

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова

На правах рукописи

Федотов Сергей Александрович

**Молекулярно-генетический и физиологический анализ нарушений
моторики у мутантов дрозофилы**

03.03.01 – физиология

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители: д.б.н. Шуваев В.Т.
д.б.н. Камышев Н.Г.

Санкт-Петербург
2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Развитие представлений о ЦГМП.....	15
1.2 Морфофункциональная организация изученных ЦГМП.....	24
1.2.1 Сердечный генератор пиявки.....	24
1.2.2 Пилорический генератор ракообразных.....	26
1.2.3 Локомоторный генератор моллюска <i>Clione</i>	28
1.2.4 Локомоторный генератор палочников.....	29
1.3 Молекулярные механизмы функционирования и развития ЦГМП.....	31
1.4 Дрозофила как модельный объект в исследованиях молекулярно-генетических механизмов моторной активности.....	42
1.5 Характеристика ритмических форм поведения дрозофилы.....	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	63
2.1 Тестирование моторной активности мутантных линий.....	63
2.2. Определение локализации и направленности <i>PdL</i> -транспозона в геноме.....	66
2.3 Система локального нокдауна генов-кандидатов.....	68
2.4 Количественная оценка уровня экспрессии генов-кандидатов.....	71
2.5 Флуоресцентная микроскопия.....	72
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	74
3.1 Характеристика локомоторных отклонений у <i>P</i> -инсерционных мутантов.....	74
3.2 Характеристика песенных отклонений у <i>P</i> -инсерционных мутантов.....	78
3.3 Идентификация мутаций в линиях с отклонениями в моторной активности.....	86
3.4 Характеристика генов-кандидатов, определяющих параметры ритмических движений.....	88

3.5 Локомоторная активность линий с локальным нокдауном генов-кандидатов.....	119
3.6 Анализ работы систем GAL4/UAS, обеспечивающих нейроспецифичный нокдаун.....	123
3.7 Песенная активность линий с локальным нокдауном генов-кандидатов.....	125
3.8 Локомоторная и песенная активность мух при локальном нокдауне генов <i>Sps2</i> и <i>CG15630</i> в глиальных клетках.....	127
3.9 Локомоторная и песенная активность мух при индуцированном нокдауне гена <i>CG15630</i> на стадии имаго.....	129
3.10 Локомоторная активность самок дрозофилы при нейроспецифичном нокдауне гена <i>CG15630</i>	131
3.11 Морфологический анализ ЦНС дрозофилы при нокдауне гена <i>CG15630</i> под контролем драйвера <i>nrv2-GAL4</i>	132
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	139
ВЫВОДЫ.....	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	155

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АЦП – аналого-цифровой преобразователь

ГАМК - γ -аминомасляная кислота

ДМСО – диметилсульфооксид

ДПИП – длительность посылки импульсной песни

ДПоб – длительность побежки

ИА – индекс активности

ИИП – индекс импульсной песни

инРНК – интерферирующая РНК

ИП – импульсная песня

МИИ – межимпульсный интервал

МПП – мембранный потенциал покоя

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НЧИ – несущая частота импульса

п.н. – пар нуклеотидов

ПД – потенциал действия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РЖГ – ротожелудочный ганглий

СП – скорость побежки

ТФ – транскрипционный фактор

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦГМП – центральный генератор моторного паттерна

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ЧИ – числовой идентификатор

ЧИПИП – частота инициации посылок импульсной песни

ЧП – частота побегов

АВ – передний пейсмейкер (anterior burster)

АМРА – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол пропионовой кислоты (α -

amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid)

BDSC – Bloomington Drosophila Stock Center

BLAST – программа поиска нуклеотидных последовательностей в геномной базе данных *Drosophila melanogaster* (Basic Local Alignment Search Tool)

CS – линия дикого типа Canton-S

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor)

EMS – этилметансульфонат (ethyl methanesulfonate)

GAL.ER – химерный белок, полученный путем сшивания лигандсвязывающего домена эстрогенового рецептора человека и ДНК-связывающего домена GAL4.

