

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ И ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. И.П. ПАВЛОВА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК

Научный доклад по результатам проведенного научного исследования на тему:

Роль гена *limk1* в обучении и забывании у *Drosophila melanogaster*

Аспиранта *Заломаевой Екатерины Сергеевны*

Направление 06.06.01 Биологические науки

Профиль 1.5.7 Генетика

Научный руководитель:

Главный научный сотрудник, д.б.н.

Никитина Екатерина Александровна

Санкт-Петербург

2022

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	3
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	7
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	11
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	22
ВЫВОДЫ.....	23
АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.....	24
НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	25
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	29
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	30

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время одной из актуальных проблем современной биологии и медицины является понимание этиологии и прогрессирования различных нейродегенеративных заболеваний (НДЗ). Это группа в основном медленно прогрессирующих заболеваний нервной системы. Наиболее уязвимы в отношении НДЗ люди пожилого возраста (60+). Согласно статистическому бюллетеню о численности населения Российской Федерации по полу и возрасту на 1 января 2022 года, граждан возраста 60 лет и старше насчитывается около 33,5 млн человек, что составляет 23% от общего числа жителей страны в 145,5 млн. На территории Российской Федерации расположено множество лечебных учреждений, оказывающих помощь пациентам с различными формами нейродегенераций. Обилие таких пациентов увеличивает нагрузку на сферу здравоохранения страны, а также на её бюджет.

Среди наиболее распространенных НДЗ выделяют болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и др. Данные заболевания могут являться результатом сложного взаимодействия неблагоприятных внешних факторов (например, стрессорные воздействия), а также индивидуальных особенностей генома, предрасполагающих к развитию болезни. Среди диагностических признаков НДЗ выделяют три основных: нарушения памяти, моторную дисфункцию и образование белковых агрегатов. Примечательно то, что при разных заболеваниях симптомы выражены по-разному (так, например, локомоторные нарушения выражены больше при болезни Паркинсона, когнитивные – при болезни Альцгеймера). Человек, страдающий от такого рода заболеваний, зачастую становится беспомощным, а, в некоторых случаях, даже опасным для самого себя. На сегодняшний день не существует лекарств и методов лечения, которые бы смогли остановить развитие патологии. Даже поддержание пациента на поздних стадиях

заболевания в ясном состоянии сознания представляется практически невозможным. Поэтому современная наука стремится к решению вопроса о причинах возникновения и прогрессирования данных заболеваний с тем, чтобы в перспективе излечивать их еще на ранних стадиях или предупреждать их возникновение.

НДЗ относятся к многофакторным болезням, так же, как и делеционно-дупликационные синдромы, часть которых сопровождается когнитивными нарушениями, как, например, синдром Уильямса. К нему приводит гемизиготность по гену *limk1* (Савватеева-Попова и др., 2015). Ген *limk1* кодирует нерецепторную серин-треониновую протеинкиназу, ключевой фермент ремоделирования актина. LIMK1 играет важную роль в обеспечении такого важного свойства нервной системы, как пластичность. Высокую степень пластичности нервной системы обеспечивает реорганизация актинового цитоскелета. Актиновый цитоскелет состоит из F-актиновых филаментов, которые могут связываться вместе или объединяться в разветвленную и сшитую сеть. Ключевым регулятором динамики актина является кофилин. При низких концентрациях кофилин способствует разборке F-актина путем увеличения диссоциации до мономерного G-актина. Инактивация кофилина способствует снижению обучения и вызывает тяжелые поведенческие аномалии. LIMK1 способствует инактивации кофилина при долговременной потенциации. Следовательно, нарушение синтеза LIMK1 изменяет активность кофилина, изменяет морфологию и плотность шипиков, нарушая синаптическую пластичность. Именно поэтому столь актуальным стало изучение нарушений в сигнальном каскаде ремоделирования актина, приводящих к когнитивным нарушениям, дефектности структур мозга и цитоплазматическим отложениям. Таким образом, изучение роли LIMK1 в процессах обучения и формирования памяти играет важную актуальную роль (Ковалева, 2019).

Кроме того, в последние годы актуальным стало стремление понять, какую роль в становлении и сохранении памяти играет активное забывание

(Medina, 2018). Согласно мнению Дэвиса и Жонга, забывание регулируется каскадом ремоделирования актина, ключевой фермент - LIMK1. Независимо от филогенетического уровня организма наблюдается консервативный в эволюции феномен: приобретение информации, или обучение, имеет своей противоположностью забывание. Поэтому врожденное забывание может быть «вызываемым по умолчанию» состоянием мозга, которое постоянно приводит к «стиранию памяти» — состоянием, конкурирующим с процессами консолидации памяти (Davis, Zhong, 2017). Но поскольку сохранение памяти является результатом обоих процессов — обучения и забывания — возникает конфликт традиционных и новых представлений: как понять, что является причиной «когнитивной патологии» — дефект обучения и консолидации или же дефектность активного врожденного механизма забывания. Для скрининга и тестирования таких средств модуляции активности сигнальных путей с трансляцией применительно к человеку требуется создание и валидация животных моделей (Zamboni et al., 2018). Данное исследование предполагает использование дрозофилы в качестве нейрокогнитивной патологии, зависимой от экспрессии гена *limk1*, ключевого фермента ремоделирования актина (Savvateeva-Popova et al., 2017).

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы – изучение влияния нейроспецифической активности гена *limk1* на активное забывание у самцов дрозофилы в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ).

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проанализировать формирование памяти в парадигме УРПУ у 5-суточных самцов линий дрозофилы дикого типа, полиморфных по гену *limk1* — *Canton-S*, *Oregon-R* и *Berlin*, а также у линии *agn^{ts3}* с дисфункцией *limk1*.
2. Изучить динамику краткосрочной и среднесрочной памяти в парадигме УРПУ у 5-суточных самцов вышеуказанных линий.

3. Исследовать формирование памяти в парадигме УРПУ у 5-суточных самцов линий Gal4-UAS с нейроспецифическим подавлением экспрессии гена *limk1*:

а) в нервной системе;

б) в дофаминергических и серотонинергических нейронах;

в) в холинергических нейронах;

г) в нейронах, отвечающих за половое поведение (*fruitless*).

4. Рассмотреть динамику краткосрочной и среднесрочной памяти в парадигме УРПУ у 5-суточных самцов вышеуказанных линий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования

В работе использовали следующие линии *Drosophilamelanogaster*:

Canton-S – линия дикого типа, несетоднонуклеотидный полиморфизм C/T (+12 п.н.) в участке связывания фактора транскрипции M1.

Berlin– линия дикого типа, характеризуется нарушениями связывания праймера в интроне 2 и вблизи интронов 3 и 4. Линия несетоднонуклеотидные полиморфизмы в N-концевой части гена (включая сайт связывания M1 и 1-ю часть интрона 1), некоторые из которых соответствуют полиморфизмам линии *Canton-S*.

Oregon-R – линия дикого типа, выделенная из естественной популяции штата Орегон, США. Несет множественные полиморфизмы в 1-м интроне, а также вставку 15 п.н. в экзоне 6, приводящую к появлению 5 аминокислот в C-концевой области белка.

agn^{ts3} – линия, несущая термочувствительную мутацию в локусе *agnostic*, влияющую на метаболизм цАМФ. Несет множественные полиморфизмы в 1-м интроне, а также вставку транспозона семейства Tc1/mariner длиной порядка 1700 п.н. за 3'-концевой областью гена в межгенном участке (+ 456 п.н. от конца транскрипции изоформ C и D).

Трансгенная линия 26294 - несет ген двухцепочечной РНК (dsRNA) для RNAi LIMK1 под контролем регуляторной последовательности UAS.

Трансгенная линия 36303 - является материнской линией по отношению к 26294: ген dsRNA для RNAi LIMK1 отсутствует.

Трансгенная линия 7009 с экспрессией гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах. Содержит активатор Gal4.

Трансгенная линия 6794 с экспрессией гена *limk1* в нервной системе. Содержит активатор Gal4.

Трансгенная линия 6793 с экспрессией гена *limk1* в холинергических нейронах. Содержит активатор Gal4.

Трансгенная линия 30027 с экспрессией гена *limk1* в нейронах, отвечающих за половое поведение (*fruitless*). Содержит активатор Gal4.

Трансгенные Gal4 и UAS линии дрозофилы получены из биобанка BloomingtonDrosophilaStockCenter (США).

Мух выращивали на стандартной изюмно-дрожжевой среде в стаканчиках объёмом 160мл. Развитие линий происходило при $+25 \pm 0,5$ °C, влажности 60% и свето-темновом цикле 12: 12 ч. Контроль трансгенных линий проводили по фенотипическим признакам: окраска глаз и тела, форма крыльев.

