf* в нейронах префронтальной коры у мышей (Bredy et al., 2006).

Ацетилирование гистонов в командных нейронах париетального ганглия изучено у виноградной улитки в модели условного рефлекса пищевой аверзии (Шевченко и др., 2009; Воробьева, Гринкевич, 2014). Показано роль ацетилирования гистонов при

реконсолидация памяти у краба *Chasmagnatus* (Federman et al., 2012). У медоносной пчелы блокирование процесса ацетилирования гистонов приводило к ухудшению долговременной памяти в модели условного пищевого рефлекса вытягивания хоботка (Merschbaecher et al., 2012).

С процессом ацетилирования гистонов связан и процесс фосфорилирования гистонов, также ведущий к транскрипционной активации. В работах (Chwang et al., 2006; Lubin et al., 2007) было показано, что формирование памяти в модели условно-рефлекторного страха у крыс сопровождается повышением уровня фосфорилирования и фосфоацетилирования гистона H3 в нейронах гиппокампа.

Сходные изменения были показаны при обучении в нейронах церебрального ганглия виноградной улитки (Шевченко и др., 2009) и в нейронах каликсов грибовидных тел у медоносной пчелы (Швецов и др., 2013).

Суммарное ди-триметилирование гистона H3 по лизину 4 было изучено в работе Швецова с соавторами (2013): эксперименты показали, что формирование долговременной памяти (условный пищевой рефлекс вытягивания хоботка) сопровождается повышением уровня метилирования гистона H3 лизину 4 в нейронах каликсов грибовидных тел (внутренние клетки Кеньона) через 1 и 24 часа после обучения.

2.4. Условный пищевой обонятельный рефлекс вытягивания хоботка – модель для изучения памяти медоносной пчелы

Морфологические основы (структуры мозга и определенные нейроны) обучения и памяти *Apis mellifera* подробно исследованы Мензелем с коллегами (Menzel, 2009) на примере пищевого рефлекса вытягивания хоботка: голодная пчела прикасается антеннами или передними лапками к раствору сахарозы, что вызывает безусловно-рефлекторную реакцию – вытягивание хоботка, после чего пчела слизывает сироп. При предъявлении исходно индифферентного запаха непосредственно перед пищевым подкреплением (раствор сахарозы) образуется ассоциация, которая сохраняется в памяти и в дальнейшем вытягивание хоботка может быть вызвано запахом.

В состав головного мозга пчелы входят надглоточный и подглоточный ганглии, состоящий из нейропиля (отростки нервных клеток) и тел нейронов. В надглоточном ганглии выделяют три отдела: протоцеребрум (зрительные доли, грибовидные тела, центральный комплекс и протоцеребральный мост), дейтоцеребрум (антеннальные (обонятельные, или ольфакторные доли) и тритоцеребрум (иннервирует ротовые части) (Свидерский, Плотникова, 2004). Безусловный сигнал передается на октопаминэргический нейрон VUMmx1, который отвечает на вкусовое раздражение от антенн и хоботка,

вызванное пищевым подкреплением (раствором сахарозы). Дендриты нейрона VUMmx1 отходят симметрично в мозг и сходятся с обонятельными путями в антеннальных долях, в губе грибовидных тел (особой ассоциативной обонятельной области) и латеральном роге (область выхода обработанного сигнала). Обонятельные сигналы поступают от антенн через антеннальные доли (Рис. 8).

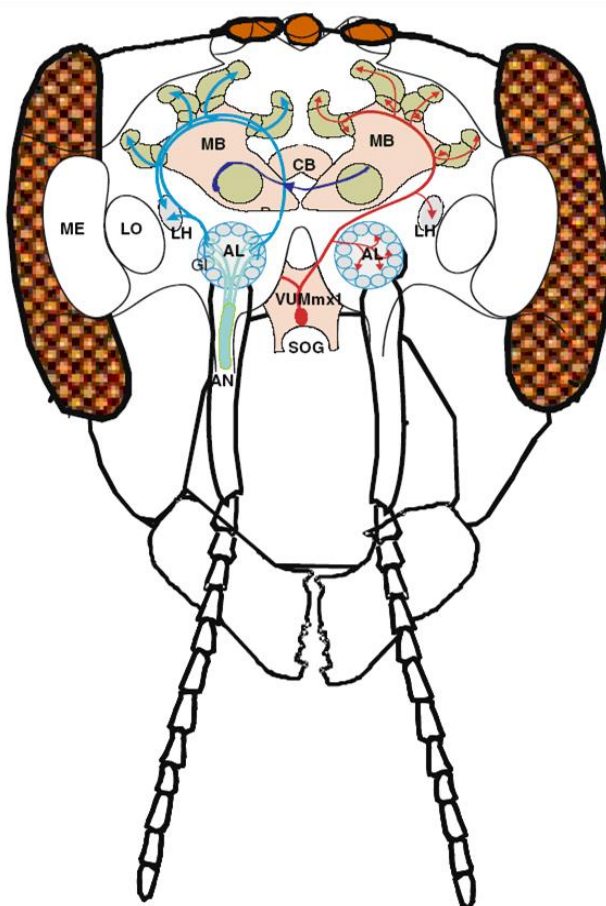


Рисунок 8. Схема мозга пчелы (по Giurfa, 2007). MB - грибовидные тела, CB – центральное тело, LO – лобула, ME – медулла, LH – латеральный рог, AL - антеннальные доли, AN – антеннальный нерв, SOG – подглоточный ганглий, VUMmx1 - неспаренный октопаминэргический нейрон подглоточного ганглия. Красным стрелками показан путь прохождения безусловного пищевого сигнала от нейрона VUMmx1. Синими стрелками показаны пути прохождения условного обонятельного сигнала.