Gi/o – G-белок, связывающий альфа2-адренорецепторы

Gq – G-белок, связывающий альфа1-адренорецепторы

Gs – G-белок, связывающий бета-адренорецепторы

HCN – катионные неселективные каналы, активируемые гиперполяризацией (hyperpolarization-activated, cation nonselective)

HLB – тельце гистонного локуса (histone locus body)

hnRNPs – гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиды (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins)

5-НТ – серотонин (5-hydroxytryptamine)

I_A – потенциал-зависимые быстрые выходящие токи

I_{Ca} – кальциевые входящие токи

I_{CAN} – кальций-зависимый входящий ток

I_{Ca-T} – подпороговые токи кальция

I_h – токи, активируемые гиперполяризацией

I_{K-Ca} – кальций-зависимыми токами калия

I_{K-LEAK} – токи утечки калия

I_{Kv} – потенциал-зависимые токи калия

I_{NALCN} – токи утечки натрия через NALCN-каналы

I_{NaP} – потенциал-зависимые устойчивые токи натрия

I_{NaR} – возрождающиеся токи натрия

I_{Nav} – потенциал-зависимые быстрые токи натрия

IP_3R – инозитолтрифосфатные рецепторы (inositol trisphosphate receptors)

I_{SK} – Ca^{2+} -активируемые калиевые токи с малой проводимостью

LP – латеральный пилорический нейрон (lateral pyloric)

LRR – повтор богатый лейцином (leucine-rich repeat)

MAPK – митоген-активируемая киназа (Ras/mitogen-activated protein kinase)

mGluR – метаботропные глутаматные рецепторы (metabotropic glutamate receptors)

NALCN – нечувствительные к тетродотоксину неселективные катионные каналы (Na^+ leak channel)

NCBI – интернет ресурс научной информации (National Center for Biotechnology Information)

NMDA – N-метил-D-аспартат (N-methyl-D-aspartate)

PD – пилорический дилататор (pyloric dilatator)

PEV – эффект положения мозаичного типа (position-effect variegation)

PY – пилорический нейрон (pyloric neuron)

RNAi – РНК-опосредованная интерференция (RNA interference)

RyR – рианодиновые рецепторы (ryanodine receptors)

sAHP – следовая гиперполяризация (slow afterhyperpolarization)

SERCA – кальциевый насос (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase)

shRNA – малые шпилечные РНК (small hairpin RNA)

SMW – вторая митотическая волна (second mitotic wave)

TKRPs – пептиды, родственные тахикинину (tachykinin-related peptides)

TTX – тетродотоксин (tetrodotoxin)

UAS – регуляторная последовательность, которая при связывании GAL4 активирует экспрессию элемента, стоящего за ней (upstream activation sequence)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Исследование нервных механизмов, определяющих генерацию моторного паттерна ритмических движений, является необходимым для лечения моторных дисфункций и восстановления утерянной двигательной активности в результате повреждений нервной системы (Pearson, 2000; Marder, Bucher, 2001; Gordon, Whelan, 2006). Несмотря на определенные успехи в изучении генераторов моторного паттерна на человеке и других млекопитающих (Kiehn, Butt, 2003; Goulding, Pfaff, 2005; Andersson et al., 2012), исследования механизмов их работы на клеточном и молекулярном уровнях в составе нейронных ансамблей продвигаются крайне медленно и находятся на начальной стадии (Kiehn, 2011). В то же время для многих беспозвоночных животных дано исчерпывающее описание клеточной организации и механизмов функционирования центральных генераторов моторного паттерна (ЦГМП) различных форм ритмической деятельности (Arshavsky et al., 1998; Cymbalyuk et al., 2002; Marder, Bucher, 2007), что дает возможность проведения исследований молекулярных основ формирования и работы нервной сети генератора. Однако для модельных объектов с детально изученной морфофункциональной организацией ЦГМП, как правило, не существует готовых к использованию молекулярно-генетических методов, а также баз биоинформационных данных о генах и их продуктах. Вследствие этого сведения о молекулярных механизмах генерации моторного паттерна носят фрагментарный характер, а сама проблема остается крайне малоизученной. Однако в последние годы появились работы, в которых были описаны отдельные молекулярные факторы, необходимые для генерации моторного паттерна разных форм ритмических движений (Marder, Bucher, 2007; Ping et al., 2010; Lu, Feng, 2012). Успех этих исследований связан во многих случаях с использованием плодовых мушек *Drosophila melanogaster* либо непосредственно в опытах с изучением их моторной активности (Banerjee et al., 2004; Nash et al., 2002; Ping et al., 2010), либо как источник биоинформационных