Методы исследования

Система скрещивания Gal4-UAS

Мух с бинарной системой Gal4-UAS получали путем скрещивания двух трансгенных линий. Линии, содержащие рекомбинантный ген транскрипционного активатора Gal4, скрещивали с линиями, имеющими регуляторную последовательность UAS. Когда происходит связывание Gal4 с UAS, запускается транскрипция трансгенного элемента, расположенного за UAS и кодирующей интерферирующую РНК. Тканеспецифичность интерференции обеспечивается постановкой гена активатора Gal4 под управление промоторами генов, экспрессирующихся конститутивно в нервной системе дрозофилы. Таким образом, были проведены следующие скрещивания:

1. 7009♀ x 26294♂ (подавление гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах);
2. 7009♀ x 36306♂ (контроль: без подавления *limk1*);
3. 6794♀ x 26294♂ (подавление гена *limk1* в нервной системе);
4. 6794♀ x 36306♂ (контроль: без подавления *limk1*);
5. 6793♀ x 26294♂ (подавление гена *limk1* в холинергических нейронах);
6. 6793♀ x 36306♂ (контроль: без подавления *limk1*);
7. 30027♀ x 26294♂ (подавление гена *limk1* в нейронах *fruitless*);

8. 30027♀ x 36306♂ (контроль: без подавления *limk1*).

Методика условно-рефлекторного подавления ухаживания

Для анализа процессов обучения и забывания у дрозофилы использовали методику, основанную на половом поведении самцов. Ухаживание самца дрозофилы представляет собой комплекс определенных действий, направленных на совершение оплодотворения самки: ориентация, преследование, вибрации крыла в покое и на бегу, попытка копуляции. Запуск элементов полового поведения осуществляется зрительным образом самки, а также испускаемыми ею феромонами. Феромоны могут как стимулировать ухаживание (афродизиаки), так и подавлять его (антиафродизиаки). Известно, что оплодотворенная и девственная самки отличаются по испускаемым феромонам. Так, антиафродизиаки способны вырабатывать только оплодотворенные самки, и высвобождают они его в ответ на ухаживание самца. Таким образом, при ухаживании самца за оплодотворенной самкой происходит сочетание двух безусловных стимулов – аттрактивного, имеющего в основе афродизиаки, стимулирующий ухаживание, и аверсивного, в основе которого лежит подавляющий ухаживание антиафродизиаки. В результате такого сочетания аттрактивный безусловный стимул становится аверсивным условным стимулом, что снижает его аттрактивные свойства. Таким образом, методика условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ) самца за оплодотворенной самкой, которую применяли в настоящем исследовании, основана на стимулах, естественных для дрозофилы (Siegel, 1979; Hall, 1994; Kamyshev et al. 1999).

Вылупившихся девственных насекомых исследуемых линий сортировали по полу без использования наркоза. Самцов, используемых в эксперименте, содержали индивидуально на изюмно-дрожжевой среде в стандартных условиях. Объектами ухаживания самцов всех исследуемых линий были оплодотворенные самки линии дикого типа *Canton-S* в возрасте пяти суток, что обеспечивало единообразие условий эксперимента. Обучение

и тестирование проводили в специальных экспериментальных камерах из оргстекла диаметром 15мм, высотой 5мм.

Для выработки УРПУ пятисуточного девственного самца исследуемой линии помещали в экспериментальную камеру вместе с оплодотворённой самкой *Canton-S* на 30 минут. Обученных самцов тестировали через разные интервалы времени. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения. За поведением самцов наблюдали в течение 300с, фиксируя при помощи специальной программы время начала и окончания отдельных элементов. Элементы могли быть связаны с ухаживанием (ориентация, преследование, вибрация, попытка копуляции), или не связаны с ним (активность, прининг, покой).

Для оценки эффективности обучения вычисляли индекс обучения (ИО) по следующей формуле:

$$\text{ИО} = \left[\frac{\text{ИУ}_\text{н} - \text{ИУ}_\text{т}}{\text{ИУ}_\text{н}} \right] \times 100\% = \left(1 - \frac{\text{ИУ}_\text{т}}{\text{ИУ}_\text{н}} \right) \times 100\%, \text{ где}$$

ИУ_н – средний индекс ухаживания для независимой выборки самцов, не имеющих опыта полового поведения;

ИУ_т - средний индекс ухаживания для независимой выборки обученных самцов, прошедших тренировку (Sokal, 1995; Камышев и др., 1999; Kamyshev et al., 1999).

Память характеризуется как абсолютным уровнем ИО, так и его динамикой на протяжении тестируемого периода времени. Для оценки активности процессов забывания провели анализ скорости снижения ИО на коротких временных интервалах (0, 15, 30, 60 минут после обучения) и спустя 24 часа, когда ИО может оставаться высоким при нарушении активного забывания. Таким образом, интенсивность процессов забывания определяется не абсолютными величинами ИО в каждый момент времени, а динамикой (скоростью) его изменения. В каждой группе тестировали не менее 20 пар мух. Для расшифровки и анализа данных использовали специально разработанные компьютерные программы (автор программ - Н.Г.

Камышев) Для статистической обработки данных использовали двусторонний тест рандомизации ($p < 0,05$).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования было выявлено, что, как показано на рисунке 1, у линии *Canton-S* показатели ИО достоверно не изменяются в течение часа после тренировки, ИО достоверно снижается в 2 раза ($p < 0,05$) только через сутки. Таким образом, забывание проявляется только через сутки после тренировки.

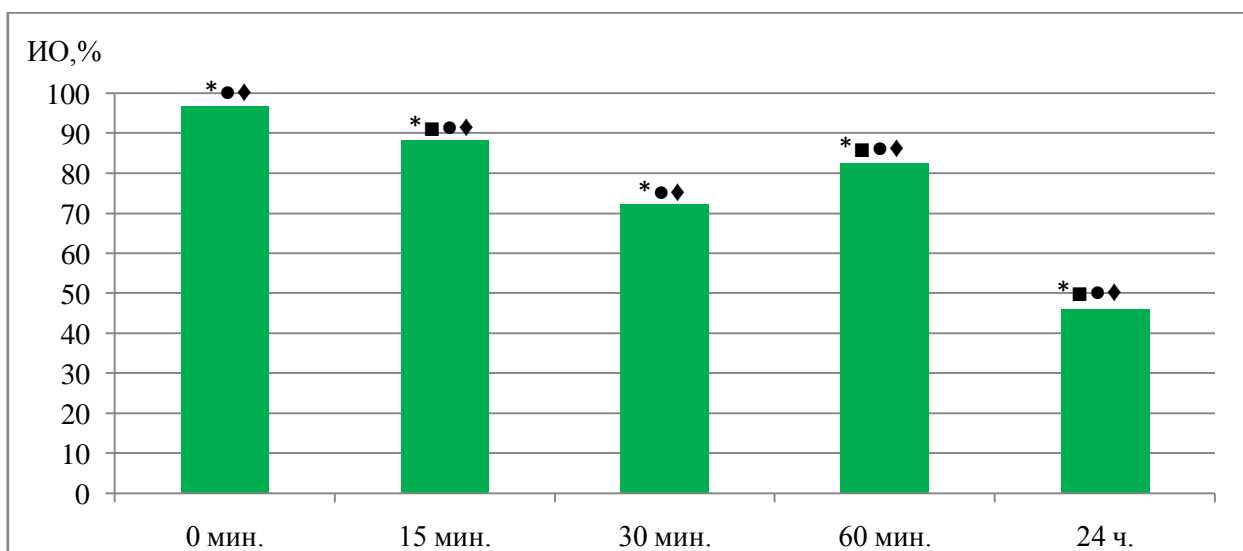


Рисунок 1 – ИО мух линии *Canton-S*.

Примечание:

- * - достоверно отличается от 0 ($p < 0,05$);
- - достоверно отличается от *Berlin* ($p < 0,05$);
- - достоверно отличается от *Oregon-R* ($p < 0,05$);
- ◆ - достоверно отличается от *agn^{ts3}* ($p < 0,05$).

Как показано на рисунке 2, у линии *Berlin* наблюдаются достаточно существенные отличия от *Canton-S* во временной динамике ИО: через 15 мин, 60 мин и 24 часа ИО в 2,5 – 2,6 раза ниже, чем у *Canton-S* ($p < 0,05$). Интересно, что у *Berlin* ранее были показаны нарушения долгосрочной памяти (Каминская и др., 2015). Возможно, именно интенсивность забывания является в данном случае причиной этого дефекта.