Грибовидные, или стебельчатые, тела – это сложные парные структуры головного мозга насекомых. Они располагаются в центральной части надглоточного ганглия (в передней части протоцеребрума) и развиты в разной степени у насекомых разных отрядов.

Грибовидные тела отвечают за высшие интегративные функции мозга насекомых – память и способность к обучению (Свидерский, 1980).

В грибовидных телах выделяют расширенную верхнюю часть – каликс (чашечку), который сужается в педункулюс (ножку, или стебелек). Нижняя часть калликса образует α - и β -доли. Тела клеток Кеньона (интернейронов) расположены внутри калликса, а их дендриты формируют нейропил грибовидных тел. У медоносной пчелы число клеток Кеньона достигает 170000. Основные синаптические контакты дендритов клеток Кеньона с терминалями аксонов, приходящих в грибовидные тела из других областей ЦНС и участвующих в образовании нейропиля, осуществляются именно в области калликсов. В составе калликса можно выделить три нейропиля – губу, воротничок и базальное кольцо.

Установлено, что грибовидные тела являются местом формирования и хранения различных видов памяти. Исследования мутантов дрозофилы показали, что для долговременной памяти требуется вертикальные доли грибовидных тел, а для кратковременной – фронтальные доли (Свидерский, Плотникова, 2004).

В экспериментах Воскресенской (Воскресенская, 1957) у медоносных пчел вырабатывали условные рефлексы на обонятельные или зрительные стимулы. Важно отметить, что степень и локализация повреждений грибовидных тел вызывали полную или частичную утрату ранее выработанных условных рефлексов. Сильнее всего нарушало память двустороннее разрушение грибовидных тел, что приводило к полной утрате выработанных ранее условных связей. Таким образом было впервые показано, что грибовидные тела необходимы для выработки и сохранения условных рефлексов (Свидерский, Плотникова, 2004).

Отметим, что грибовидные тела и клетки Кеньона являются удобными объектами для электрофизиологических, биохимических и молекулярно-биологических экспериментов по исследованию механизмов памяти у насекомых.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

3.1. Материал

Объектом исследований служила медоносная пчела краинской расы *Apis mellifera* (отряд перепончатокрылые Hymenoptera). В опытах использовали имаго пчел в возрасте 10-20 суток.

Пчел разводили на пасеке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Для получения одновозрастных пчел из ульев брали рамку с расплодом «на выходе» и помещали в теплицу с постоянной температурой (36°C). Вылупившихся в течение одного дня пчел метили (на брюшко дорсально наносили мазок краской, разные дни выхода отмечали разными цветами). Далее вышедших из ячеек пчел помещали в наблюдательный улей.

Условия содержания: пчел содержали в наблюдательном улье, составляющем по величине $\frac{1}{4}$ часть нормального улья. На сотовую рамку, снабженную небольшим количеством меда, белковым кормом – пергой, открытым и закрытым расплодом и плодной маткой, помещали исследуемых рабочих пчел одного возраста. В улье поддерживали постоянную температуру (36°C). Источник пищи – кормушка с 50% сахарным сиропом на удлиненной прилетной доске наблюдательного улья (на расстоянии 50 см от летка). Поддерживали 12 часовой световой-темновой цикл.

3.2 Методы

3.2.1. Метод выработки пищевого условного рефлекса

За 3 часа до эксперимента пчел лишали пищи, изолируя их от семьи для достижения стабильного безусловнорефлекторного фона. Далее пчел подвергали холодовому наркозу (3-5 минут на льду).



Рисунок 9. Процедура холодового наркоза.

Обездвиженных пчел помещали в металлический патрон, фиксируя полиэтиленовой пленкой. Эксперименты начинали через 20 минут после холодового наркоза.



Рисунок 10. Фиксация пчел.

Вырабатывали условный обонятельный пищевой рефлекс вытягивания хоботка (Лопатина, Чеснокова, 1992). Условным стимулом в данном эксперименте являлся запах гвоздики (исходно индифферентный для пчел), безусловным – пищевое подкрепление ароматизированным сиропом, который состоял из 50% раствора сахарозы (сироп) в соотношении с дистиллированной водой 1:1 и содержал в себе 3 сушеных бутона гвоздики. К антеннам каждой пчелы подносили пипетку с каплей ароматизированного сиропа. Через 5 секунд прикасались к антеннам каплей ароматизированного сиропа (на антеннах у насекомых находятся обонятельные и вкусовые рецепторы (Свидерский, 1980).