данных о возможных молекулярных участниках работы и развития ЦГМП (Littleton, Ganetzky, 2000). Преимущество дрозофилы перед другими модельными объектами заключается в том, что для данного вида разработаны уникальные молекулярные и генетические методы, существенно расширяющие возможности исследования различных физиологических параметров, а также полностью секвенирован и подробнейше изучен его геном. Биоинформационный анализ позволяет оценивать функциональные свойства тех или иных структурных элементов генома и прогнозировать их роль в изучаемых процессах.

Исследование молекулярно-генетических основ генерации моторного паттерна ритмических движений у дрозофилы является актуальным и перспективным, так как между классами насекомых и млекопитающих имеется определенное сходство между функциональными характеристиками молекулярных продуктов, кодируемых генами ортологами в этих двух таксонах (Fradkin et al., 2010; Ping et al., 2010; Xiong et al., 2012). Подобное сходство не только позволяет раскрывать ранее неизвестные молекулярные детерминанты исследуемых физиологических процессов, но и обеспечивает параллельное исследование этих процессов одновременно у млекопитающих и дрозофилы (Iijima-Ando et al., 2009; Mallik, Lakhotia, 2010; Read et al., 2009). Кроме того, стратегия развития в современной фармацевтике все больше разворачивается в сторону поиска и создания агентов, специфически влияющих на конкретные молекулярные компоненты, участвующие в патологических процессах, что связано с более высокой эффективностью лекарственной терапии и меньшим количеством побочных эффектов (Zheng et al., 2006).

Во многих современных работах анализ моторных функций дрозофилы выполняется в целях выявления и изучения роли генов, участвующих в физиологических и молекулярно-клеточных процессах (Fox et al., 2006; Poesck et al., 2008). В то же время часто применяется и подход обратной генетики, когда изучение молекулярно-клеточных и физиологических механизмов моторной деятельности начинается с тестирования генетически модифицированных организмов (Morgan, Kyriacou, 2009). И тот, и другой подходы были применены в

настоящей работе с целью создания отправных точек в исследовании нейрональных механизмов генерации моторного паттерна ритмических движений.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящего исследования является идентификация молекулярно-генетических детерминант нервных процессов, ответственных за реализацию ритмических форм моторной активности у дрозофилы.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Из ранее созданной коллекции Р-инсерционных мутантов дрозофилы отобрать линии с наиболее выраженными отклонениями параметров локомоторного поведения и песни ухаживания самца для дальнейшей идентификации генов-кандидатов.

2. Проанализировать взаимосвязь отклонений параметров двух форм моторной активности в группе отобранных мутантов.

3. Идентифицировать затронутые мутациями гены и определить их молекулярные продукты по биоинформационным и экспериментальным данным.

4. Установить участие и вероятную роль отобранных генов кандидатов в процессах развития и функционирования нервных структур, определяющих генерацию и регуляцию моторного паттерна ритмических движений, используя ткане- и стадиеспецифичные нокдауны генов методом РНК-интерференции.

Научная новизна работы.