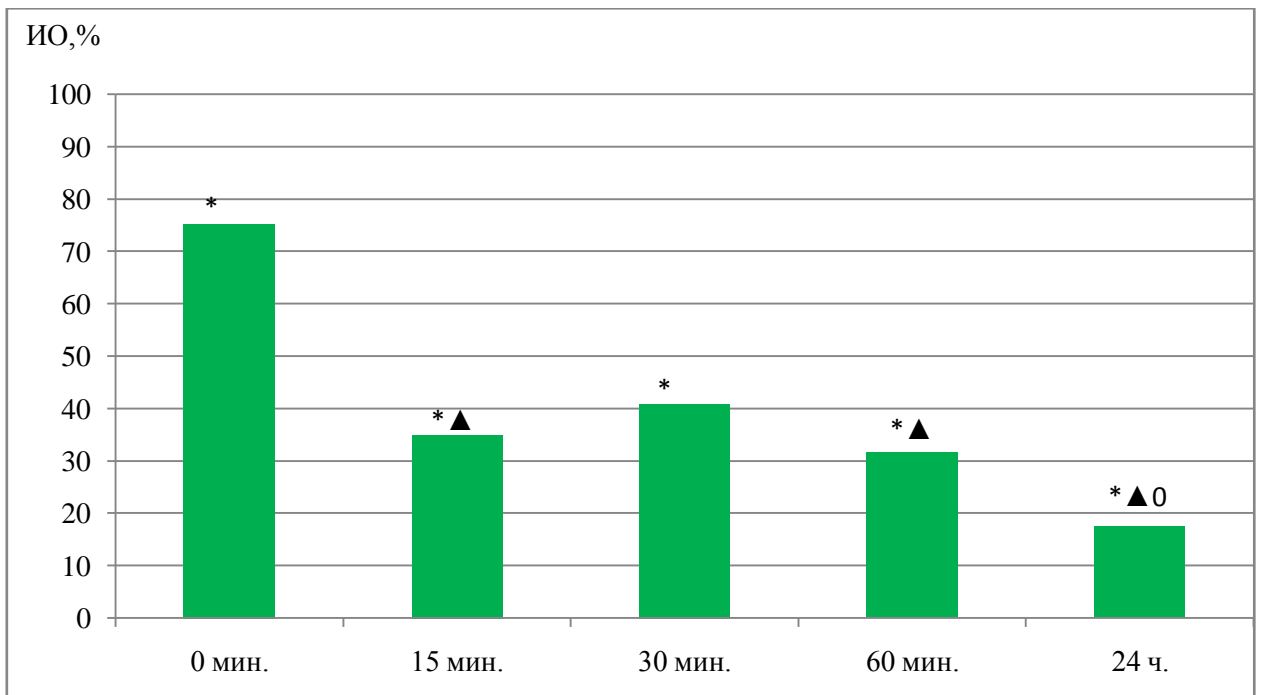


Рисунок 2 – ИО мух линии *Berlin*.

Примечание:

* - достоверно отличается от 0 ($p < 0,05$);

▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p < 0,05$);

0 - достоверно отличается от 0 минут ($p < 0,05$).

У *Oregon-R*, как показано ранее, нарушена краткосрочная и среднесрочная память, но долгосрочная соответствует уровню дикого типа (Каминская и др., 2015). Настоящие исследования показали, что, как видно из рисунка 3, *Oregon-R* по сравнению с *Canton-S* демонстрирует ярко выраженное уменьшение ИО: 4-кратное на интервале 0 мин, 7- и 8-кратное, соответственно, через 15 и 30 мин, 13-кратное через 60 мин и 46-кратное падение ИО через 24 часа после тренировки ($p < 0,05$).

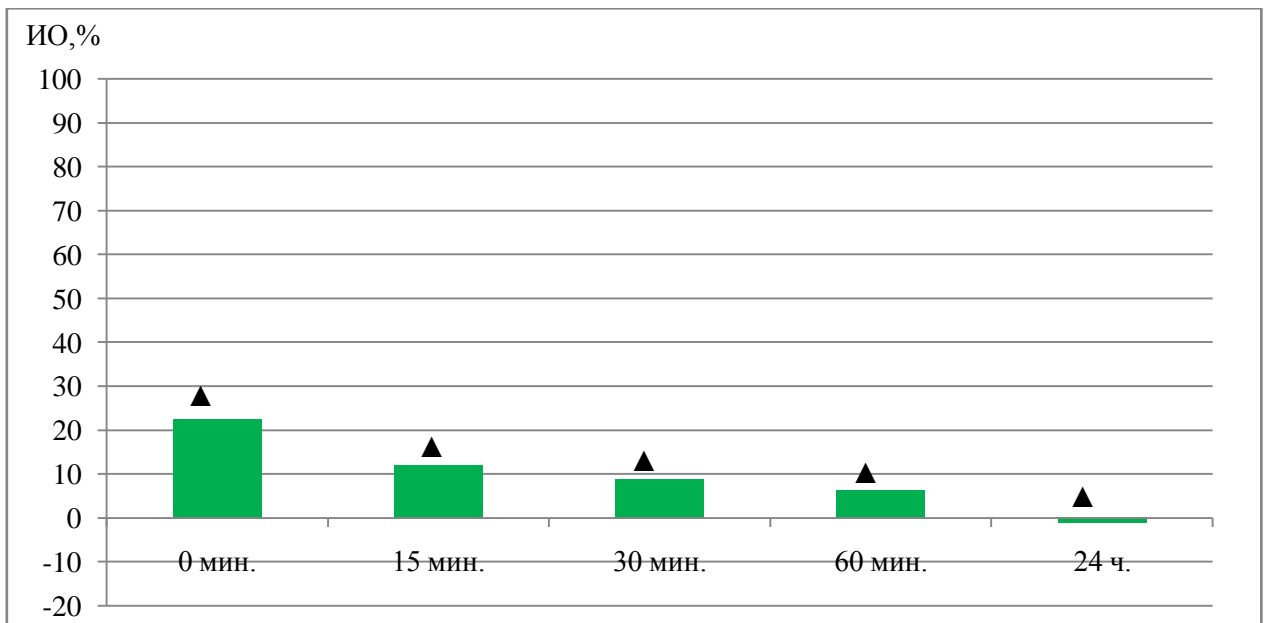


Рисунок 3 – ИО мух линии *Oregon-R*.

Примечание:

▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p < 0,05$).

Мутационное повреждение гена *limk1* у *agn^{ts3}* приводит к нарушению всех типов памяти, поэтому ИО у мух данной линии были также на низком уровне достоверно отличались от ИО на аналогичных точках линии *Canton-S* (рисунок 4).

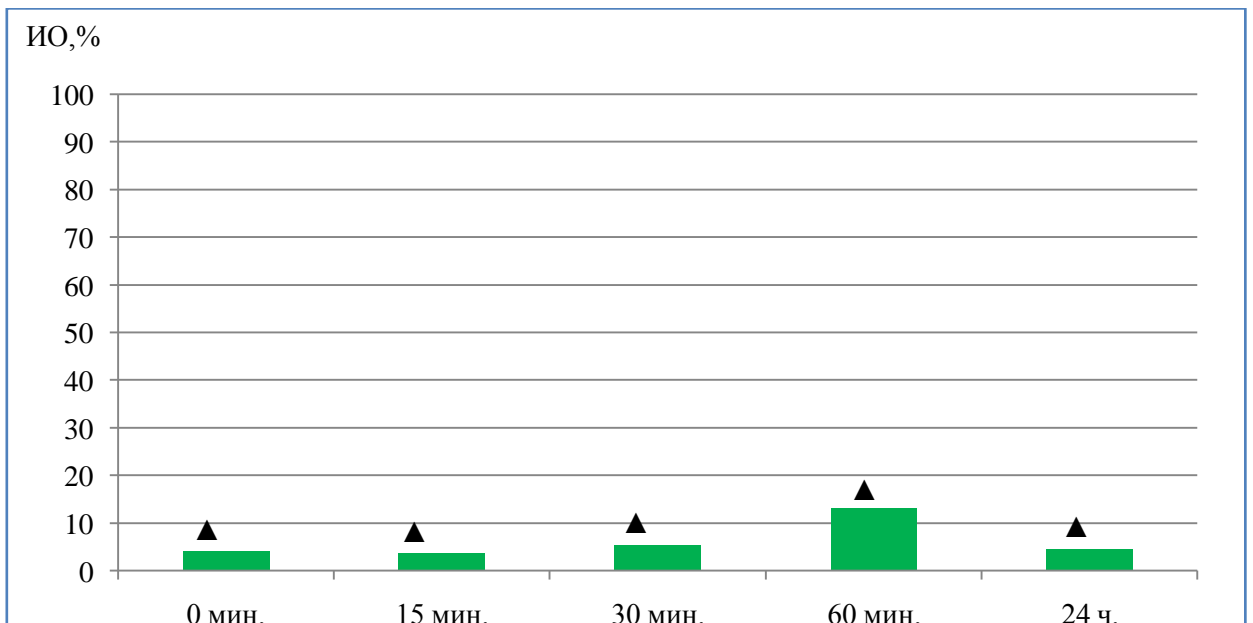


Рисунок 4 – ИО мух линии *agn^{ts3}*.

Примечание:

▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p < 0,05$).