В норме, получив сигнал о наличии пищи, пчела вытягивает хоботок, после чего дается пищевое подкрепление ароматизированным сиропом (5 секунд). Сеансы обучения повторяли три раза с интервалом 6 минут. Спустя 1 час тестировали сохранение условного рефлекса в памяти: к антеннам пчелы подносили (не прикасаясь) пипетку с ароматизированной дистиллированной водой. Запомнившая ассоциацию запаха с пищевым подкреплением пчела в ответ вытягивает хоботок. В норме примерно 80% пчел успешно сохраняют данный условный рефлекс в памяти (Лопатина, Чеснокова, 1992). Временные интервалы для тестирования сохранения условной реакции были выбраны профессором Лопатиной Н.Г. на основании работ Мензеля (Menzel, 1999).

До процедуры обучения оценивали сенсорную возбудимость (по числу пчел, ответивших спонтанной реакцией – вытягиванием хоботка по направлению к еще неподкрепленному запаху) и пищевую возбудимость (по числу пчел, ответивших безусловно-рефлекторной реакцией – вытягиванием хоботка в ответ на соприкосновение хеморецепторов антенн с 50% раствором сахарозы). Пчел, ответивших спонтанной или безусловно-рефлекторной реакцией, удаляли из эксперимента.

В эксперименте исследовали 2 группы пчел: опытную (обученные пчелы) и контрольную (необученные пчелы). Пчелам контрольной группы на протяжении всего эксперимента предъявляли неароматизированный сироп. В обеих группах было по 32 пчелы.

После завершения поведенческого эксперимента пчел обеих групп использовали в иммуногистохимическом окрашивании.

3.2.2. Иммуногистохимический метод.

Приготовление парафиновых срезов.

Пчел подвергали холодовому наркозу. Затем вскрывали головную капсулу и извлекали мозг. Далее мозг фиксировали в забуференном (PBS) растворе параформальдегида (4%) 3 часа. После фиксации препарат промывали в PBS (pH=7,5) в течение 1 часа. Проводили через серию спиртов (по 30 минут в каждом из спиртов) возрастающей концентрации (40°-70°-96°). Промывали препарат в абсолютном спирте 2 раза по 15 минут. Переносили препарат в метилбензоат и оставляли на ночь при комнатной температуре. Переносили препарат в смесь метилбензоата и парафина (50:50) и инкубировали в течение 1 часа при 65°С. Парафинизировали препарат (2 раза по 1 часу) при 65°С. Переносили препарат в заранее подготовленные заполненные горячим парафином ванночки из фольги, охлаждали при комнатной температуре. Готовые парафиновые блоки хранили до нарезки. Приготовление парафиновых срезов осуществляли по стандартной методике на желатинизированном стекле. Толщина срезов - 7 мкм.

Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга.

Депарафинизацию срезов проводили в ксилоле (2 раза по 15 минут) и в спиртах с убывающей концентрацией (100°-96°-70°-40° по 10 минут). Депарафинизированные срезы промывали дистиллированной водой. Производили демаскировку антигенов в течение 10 минут в 0,03 М цитратном буфере (pH=6,0) в микроволновой печи (450W). Промывали дистиллированной водой. Инкубировали препараты с 0,3% раствором перекиси водорода в течение 30 минут. Промывали дистиллированной водой. Производили блокировку срезов в нормальной блокировочной сыворотке (Normal blocking serum, набор Vectastain ABC Quick kit, Vector) в течение 1 часа при 25°С во влажной камере. Инкубировали срезы с первичными антителами (к моно-, ди-, триметилированному лизину 4 гистона H3, Abcam), разведение 1:300, во влажной камере в течение ночи при +4°С. Промывали буфером PBT (PBS + 0,1% Triton). Инкубировали срезы с вторичными антителами, конъюгированными с биотином (набор Vectastain ABC Quick kit, Vector), 1 час при 37°С во влажной камере. Промывали PBS. Инкубировали срезы со стрептавидин-биотиновым

комплексом (набор Vectastain ABC Quick kit, Vector) 1 час при 37°C во влажной камере. Промывали PBS. Окрашивали диаминобензидином (DAB). Промывали PBS. Обезвоживали в спиртах (40°-70°-96° по 10 минут). Заключали препараты в монтировочную среду Витрогель (Биовитрум). Полученные постоянные препараты анализировали с помощью световой микроскопии (микроскоп Микромед 2) и установки, содержащей цифровую CCD-камеру и компьютер с программой ImageJ (NCBI). Оценивали процент окрашенных нейронов в каликсах грибовидных тел, данные помещали в таблицы Excel.

Анализ проводили по 6-8 срезам мозга. Общее число клеток на каждый вариант составляло не менее 17000.