Выявлены статистические закономерности в характере отклонений параметров локомоторной и песенной активности в группе Р-инсерционных мутантов дрозофилы. Впервые показана вовлеченность 22 генов дрозофилы в определении параметров как локомоции, так и звукопродукции, а для 10 из них подтверждено участие в нервных процессах, связанных с реализацией данных форм моторной активности. Впервые изучено влияние подавления экспрессии гена *CG15630* в нейрональных и глиальных клетках на структуру моторного паттерна песни ухаживания самцов дрозофилы. Впервые выявлены структурные аномалии в центральной нервной системе (ЦНС) дрозофилы при нокдауне гена *CG15630*, которые могут являться причиной отклонений в моторном паттерне

песенной активности наравне с функциональными нарушениями, вызываемыми нокдауном гена на стадии имаго.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Отклонения в скорости побегки и величине межимпульсного интервала (МИИ) у Р-инсерционных мутантов связаны со специфичными нарушениями моторных систем, ответственных соответственно за локомоцию и звукопродукцию дрозофилы. В то же время отклонения в параметрах длительности и частоты инициаций отражают неспецифичные нарушения, которые затрагивают регуляцию или базовые механизмы функционирования в обеих формах моторной активности.

2. Транскрипты 5 генов-кандидатов, отобранных в результате скрининга по параметрам моторной активности, вовлечены в нервные процессы, которые в трех случаях связаны с определением структуры моторного паттерна песенной активности дрозофилы (*Sps2*, *CG15630*, *CG34460*), и в двух случаях с определением параметров как локомоторных, так и песенных моторных актов животного (*Mef2*, *CG6746*).

3. Экспрессия гена *CG15630* в нейронах необходима как для развития, так и для функционирования структур, предположительно опосредующих регуляторные влияния на ЦГМП песни ухаживания со стороны сенсорных органов.

Теоретическая и практическая значимость.

Проведенное генетическое исследование моторной активности у дрозофилы позволило определить ряд значимых молекулярных детерминант нейрональных механизмов генерации моторного паттерна ритмических движений, которые на фоне малочисленности сведений о молекулярных процессах, определяющих работу ЦГМП, могут быть использованы в качестве отправных точек в исследованиях в данной области. Наличие у 14 из 22 описанных в работе генов-кандидатов ортологов у млекопитающих и человека предполагает возможность переноса в дальнейшем результатов исследования молекулярных механизмов работы ЦГМП на более сложноорганизованные нервные сети, что может обеспечить разработку новых стратегий лечения моторных дисфункций на

молекулярном уровне. В частности, исследование влияния продукта гена *CG15630* на нервные сети, опосредующих передачу сенсорной информации на моторные системы мухи, могут послужить отправной точкой в изучении молекулярных механизмов эффекта тренировок на скорость восстановления утраченной активности у млекопитающих.

Апробация работы.

Основные положения и результаты диссертации были представлены на 11 российских и международных конференциях: Шестом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Украина, Судак, 2010); Первой Всероссийской молодежной научной конференции, посвященной 125-летию биологических исследований в Томском государственном университете (Томск, 2010); XIV школе-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (Москва, 2010); Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 2010); Конференции молодых ученых «Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды», посвященной 85-летию со дня основания Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 2010); Седьмом международном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Украина, Судак, 2011); XIV международном совещании и VII школе по эволюционной физиологии, посвященных памяти академика Л. А. Орбели (Санкт-Петербург, 2011); Всероссийской молодежной конференции-школе «Нейробиология интегративных функций мозга», посвященной 120-летию создания Физиологического отдела под руководством И.П. Павлова в Императорском институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, 2011), X East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology “Simpler Nervous Systems” (Russia, Moscow, 2012).

Вклад автора.

Материалы, вошедшие в данную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем. Лично автором выполнена идентификация, затронутых мутациями генов, осуществлена оценка экспрессии

генов-кандидатов методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР), организованы эксперименты с конститутивным и индуцируемым нокдауном генов, осуществлен анализ флуоресценции в ЦНС эмбрионов и мух имаго методами широкопольной и конфокальной микроскопии, а также составлена характеристика 22 генов-кандидатов по существующим литературным и биоинформационным данным.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), выводов и списка литературы. Работа изложена на 204 страницах печатного текста, содержит 7 таблиц и иллюстрирована 41 рисунком. В списке литературы приведено 452 источника.

Публикации по теме диссертации.

Основное содержание диссертации отражено в 15 публикациях, из них 2 научные статьи в рецензируемых журналах, включенных в Перечень ВАК РФ.