Для оценки активности процессов забывания необходимо учитывать скорость снижения ИО на некотором временном интервале X после тренировки. Если у двух линий дрозофилы (1 и 2) ИО непосредственно после тренировки одинаковы, можно говорить о том, что обе линии обучаются одинаково хорошо. В данном случае это линии *Canton-S* и *Berlin* (рисунок 5). Если при этом кривая ИО для линии 1 на интервале X лежит ниже кривой ИО для линии 2, можно заключить, что угасание памяти у линии 1 происходит быстрее, т.е. процесс активного забывания выражен сильнее. В нашем случае кривая ИО *Berlin* лежит ниже, чем для *Canton-S*, начиная с 15 мин после обучения. У линий *Oregon-R* и *agn^{ts3}* динамика изменения ИО практически не выражена. Это связано с тем, что у мух обеих линий нарушены процессы формирования памяти: их изначальный ИО многократно ниже, чем у *Canton-S* (соответственно, в 4 и 23 раза, $p < 0,05$).

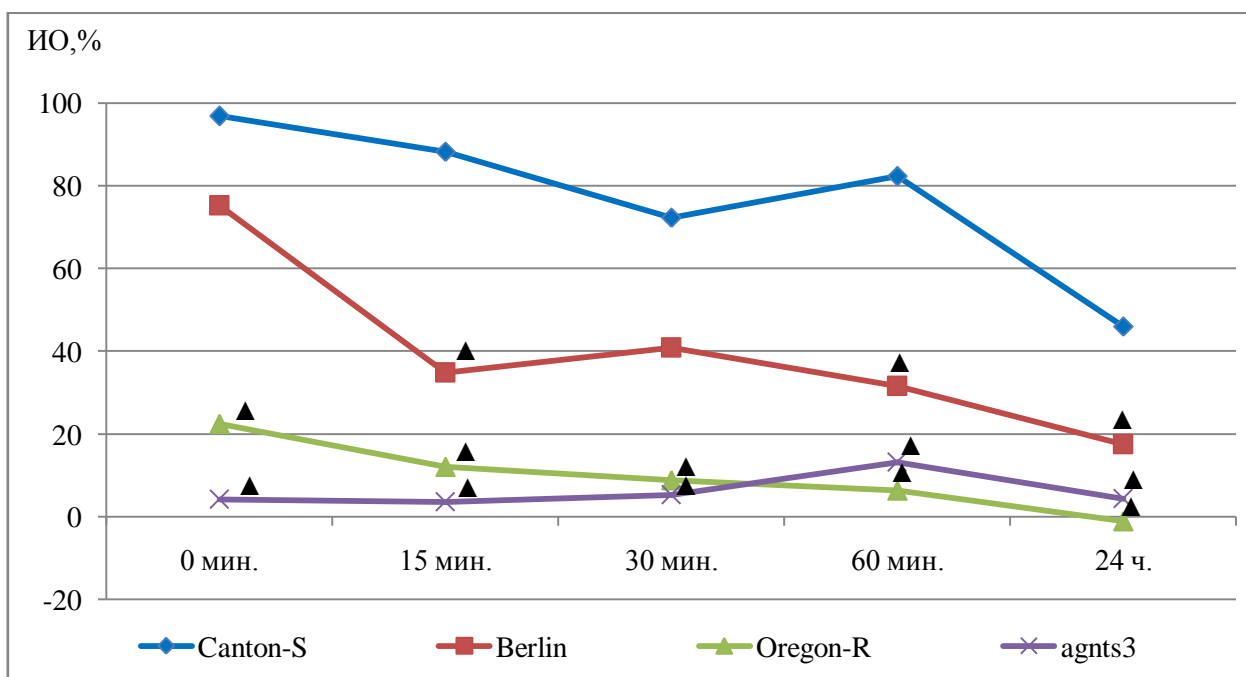


Рисунок 5 – Динамика изменения ИО мух линий *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R* и *agn^{ts3}*.

Примечание:

▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p < 0,05$).

Таким образом, показано влияние полиморфизма гена LIMK1 на процессы забывания. Это дает возможность использовать данную модель в целях скрининга и тестирования агентов фармакотерапии.

У линий с подавлением *limk1* в нервной системе и в контроле (без подавления) ИО на всем исследуемом временном интервале достоверно отличались от нуля (Рисунок 6). У линии с подавлением *limk1* ИО на интервале 0 - 15 мин достаточно высоки (порядка 70%), а у линии без подавления - 50%, при этом межлинейная разница недостоверна. Спустя 24 ч ИО у линий с подавлением *limk1* был достоверно ниже, чем сразу после тренировки ($p < 0,05$). Забывание было выражено в большей степени у линии с подавлением *limk1*, чем в контроле (Рисунок 7). Согласно исходной гипотезе, подавление активности LIMK1, наоборот, должно было снизить скорость забывания, способствуя сохранению памяти на длительном промежутке времени. Следует отметить, однако, что у мух данной линии подавление LIMK1 должно происходить либо в нейронах грибовидных тел (в основном нейронах αL и βL), где уровень LIMK1 исходно низкий, либо в клетках глии, для которых не было показано непосредственного участия в УРПУ. Спустя 24 ч после обучения ИО у обеих линий практически не отличаются. Таким образом, скорости забывания на основном интервале времени (30 мин - 24 ч) у них почти совпадают.

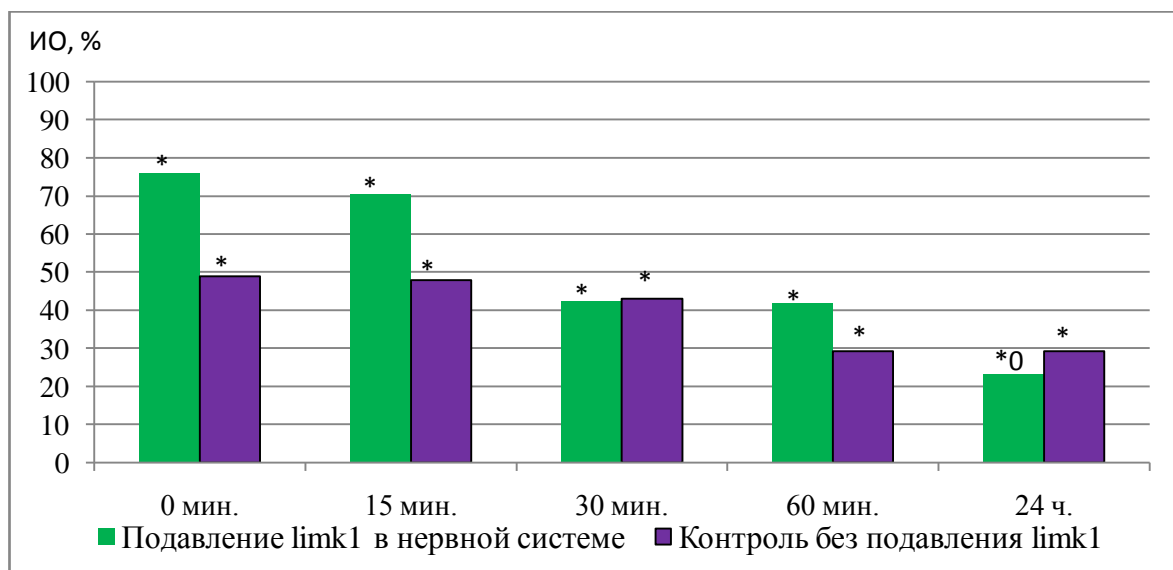


Рисунок 6 – ИО гибридов с подавлением *limk1* в нервной системе и без подавления.

Примечание:

- * - достоверно отличается от нуля ($p < 0,05$);
- 0 - достоверно отличается от 0 мин ($p < 0,05$).