3.2.3. Статистическая обработка

Выборки (число нейронов) проверяли на гомогенность методом χ^2 и нормальность (тест Шапиро-Уилка). Распределения в изученных выборках клеток отличались от нормальных, в связи с этим для сравнения использовали непараметрический критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Статистические расчеты проводили в программе Prism5.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. ОТ-ПЦР. Изучали экспрессию генов гистоновых метил трансферазы *Setd1* и деметилазы *Kdm1a*. В качестве внутреннего контроля (референсные гены с постоянной экспрессией) использовали гены *Arp1* (актин) и *Rp49* (рибосомный белок).

Результаты (электрофореграммы) проведенных ОТ-ПЦР представлены ниже (рис. 9-11).

У пчел контрольной группы «УРР-» (несформированная условно-рефлекторная реакция), отсутствовал фрагмент гена *Setd1* при наличии фрагментов (1 положительная проба из 5) референсного гена *Arp1*. В пробах в группе со сформированной условно-рефлекторной реакцией «УРР+» фрагмент гена *Setd1* присутствовал в 5 пробе из 8. Анализ не позволил выявить достоверных различий по экспрессии гена *Setd1* из-за малого объема выборки, но предварительно можно отметить, что в выборке из пчел с условно-рефлекторной реакцией *Setd1*-специфический фрагмент выявляется в 3, 75 раза чаще, чем у пчел без условно-рефлекторной реакции. Это согласуется с более интенсивной окраской правого медиального калликса, иммуногистохимически окрашенного на H3K4me1.

Эти данные также хорошо согласуются с результатами работы Швецова с соавторами (2013), которые показали, что через 1 час после обучения происходит повышение уровня суммарного ди-триметилирования гистона H3 по лизину 4.

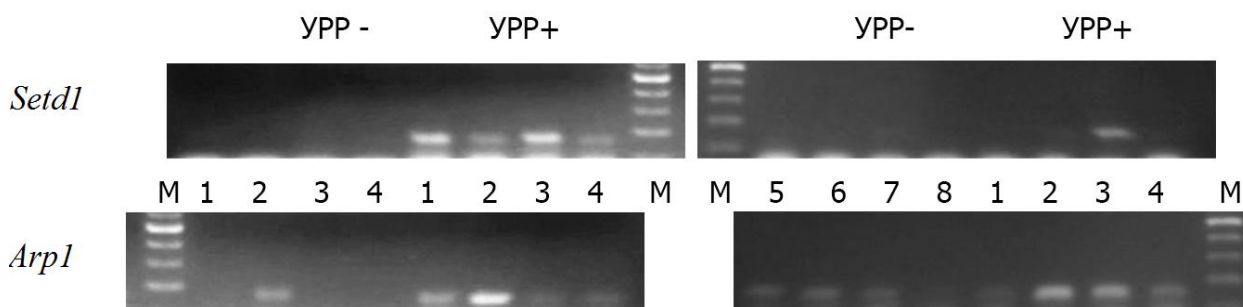


Рисунок 9. Электрофореграмма фрагментов, полученных в результате ОТ-ПЦР. В верхней части представлены фрагменты, соответствующие *Setd1* и *Arp1*. М – маркер, каждый фрагмент – 100 пар нуклеотидов.

Полученные в ходе предварительного анализа данные (по 8 проб, 16 пчел в каждой группе) свидетельствуют в пользу того, что гистоновая метилтрансфераза SETD1 вовлечена в изменение метилирования гистона H3 при обучении и формировании памяти (Рисунок 10).

В случае с геном *Kdm1a* при наличии фрагментов референсного гена *Rp49* во всех пробах, деметилаза *Kdm1a* экспрессируется и в контроле (6 проб из 8), и в опыте (7 проб из 8).

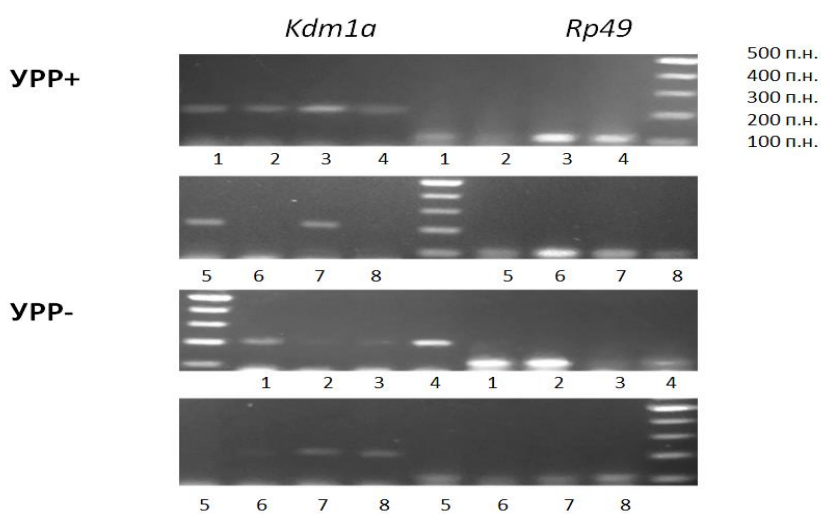


Рисунок 10. Электрофореграмма фрагментов, полученных в результате ОТ-ПЦР. В верхней части представлены фрагменты, соответствующие *Kdm1a* и *Rp49*. М – маркер, каждый фрагмент – 100 пар нуклеотидов (п.н.).