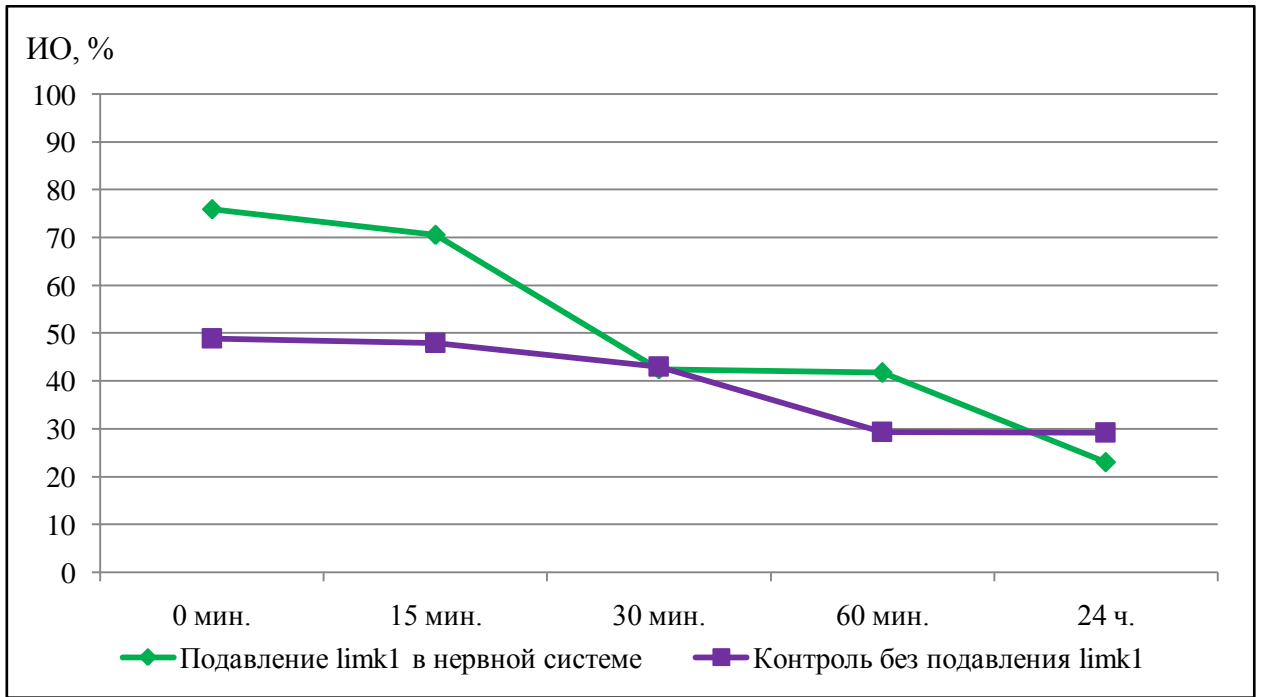


Рисунок 7 – Динамика изменения ИО мух с подавлением *limk1* в нервной системе и без подавления.

Примечания:

- – достоверно отличается от 0 минут ($p < 0,05$).

Как видно на рисунке 8, у линии с нейроспецифическим подавлением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах значения ИО были исходно низкие, достоверно не отличаясь от нуля, за исключением точки 30 мин. Через 24 ч после тренировки ИО оказался отрицательным и достоверно отличался от остальных точек. У контрольной линии ИО был выше нуля на интервале 0 - 30 мин, а спустя 24 ч также отрицателен. При этом наклоны кривых изменения ИО (т.е. скорости забывания) у обеих линий достаточно близки (Рисунок 9).

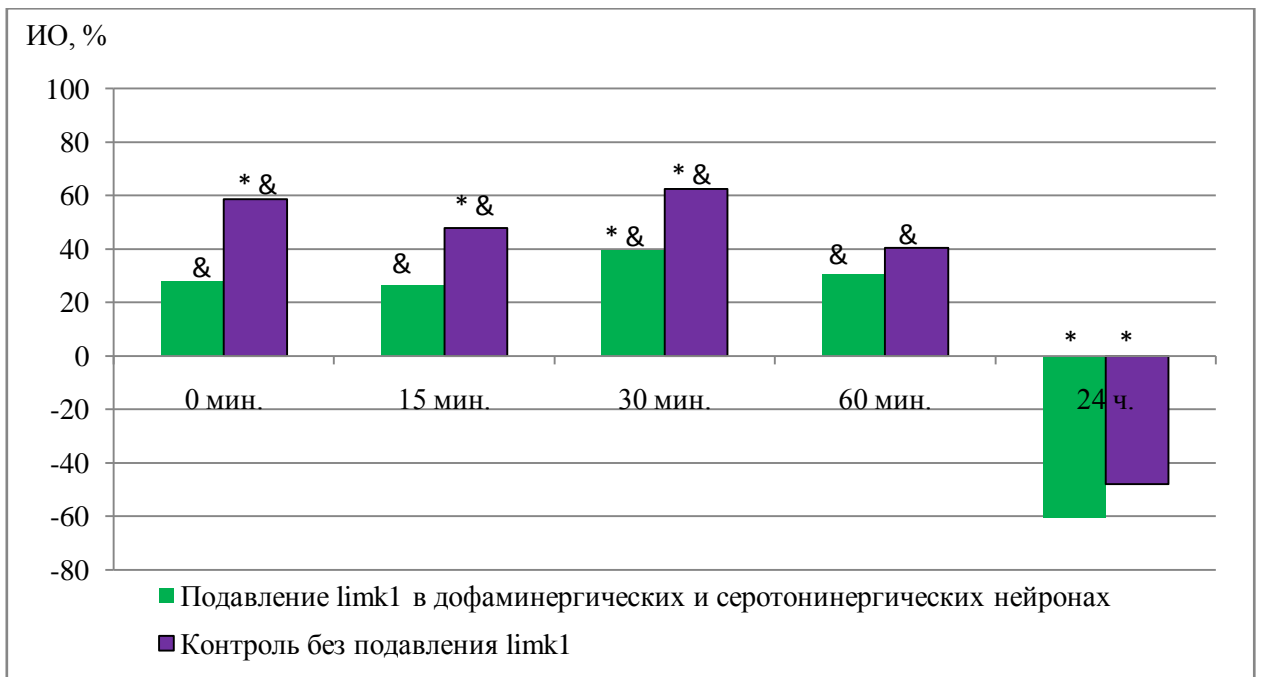


Рисунок 8 - ИО гибридов с подавлением *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах и без подавления.

Примечание:

* – достоверно отличается от 0 ($p < 0,05$);

& – достоверно отличается от 24ч ($p < 0,05$).

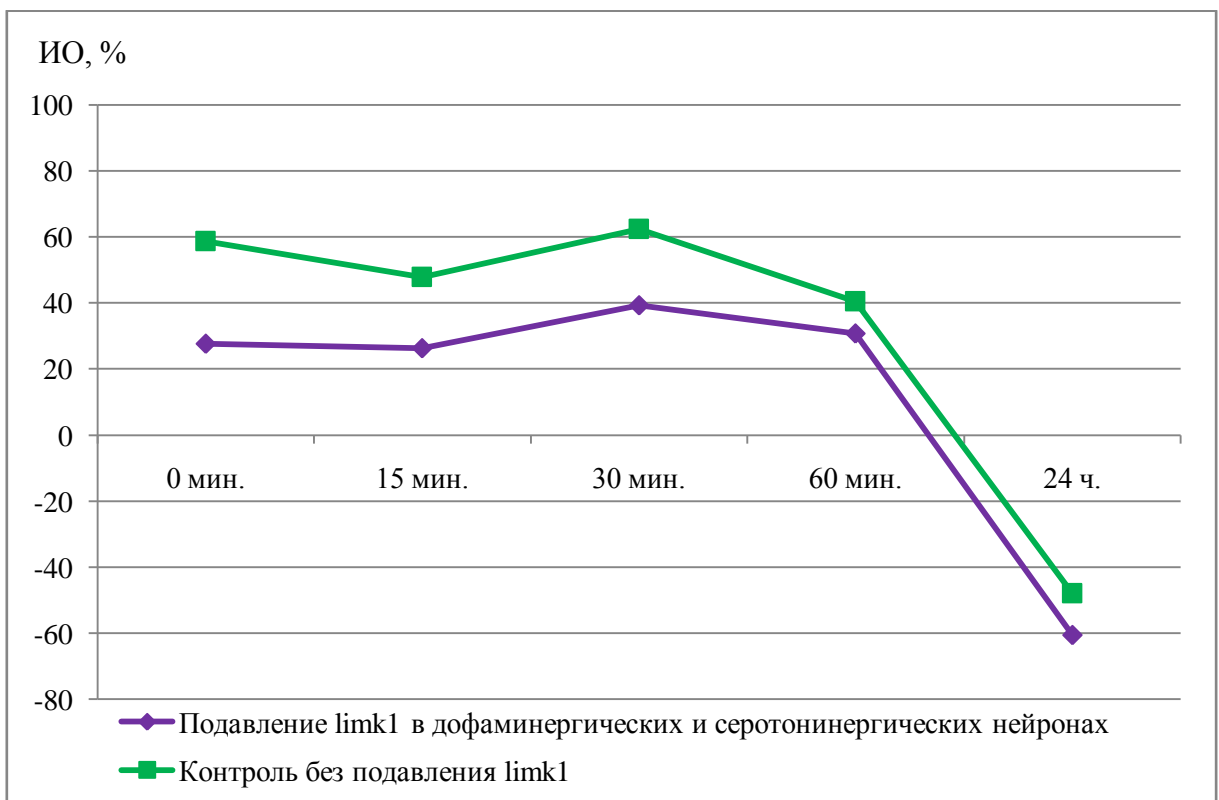


Рисунок 9 - Динамика изменения ИО мух с подавлением *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах и без подавления.

Примечание:

● – достоверно отличается от 0 минут ($p < 0,05$).

Как видно на рисунках 10 и 11, у линии с подавлением *limk1* в холинергических нейронах ИО после обучения снижается быстрее, чем у линии без подавления (межлинейные различия достоверны в точке 60 мин, $p < 0,05$). Для данной линии также показан более низкий уровень LIMK1 сравнительно с контролем. Таким образом, подавление LIMK1 в холинергических нейронах, в том числе нейронах грибовидных тел, также не способствует сохранению памяти, а наоборот, ускоряет снижение ИО.

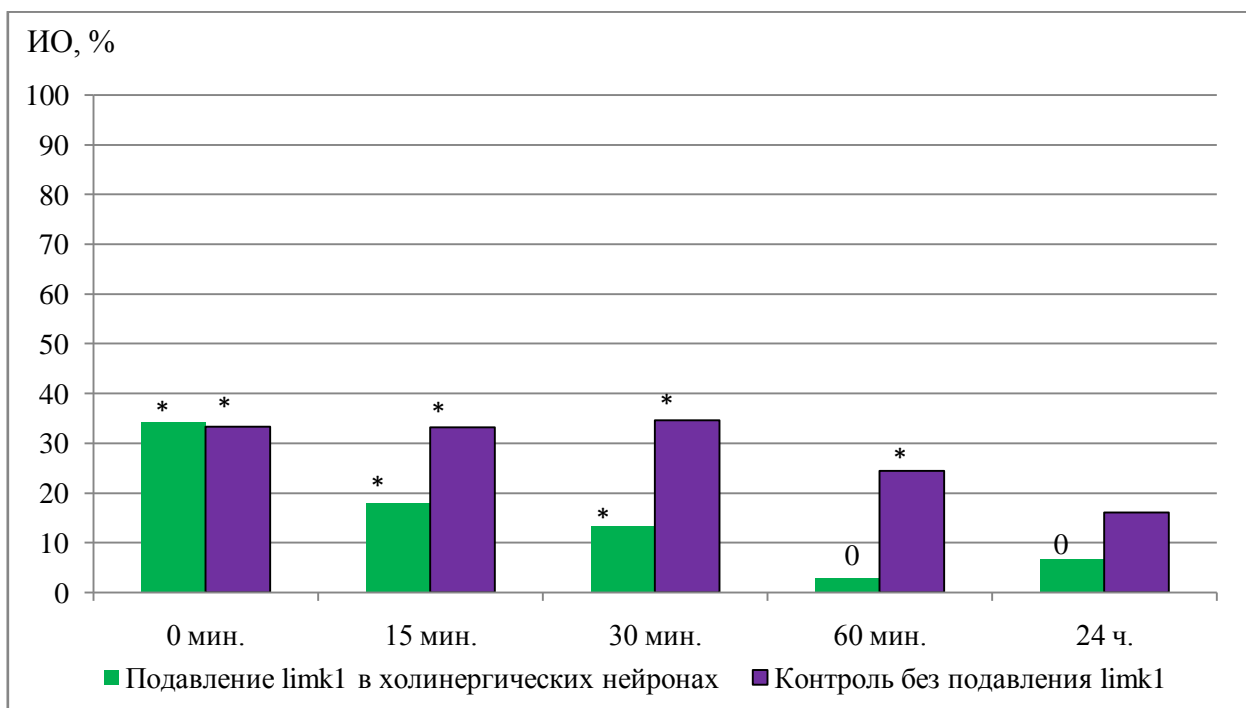


Рисунок 10 - ИО гибридов с подавлением *limk1* в холинергических нейронах и без подавления.

Примечание:

- * – достоверно отличается от 0 ($p < 0,05$);
- ▲ – достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$);
- 0 – достоверно отличается от 0 минут ($p < 0,05$).

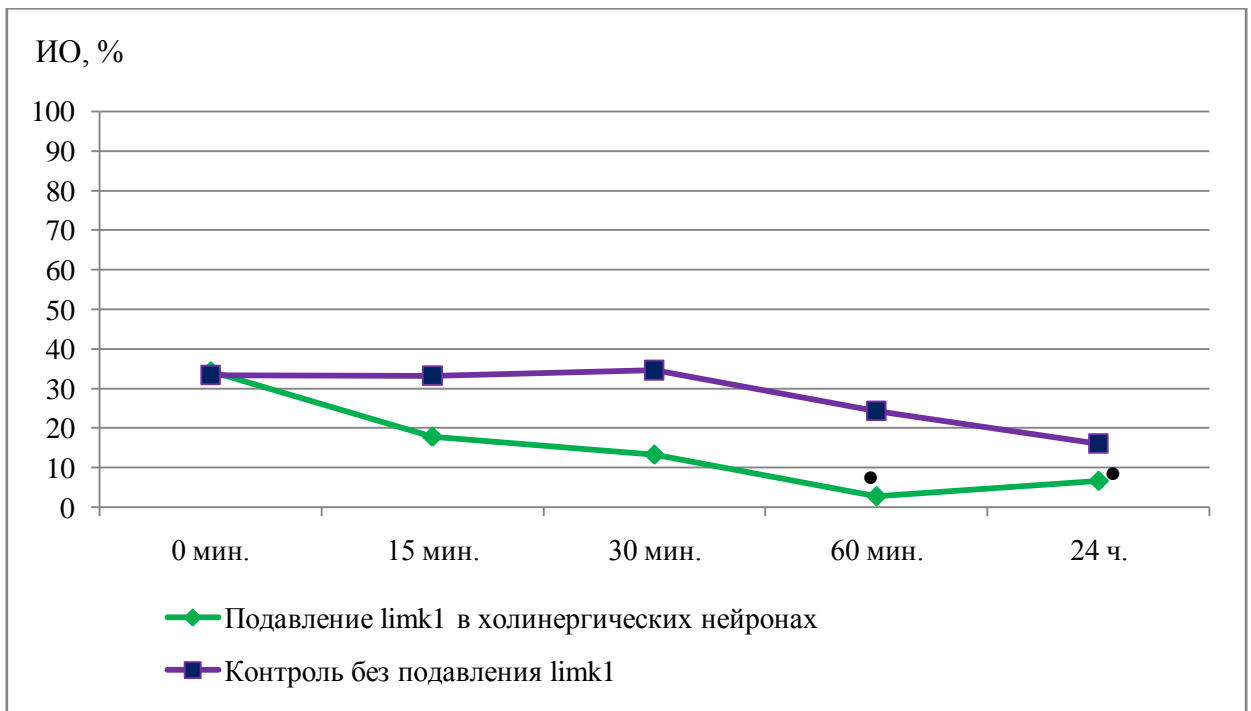


Рисунок 11 - Динамика изменения ИО мух с подавлением *limk1* в холинергических нейронах и без подавления.

Примечание:

- – достоверно отличается от 0 минут ($p < 0,05$);
- ▲ – достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$).

Как показано на рисунке 12, у линии с подавлением *limk1* в нейронах *fruitless* ИО отличен от нуля на интервале 0 - 60 мин, у контрольной же линии он не отличается от нуля уже через 30 мин после тренировки ($p < 0,05$). Спустя 24 часа после обучения у контрольной линии наблюдали достоверные отличия от точки сразу после тренировки, в то время, как у линии с подавлением гена этого не наблюдали (Рисунок 13). Таким образом, скорость снижения ИО у линии с подавлением ниже, что согласуется с тенденцией к понижению у данной линии уровня LIMK1.

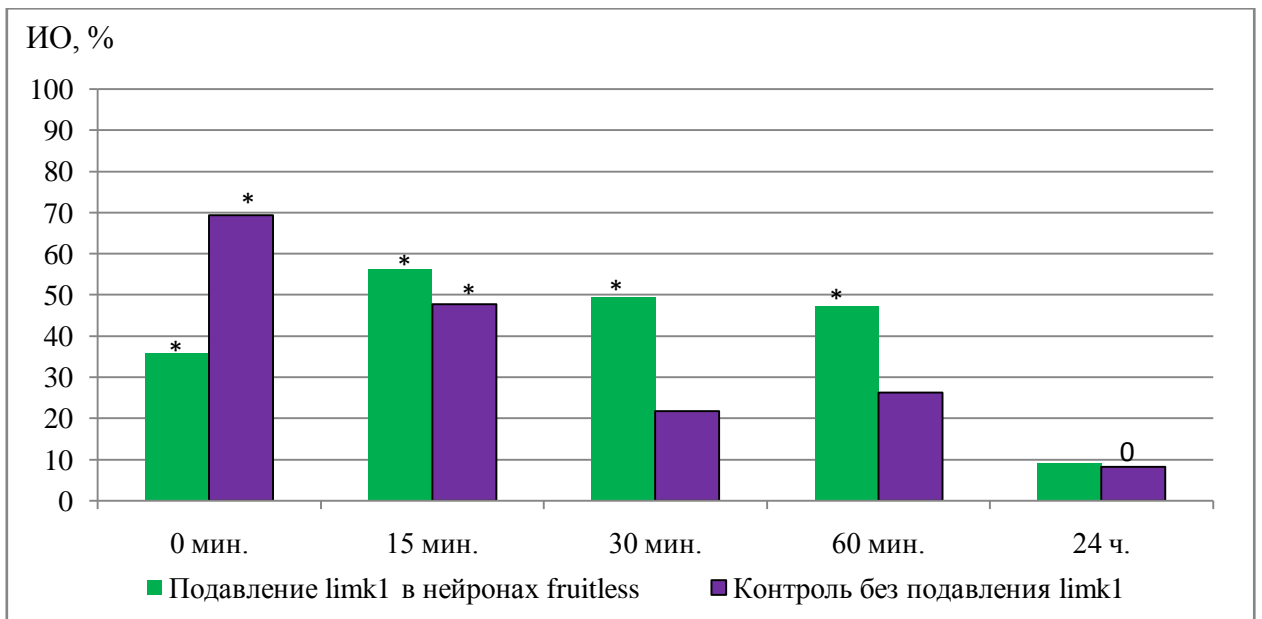


Рисунок 12 - ИО гибридов с подавлением *limk1* в нейронах *fruitless* без подавления.