Таким образом, не получено данных в пользу участия этого фермента в формировании памяти у пчелы. В то же время у мышей показано участие этой гистоновой деметилазы в формировании памяти (Neelamegam et al., 2012). Для выявления активности гена *Kdm1a* у пчелы требуется применение более точных методов, например, проведения ПЦР в реальном времени.

2. Иммуногистохимическое окрашивание

Для выявления момнометилированного гистона H3 в ядрах нейронов латеральных и медиальных каликсов грибовидных тел мозга медоносной пчелы проводили иммуногистохимическое окрашивание с соответствующими антителами (Рисунок 12).

Анализировали долю окрашенных (иммунопозитивных) нейронов в правом латеральном и медиальном каликсах грибовидных тел в группах «УРР+» «УРР-» (таблица 3). Для этого подсчитывали число окрашенных и общее число нейронов в каликсах.

Было проанализировано не менее 4000 клеток на особь, соответственно, 108000 на группу. Проверяли выборки на однородность критерием χ -квадрат. Результаты 13 особей (из 115), нарушающих гомогенность данных основной выборки удалили.

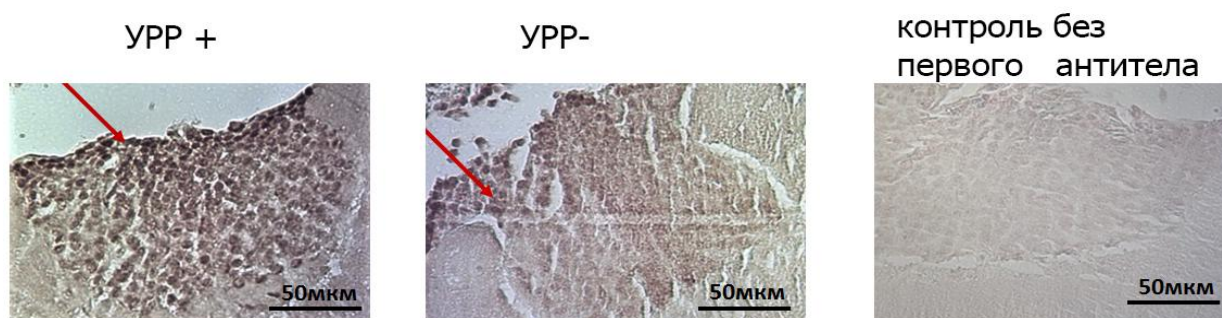


Рисунок 11. Срезы правого латерального каликса мозга медоносной пчелы. Иммуногистохимическое окрашивание на НЗК4me1 нейронов пчел с выработанной условно-рефлекторной реакцией («УРР+») и без нее («УРР-»). Иммунопозитивные нейроны отмечены красной стрелкой.

В настоящее время продолжается подсчет нейронов в каликсах левой гемисферы мозга.

Показано, что через час после обучения достоверно увеличивается доля клеток с повышенным содержанием НЗК4me1 в правом медиальном каликсе пчел с выработанным условным рефлексом (УРР+).

Таблица 3. Частота встречаемости клеток, иммунопозитивных к НЗК4me1, в правых медиальных и латеральных каликсах ($M \pm SD$).

| Вариант | Структура | Число особей | $M \pm SD$ |
|---------|---------------------------|--------------|-------------------|
| УРР- | Правый латеральный каликс | 29 | $0,41 \pm 0,060$ |
| | Правый медиальный каликс | 30 | $0,33 \pm 0,0020$ |
| УРР+ | Правый латеральный каликс | 29 | $0,40 \pm 0,053$ |
| | Правый медиальный каликс | 27 | $0,40 \pm 0,0054$ |

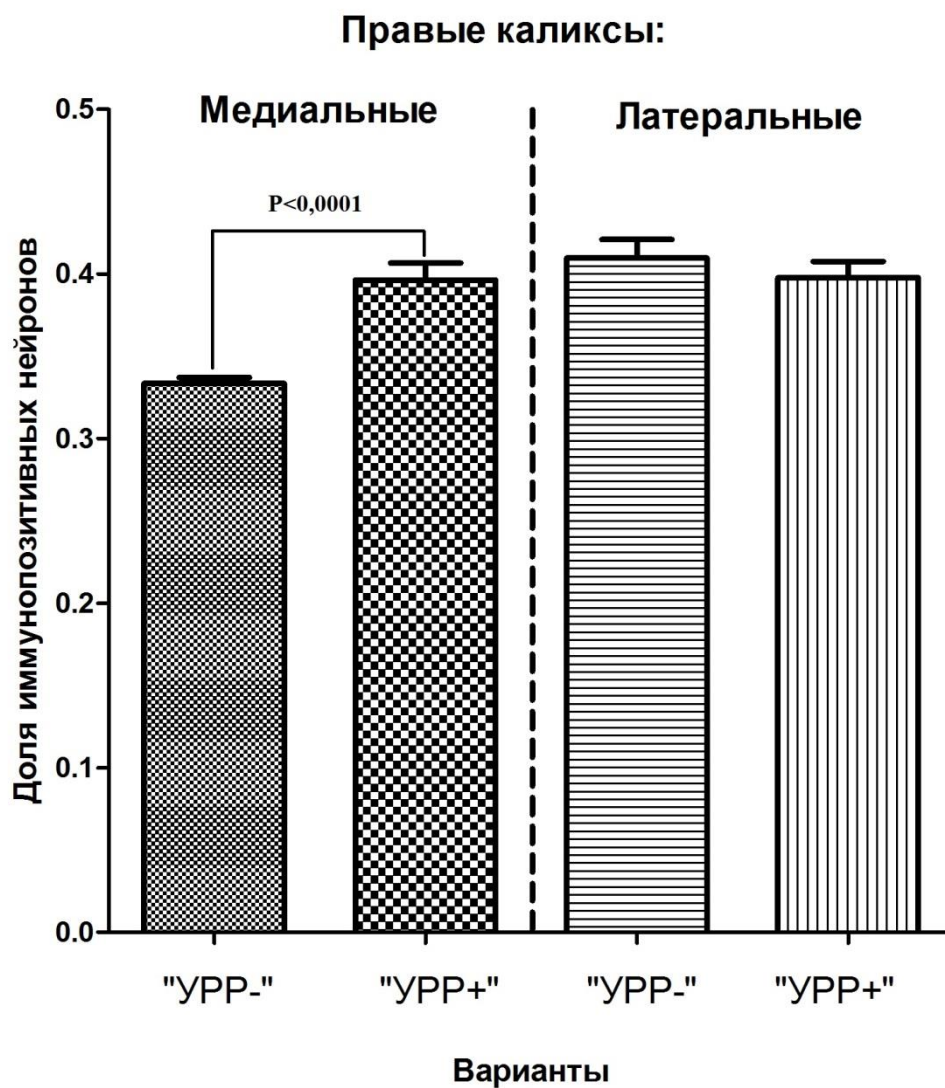


Рисунок 12. Доля иммунопозитивных нейронов в правых каликсах мозга пчелы.

По данным литературы у пчелы наблюдается функциональная асимметрия мозга, и именно в правой гемисфере наблюдается повышение ди-триметилирования гистона H3 по 4 лизину через 1 час после обучения (Швецов и др., 2012).

Таким образом, в данной работе получены предварительные данные указывающие на вовлечение H3K4me1 и гистоновой метилтрансферазы SETD1 в формировании памяти у медоносной пчелы *Apis mellifera*.

5. ВЫВОДЫ

1. Условно-рефлекторная реакция у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. связана с экспрессией гена *Setd1*. Для гена деметилазы *Kdm1a* такая связь не обнаружена.
2. В формировании условного рефлекса у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. задействованы нейроны медиального каликса грибовидных тел, в которых отмечено повышение уровня монометилированного гистона H3 по лизину 4.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аппель Б. (2013). Нуклеиновые кислоты: от А до Я. 413.
2. Батуев А.С. (2002). Высшая нервная деятельность. 416.
3. Воробьева О.В. (2014). Индукция ацетилирования и ингибированием гистонметилаз реверсирует формирование долговременной памяти у плохо обучающихся животных с дисфункцией серотонинергических нейронов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 18(2), 345.
4. Воскресенская А.К. (1957). О роли грибовидных тел надглоточного ганглия в условных рефлексах медоносной пчелы. 964-967.
5. Гринкевич Л.Н. (2012). Эпигенетика и формирование долговременной памяти. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 98(5). 553-574.
6. Гринкевич Л.Н. (2012). Исследование метилирования гистона H3 при формировании долговременной памяти. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 98(9). 1111-1118.
7. Гринкевич Л. Н., Воробьева О. В. (2014) Роль модуляторного медиатора серотонина в индукции эпигенетических процессов при формировании долговременной памяти у *Helix*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 18(2), 298.
8. Корочкин Л.И., Михайлов А.Т. (2000). Введение в нейрогенетику. 274.
9. Разин, С. В., Быстрицкий А.А. (2013). Хроматин: упакованный геном. 172.
10. Лопатина Н.Г., Чеснокова Е. Г. (1992). Условные рефлексы и память у медоносной пчелы. *Ж. ВНД*, 42(5), 890-903.
11. Лопатина Н.Г., Рыжова И.В., Зачепило Т.Г., Смирнов В.Б., Чеснокова Е.Г. (2004). L-глутамат в формировании долговременной памяти медоносной пчелы *Apis mellifera*. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, 40(6), 539-545.
12. Свидерский В.Л. (1980). Основы нейрофизиологии насекомых. 280.
13. Свидерский В.Л. (2004). О структурно-функциональной организации грибовидных тел стрекоз и некоторые общие соображения о назначении этих образований. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, 40(6), 495-507.
14. Шевченко К.Г., Данилова А.Б., Гринкевич Л.Н. (2009). Посттрансляционная модификация гистона H3 при консолидации и реконсолидации памяти у моллюска *Helix*. *Вестник ВОГиС*, 13(4), 35.
15. Швецов А.В., Зачепило Т.Г., Вайдо А.И., Швецов А.В., Камышев Н.Г., Лопатина Н.Г. (2013). Об эпигенетической регуляции процесса формирования