Примечание:

* – достоверно отличается от 0 ($p < 0,05$);

0 – достоверно отличается от 0 минут ($p < 0,05$).

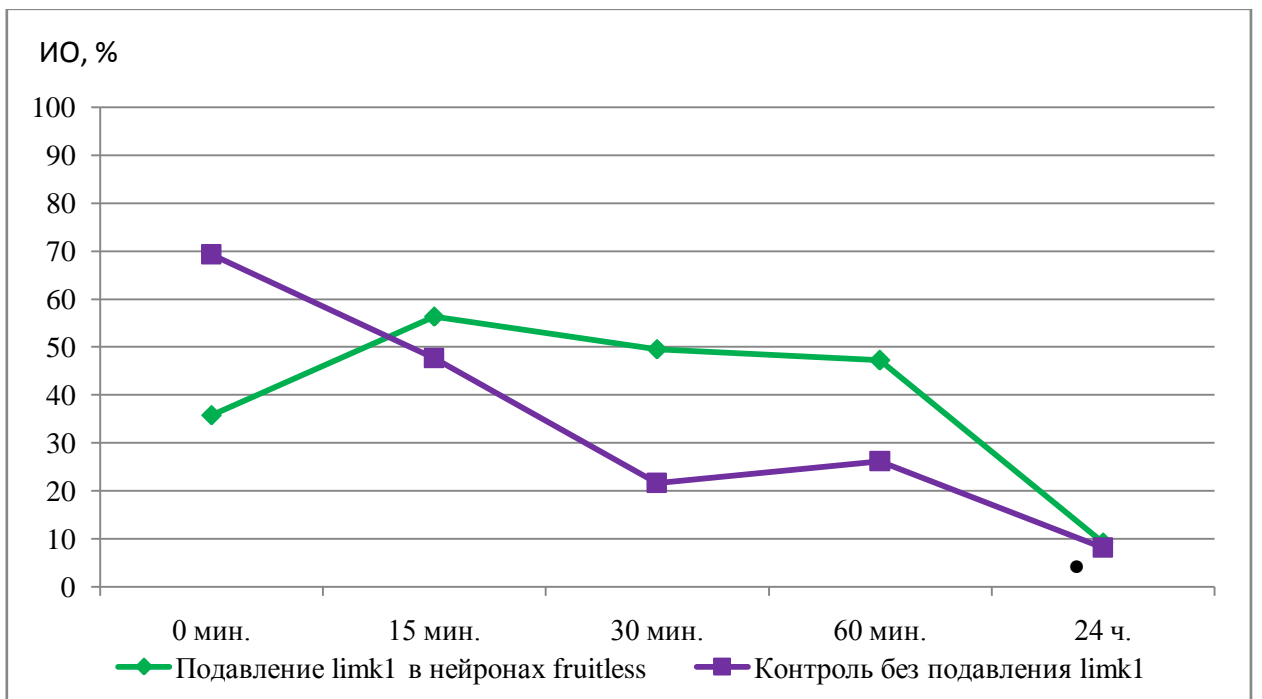


Рисунок 13 - Динамика изменения ИО мух с подавлением *limk1* в нейронах *fruitless* без подавления.

Примечание:

● – достоверно отличается от 0 минут ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что характер влияния нейроспецифического подавления гена *limk1* на динамику ИО определяется конкретным типом нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в связи со значительным ростом социально-значимых заболеваний в современном мире, а также отсутствием адекватных методик их лечения, крайне важны генетические исследования, направленные на изучение распространения, этиологии, патогенеза, течения наследственных болезней, разработку системы диагностики, лечения, профилактики и реабилитации больных. Также имеет большое значение изучение предпосылок возникновения социально-значимых заболеваний, в частности, нейродегенеративных и геномных болезней.

Использование хорошо изученного нейрогенетического объекта дрозофилы для комплексного исследования механизмов подобных заболеваний позволяет применять современные генетические и нейрофизиологические методы для изучения их этиологии на разных уровнях - от поведенческого (обучение и память) до выяснения молекулярно-генетических механизмов. Такие исследования, в качестве области возможного использования, могут способствовать разработке новых лекарственных препаратов, направленных на облегчение состояния больных НДЗ.

ВЫВОДЫ

1. Линии дикого типа *Canton-Si Berlin* характеризуются высокой способностью к формированию памяти, в то время, как линия *agn^{ts3}* с дисфункцией *limk1*, а также линия *Oregon-R* неспособны к формированию и сохранению памяти.

2. Наиболее выраженная динамика краткосрочной и среднесрочной памяти выявлена у линии дикого типа *Berlin*, в то время, как у линий *agn^{ts3}* и *Oregon-R* индексы обучения остаются низкими на протяжении исследуемого интервала времени.

3. Подавление экспрессии гена *limk1* в различных типах нейронов не приводит к нарушениям формирования памяти, при этом наиболее высокий уровень формирования и сохранения памяти наблюдается при подавлении экспрессии гена *limk1* в нервной системе.

4. Подавление экспрессии гена *limk1* в нервной системе, а также в дофаминергических и серотонинергических нейронах не влияет на динамику снижения краткосрочной и среднесрочной памяти, в то время, как в нейронах *fruitless* оно замедляет забывание, а в холинергических нейронах, наоборот, ускоряет, но на коротком временном интервале.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Результаты работы были представлены в виде устных докладов: на Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (2020, Санкт-Петербург); Четвертой международной конференции «Физика – наукам о жизни» (2021, Санкт-Петербург). Были сделаны стендовые доклады: на III Молодежной школе-конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (2019, Москва); Международной конференции The allied genetic conference (2020, Вашингтон); XXV Научной школе-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (2021, Москва); Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (2021, Санкт-Петербург); 13й Международной мультikonференции «Биоинформатика геномной регуляции и структурной/системной биологии» - BGRS/SB-2022 (2022, Новосибирск).

НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Публикации в рецензируемых журналах

1. **Заломаева Е.С.** Воздействие слабого статического магнитного поля и олигопептидов на клеточную пролиферацию и когнитивные функции организмов различных видов / Е.С. Заломаева, П.Н. Иванова, Н.И. Чалисова, С.В. Сурма, Е.В. Токмачева, Е.В. Савватеева-Попова, Б.Ф. Щеголев, Е.А. Никитина // Журнал технической физики, 2020. Том 90, вып. 10. – С. 1656-1662. DOI: 10.21883/JTF.2020.10.49796.400-19
2. Медведева А.В. Роль LIMK1 дофаминовых и серотониновых нейронов в стабильности генома, обучении и памяти у дрозофилы при стрессорной реакции на ослабление геомагнитного поля / А.В. Медведева, А.В. Реброва, **Е.С. Заломаева**, С.К. Тураева, Е.А. Никитина, Е.В. Токмачева, С.А. Васильева, Б.Ф. Щеголев, Е.В. Савватеева-Попова // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58. - №1. – С. 34-42. DOI 10.31857/S0044452922010041
3. Медведева А.В. Роль гипоксии в целостности генетического аппарата и формировании памяти у дрозофилы в парадигме условно рефлекторного подавления ухода / А.В. Медведева, Е.В. Токмачева, Е.А. Никитина, С.А. Васильева, **Е.С. Заломаева**, Е.В. Савватеева-Попова // Медицинский академический журнал. – 2020. – Т. 20. – № 4. – С. 45–54. DOI 10.17816/MAJ51445

Статьи в научных журналах и сборниках и тезисы научных конференций

1. **Заломаева, Е.С.** Анализ формирования краткосрочной памяти у *Drosophilamelanogaster* в условиях нарушения сигнального каскада ремоделирования актина / Е.С. Заломаева, Е.А. Никитина, А.В. Журавлёв, Е.В. Савватеева-Попова // III молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций». Сборник материалов конференции. – Москва, 13-15.09.2019. – С. 61-62.