- долговременной памяти. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, 49(2), 97-104.
16. Abel T., Zukin R.S. (2008). Epigenetic targets of HAD C inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 8(1), 57–64.
 17. Alarcon J.M., Malleret G., Touzani K., Vronskaya S., Ishii S., Kandel E.R., Barco A., Alarcon J.M. (2004). Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP +/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Physiol. Rev.*, 42(6), 947–959.
 18. Bannister A.J., Schneider R., Kouzarides T. (2010). Histone methylation: dynamic or static? *Nat. Rev. Cancer.*, 10 (7), 457-469.
 19. Bartova E., Krejci J., Harnicarova A. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *Histochem. Cytochem.*, 56(8), 711-21.
 20. Bernstein B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J. 3rd, Gingeras, T.R. et al. (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, 120, 169–181.
 21. Biergans S.D., Claudianos C., Reinhard J., Galizia C.G. (2017). DNA methylation mediates neural processing after odor learning in the honeybee. *Nature*, 27(7). 43-635.
 22. Bird A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209-213.
 23. Bourc'his D., Bestor T.H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96-99.
 24. Bredy T. W., Wu H., Crego C., Zellhoefer J., Sun Y. E., Barad M. (2007). Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn. Mem.*, 14, 268-276.
 25. Bayraktar G., Kreutz M.R. (2018). Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression? *Neuroscientist*, 24(2), 171-185.
 26. Butler J.S., Dent S.Y. (2013). The role of chromatin modifiers in normal and malignant hematopoiesis. *Blood.*, 121(16), 3076-3084.
 27. Calo E., Wysocka J. (2013). Modification of enhancer chromatin: what, how and why? *Mol Cell*. 7(49(5)). 1-24.
 28. Korzus E., Rosenfeld M. G., Mayford M. (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron.*, 42, 961-972.

29. Danilova A.B., Kharchenko, K.G. Shevchenko O.A., Grinkevich L.N. (2010). Histone H3 acetylation is asymmetrically induced upon learning in identified neurons of the food aversion network in the mollusk *Helix lucorum*. *Front. Behav. Neurosci.*, 4(180), 1–7.
30. Di Lorenzo A., Bedford M.T. (2011). Histone arginine methylation. *FEBS Lett*, 585(13), 2024-2031.
31. Ernst P., Vako C.R. (2012). WRAD: enabler of the SET1-family of H3K4 methyltransferases. *Brief Funct Genomics.*, 11(3), 217-226.
32. Feng J., Zhou Y., Campbell S.L., Le T., Li E., Sweatt J.D., Silva A.J., Fan G. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat. Neurosci.*, 13, 423-430.
33. Flanagan J.F., Mi L.Z., Chruszcz M., Cymborowski M., Clines K.L., Kim Y., Minor W., Rastinejad F., Khorasanizadeh S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*, 438(7071), 1181-1185.
34. Goll M.G., Kirpekar E., Maggert K.A., Yoder J.A., Hsieh C.L., Zhang X., Golic K.G., Jacobsen S.E., and Bestor T.H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311, 395- 398.
35. Chen F., Mottino G., Shin V.Y., Frank J.S. (1997). *J. Mol. Cell Cardiol*, 29, 2621-2629.
36. Guan Z., Giustetto M., Lomvardas S., Kim J.H., Miniaci M.C., Schwartz J.H., Thanos D., Kandel E.R. (2002). Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell*, 111(4), 483 – 493.
37. Gupta J., Haggarty S. J., Giacometti E. (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic. *Nature*, 111(4), 483–493.
38. Henry K.W., Wyce A., Lo W.S., Duggan L.J., Emre N.C., Kao C.F., Pillus L., Shilatifard A., Osley M.A., and Berger S.L. (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.*, 17, 2648-2663.
39. Honda B.M., Dixon G.H., Candido E.P. (1975). Sites of in vivo histone methylation in developing trout testis. *J. Biol. Chem.*, 250, 8681–8685.
40. Ishii K.J., Akira S. (2005). TLR ignores methylated RNA? *Immunity.*, 23, 111-113.
41. Jeddloh J.A., Stokes L., Richards E.J. (1999). Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat. Genet.*, (22), 94-97
42. Jenuwein T., Allis C.D. (2001). Translating the histone code. *Science.*, 293, 1074-1080.