2. **Заломаева Е.С.** Влияние гена *limk1* на способность к обучению у *Drosophilamelanogaster* в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания/ Е.С. Заломаева, Е.А. Никитина, А.В. Журавлев, Е.В. Савватеева-Попова // XXIII школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. – Москва, 30-31.10.2019. – С. 69-70.
3. **Заломаева Е.С.** Обучение и забывание у *Drosophilamelanogaster* при полиморфизме по гену *limk1* / Е.С. Заломаева, В.С. Фалина, А.В. Медведева, Е.А. Никитина, Е.В. Савватеева-Попова // Интегративная физиология. - 2021. – Т.2. - №3. – С. 318-327. DOI 10.33910/2687-1270-2021-2-3-318-327
4. **Заломаева Е.С.** Обучение и забывание у линий *Drosophilamelanogaster* с нейроспецифическим подавлением экспрессии гена *limk1* / Е.С. Заломаева, Е.С. Егозова, С.К. Тураева, А.В. Медведева, А.В. Журавлев, Е.А. Никитина // Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием, Санкт-Петербург (8-10 декабря 2021 г.). – Тезисы докладов. – СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2021. – С. 103-104.
5. **Заломаева Е.С.** Способность к формированию краткосрочной и среднесрочной памяти у линий *Drosophilamelanogaster*, полиморфных по гену *limk1*, при применении теплового шока / Е.С. Заломаева, А.В. Журавлев, Е.В. Савватеева-Попова, Е.А. Никитина // Сборник трудов XXIV научной школы-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. – М: Квант-Медиа, 2020. – С. 51-54. DOI 10.24412/CL-36001-2020-1-51-54
6. **Заломаева Е.С.** Способность к формированию памяти у линий *Drosophilamelanogaster* с подавлением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических нейронах / Е.С. Заломаева, С.К. Тураева, А.В. Медведева, А.В. Журавлев, Е.А. Никитина // Тезисы докладов Четвёртой международной конференции со школой молодых учёных «Физика — наукам о жизни». — СПб.: ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 2021. – С. 50.

7. **Заломаева Е.С.** Формирование краткосрочной памяти у *Drosophilamelanogaster* с подавлением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и холинергических нейронах / Е.С. Заломаева, С.К. Тураева, А.В. Медведева, А.В. Журавлев, Е.А. Никитина // Сборник трудов XXV научной школы конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии; Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. – М.: Квант Медиа, 2021. С. 104-107. DOI 10.24412/CL-36601-2021-1-104-107

8. **Заломаева Е.С.** Формирование краткосрочной памяти при воздействии теплового шока у линий *Drosophilamelanogaster*, полиморфных по гену *limk1* / Е.С. Заломаева, В.С. Фалина А.В. Журавлёв, Е.В. Савватеева-Попова, Е.А. Никитина // Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием, посвящённая 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург (9-11 декабря 2020 г.). – Тезисы докладов. – СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2020. – С. 108-109.

9. **Заломаева, Е.С.** Формирование краткосрочной памяти у линий *Drosophilamelanogaster*, полиморфных по гену *limk1* / Е.С. Заломаева // VIII международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019». - С. 215.

10. Медведева А.В. LIMK-1 серотонин-дофаминовых нейронов дрозофилы как мишень влияния магнитного поля / А.В. Медведева, А.В. Реброва, **Е.С. Заломаева**, Е.А. Никитина, Е.В. Токмачева, С.А. Васильева, Б.Ф. Щеголев, Е.В. Савватеева-Попова // Здоровье - основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2021. – Т. 16. - №3. – С. 976-983.

11. Никитина Е.А. Генетические и эпигенетические факторы развития нейродегенеративных заболеваний: использование моделей на дрозофиле / Е.А. Никитина, А.В. Медведева, А.В. Журавлев, Е.В. Токмачева, С.А. Васильева, **Е.С. Заломаева**, П.Н. Иванова, Г.А. Захаров, Е.В. Савватеева-Попова // Международный конгресс «VII съезд Вавиловского

общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы». Сборник тезисов. – 18-22 июня 2019г. Санкт-Петербург. – С. 350.

12. Тураева С.К. Анализ динамики краткосрочной и среднесрочной памяти у *Drosophilamelanogaster* с нейроспецифическим подавлением экспрессии гена *limk1* / С.К. Тураева, **Е.С. Заломаева**, Е.А. Никитина // Физико-химическая биология как основа современной медицины: тезисы докладов участников Международной научной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения профессора Е. В. Барковского. – Минск: БГМУ, 2021. – С. 303-304.

13. Фалина В.С. Оценка активности процессов обучения и забывания у *Drosophilamelanogaster* с нарушением функциональной активности гена *limk1* / В.С. Фалина, **Е.С. Заломаева** // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2020: Сборник тезисов LXXXI научно-практической конференции с международным участием. – СПб., 2020. – С. 106.

14. **Zalomaeva, E.S.** Memory formation in *Drosophila* with neurospecific suppression *limk1* gene expression in nervous system / E.S. Zalomaeva, E.S. Egozova, A.V. Medvedeva, A.V. Zhuravlev, E.A. Nikitina // Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2022). The Thirteenth International Multiconference/ Abstracts. – 04-08 July 2022. – p. 966. DOI 10.18699/SBB-2022-566

15. **Zalomaeva E.S.** The role of the *limk1* gene on short-term memory formation indrosophila melanogaster / E.S. Zalomaeva, V.S. Falina, G.V. Andrrev, E.A. Nikitina, A.V. Zhuravlev, E.V. Savvateeva- Popova // TAGS 2020 online, Abstract book. - April 22-25 2020. - p. 163.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИО – индекс обучения

ИУ_н – средний индекс ухаживания для независимой выборки самцов, не имеющих опыта полового поведения;

ИУ_т - средний индекс ухаживания для независимой выборки обученных самцов, прошедших тренировку

НДЗ – нейродегенеративные заболевания

РНК – рибонуклеиновая кислота

УРПУ – условно-рефлекторное подавление ухаживания

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

LIMK1 - LIMkinase 1; LIMкиназа 1

RNAi - RNA interference; РНК интерференция

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каминская А.Н. Обучение и формирование памяти в сопоставлении с распределением pCREB и белковых агрегатов в нейромышечных контактах у *Drosophila melanogaster* при полиморфизме *limk1*/ А.Н. Каминская, Е.А. Никитина, А.В. Медведева, М.С. Герасименко, Д.А. Черникова, Е.В. Савватеева-Попова // Генетика. – 2015. – Т. 51. - №6. – С. 685-693.
2. Камышев Н.Г., Илиади К.Г., Брагина Ю.В., Савватеева-Попова Е.В., Токмачева Е.В., Преа Т. Выявление мутантов дрозофилы, проявляющих дефекты памяти после выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 1999. - Т. 85. № 1. - С. 84-92.
3. Ковалева Т.С. Кофилин: молекулярно-клеточные функции и роль в функционировании нервной системы / Т.С. Ковалева, Н.С. Максимова, И.Ю. Жуков и др. // Нейрохимия - 2019. –Т. 36. №1. – С. 14-23.
4. Савватеева–Попова Е.В. От нейрогенетики к нейроэпигенетике / Е.В. Савватеева-Попова, Е.А. Никитина, А.В. Медведева // Генетика. 2015. Т.51. №5. С. 613–624.
5. Численность населения Российской федерации по полу и возрасту на 1 января 2022 года (Статистический бюллетень). – Москва, 2022. – 443с.
6. Davis, R.L. The Biology of Forgetting-A Perspective / R. L. Davis, Y. Zhong // Neuron. – 2017. – Vol. 95. – P. 490-503.
7. Hall J. C. The mating of a fly / J. C. Hall // Science. – 1994. – V. 264. – P. 1702-1714.
8. Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V. *Drosophila* conditioned courtship: Two ways of testing memory // Learn. Mem. - 1999. - V. 6. № 1. - P. 1-20.
9. Medina, L. Shadow Economies Around the World: What Did We Learn Over the Last 20 Years? / L. Medina, F. Schneider // IMF Working Paper No. – 2018. – Vol. 18. – P. 1-76.
10. Savvateeva-Popova, E.V. *Drosophila* Model for the Analysis of Genesis of LIM-kinase 1-Dependent Williams-Beuren Syndrome Cognitive Phenotypes:

INDELS, Transposable Elements of the Tc1/Mariner Superfamily and MicroRNAs./ E.V. Savvateeva-Popova, A. V. Zhuravlev , V. Brázda , G. A. Zakharov, A. N. Kaminskaya, A. V. Medvedeva, E. A. Nikitina , E. V. Tokmatcheva, J. F. Dolgaya, D. A. Kulikova, O.G. Zatssepina, S.Y. Funikov, S. S. Ryazansky, M. B. Evgen'ev // Front Genet. –2017. – Vol. 8. – P. 123.

11. Siegel R.W., Hall J.C. Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – V. 76. № 1. - P. 3430–3434.

12. Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd ed. - New York: W.H. Freeman, 1995. – 887 p.

13. Zamboni, F. The potential of hyaluronic acid in immunoprotection and immunomodulation: Chemistry, processing and function / F. Zamboni, S. Vieira, R. L. Reis, J.M. Oliveira, M.N. Collins // Progress in Materials Science. – 2018. – Vol. 97 – P. 97-122.