43. Jones P.L., Veenstra G.J., Wade P.A., Vermaak D., Kass S.U., Landsberger N., Strouboulis J., and Wolffe A.P., (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.*, 19, 187-191.
44. Kao C.F., Hillyer C., Tsukuda T., Henry K., Berger S., and Osley M.A. (2004). Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes Dev.*, 18, 184-195.
45. Kandel E. (2012). The molecular biology of memory: CAMP, PKA, CRE, CREB – 2, and CREB. *Mol. Brain.*, 5(14), 1 – 2.
46. Klose R.J., Zhang Y. (2007) Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8 (4), 307–318.
47. Lee M.G., Wynder C., Cooch N., and Shiekhhattar R. (2005). An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylations. *Nature.*, 437, 432-435.
48. Lefer D., Perisse E., Hourcade B., Sandoz J., Devaud J.M. (2012). Two waves of transcription are required for long-term memory in the honeybee. *Learn Mem.*, 20(1), 29-33.
49. Levenson J. M., O’Riordan K. J., Brown K. D., Trinh M. A., Molfese D. L., Sweatt J. D. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J. Biol.Chem.*, 279(40), 545-559.
50. Li H., Ilin S., Wang W., Duncan E.M., Wysocka J., Allis C.D., and Patel D.J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature.*, 442, 91-95.
51. Lyko F. (2001) DNA methylation learns to fly. *Trends Genet.*, 17, 169- 172.
52. Martin C., Zhang Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(11), 838-849.
53. Maiques-Diaz A., Somervaille T. (2016). LSD1: biologic roles and therapeutic targeting. *Epigenomics*, 8(8), 356.
54. Menzel R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *J. Comp. Physiol.*, 185, 323-340.
55. Menzel R. (2001). Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem.*, 8(2), 53-62.
56. Menzel R. (2012). The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nat Rev Neurosci.*, 13(11), 758-68.
57. Merschbaecher K., Jakob H., Mueller U. (2012). Acetylation-Mediated Suppression of Transcription-Independent Memory: Bidirectional Modulation of Memory by Acetylation. *PLoS One.*, 7(9), 123-156.

58. Miller C.A., Sweatt J.D. (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron.*, 53, 857-869.
59. Mizzen C.A., and Allis, C.D. / *Cell Mol. Life Sci.* – – № 54. – P. 6-20.
60. Morris M.J., Monteggia L.M. (1998). Role of DNA methylation and the DNA methyltransferases in learning and memory. *Dialogues Clin. Neurosci.*, 16(3), 359-371.
61. R. Neelamegam, E. L. Ricq, M. Malvaez, D. Patnaik, S. Norton, S M. Carlin, I. T. Hill, M. A. Wood, S. J. Haggarty, J M. Hooker. (2012). Brain-Penetrant LSD1 Inhibitors Can Block Memory Consolidation. *ACS Chem Neurosci.* 3(2). 120–128.
62. Nishioka K., Chuikov S., Sarma K., Erdjument-Bromage H., Allis C.D., Tempst P., Reinberg D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.*, 16(4), 479-89.
63. Ng H.H., Robert F., Young R.A., Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol. Cell*, 11, 709–719.
64. Petersen-Mahrt S. (2005). DNA deamination in immunity. *Immunol. Rev.*, 203, 80-97.
65. Pokholok D.K., Harbison C.T., Levine S., Cole M., Hannett N.M., Lee T.I., Bell G.W., Walker K., Rolfe P.A., Herbolsheimer E., et al. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, 122, 517-527.
66. Ruthenburg A.J. Allis, C.D., Wysocka, J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol. Cell*, 25, 15-30.
67. Sando R., Goukko S. Pieraut L. Liao et.al. (2012). HDAC4 governs a transcriptional program essential for synaptic plasticity and memory. *Cell*, 151(4), 821 – 834.
68. Santos-Rosa H., Schneider R., Bannister A. J., Sherriff J., Bernstein B.E., Emre N.C., Schreiber S.L., Mellor J., Kouzarides T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419. 407-411.
69. Shen E., Shulha H., Weng Z, Akbarian S. (2014). Regulation of histone H3K4 methylation in brain development and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369(1652). 213-514.
70. Schneider R., Bannister A.J., Myers F.A., Thorne A.W., Crane-Robinson C., Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell Biol.*, 6, 77.
71. Sims R.J., Chen C.F., Santos-Rosa H., Kouzarides T., Patel S.S., Reinberg D. (2006). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J. Biol. Chem.*, 51, 41789-41792.

72. Strahl B. D., Alis C. D. (2000). The language of covalent histone modification. *Nature*, 403(6765), 41 – 45.
73. Sweatt J., Strahl D. B., Alis C. D. (2000). The language of covalent histone modification. *Nature*, 403(6765), 41 – 45.
74. Wysocka J., Allis C.D., Coonrod S. (2006). Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front. Biosci.*, 11, 344-355.
75. Wolffe A.P., Hayes J.J. (1994). Chromatin disruption and modification. *Nucl. Acids Res.*, 27, 711-720.
76. Wood M. A., Hawk.D., Abel T., Wood M.A. (2006). Combinatorial chromatin modification and memory storage: A code for memory. *Learn. Mem.*, 13, 241 – 244.
77. Yan Q., Huang J., Fan T., Zhu H., and Muegge K. (2003). Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation. *EMBO J.*, 22, 5154-5162.
78. Yu B., Yang Z., Li J., Minakhina S., Yang M., Padgett R.W., Steward R., Chen X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307, 932-935.
79. Zhang Y., Reinberg D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.*, 15, 2343-2360.