Статьи

1. Панова А.А., **Федотов С.А.**, Брагина Ю.В. Влияние социального опыта на локомоторную активность и поведение ухаживания самцов *Drosophila melanogaster* // Материалы Первой Всероссийской молодежной научной конференции, посвященной 125-летию биологических исследований в Томском государственном университете "Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии". - Труды Томского Государственного Университета. - Серия биологическая. - 2010. - Т. 275. - С. 221-224.
2. **Федотов С.А.**, Брагина Ю.В., Беседина Н.Г., Даниленкова Л.В., Камышева Е.А., Камышев Н.Г. Генетическое исследование моторных функций *Drosophila melanogaster* // Экологическая генетика. - 2012. - Т. 10. - №1. - С. 51-61.
3. **Федотов С.А.**, Брагина Ю.В., Беседина Н.Г., Даниленкова Л.В., Камышева Е.А., Камышев Н.Г. Генетические детерминанты генерации моторного паттерна ритмических движений *Drosophila melanogaster* // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2013. - Т. 99. - № 1. - С. 120-130.
4. Panova A.A., Bragina J.V., Danilenkova L.V., Besedina N.G., Kamysheva

E.A., **Fedotov S.A.**, Kamyshev N.G. Group rearing leads to long-term changes in locomotor activity of *Drosophila* males // Open Journal of Animal Sciences. – 2013. - Vol. 3. - № 4B. - P. 31-35. - doi:10.4236/ojas.2013.34A2004.

Тезисы

1. Брагина Ю.В., Беседина Н.Г., Даниленкова Л.В., **Федотов С.А.**, Камышева Е.А., Камышев Н.Г. Сравнительный анализ параметров двигательного поведения и звукопродукции у мутантов дрозофилы с локомоторными нарушениями // Шестой международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», Украина, Судак. - 2010. - С. 74.

2. Панова А.А., **Федотов С.А.**, Брагина Ю.В. Влияние социального опыта на локомоторную активность и поведение ухаживания самцов *Drosophila melanogaster* // Первая Всероссийская молодежная научная конференция, посвященная 125-летию биологических исследований в Томском государственном университете ", Томск. - 2010. - С. 101.

3. **Федотов С.А.**, Брагина Ю.В., Камышев Н.Г., Беседина Н.Г., Даниленкова Л.В., Камышева Е.А. Молекулярно-генетический анализ Р-инсерционных мутантов *Drosophila melanogaster* с нарушениями локомоторного поведения и звукопродукции // XIV школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Москва. - 2010 г. - С. 61.

4. Брагина Ю.В., Беседина Н.Г., Даниленкова Л.Г., **Федотов С.А.**, Камышева Е.А., Камышев Н.Г. Новые мутации, нарушающие функционирование или управление работой центральных генераторов моторного паттерна у *Drosophila melanogaster* // Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, СПб. - 2010. - С. 39.

5. **Федотов С.А.**, Брагина Ю.В. Влияние индивидуального опыта на характеристики песни ухаживания самцов *Drosophila melanogaster* // Конференция молодых ученых «Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды", посвященная 85-летию со дня основания Института физиологии им. И. П. Павлова РАН, СПб. - 2010. - С. 114.

6. Панова А.А., **Федотов С.А.**, Брагина Ю.В. Влияние содержания в группе

на локомоторную активность и поведение ухаживания самцов *Drosophila melanogaster* // Международный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», Украина, Судак. - 2011. - С. 330.

7. Брагина Ю.В., **Федотов С.А.**, Беседина Н.Г., Даниленкова Л.В., Камышева Е.А., Камышев Н.Г. Генетический контроль работы центральных генераторов моторного паттерна у дрозофилы // Седьмой международный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», Украина, Судак. - 2011. - С. 104.

8. **Федотов С.А.**, Брагина Ю.В., Беседина Н.Г., Даниленкова Л.В., Камышева Е.А., Камышев Н.Г. Генетическое исследование мутантов дрозофилы с измененными показателями моторных функций // XIV международное совещание и VII школа по эволюционной физиологии, посвященных памяти академика Л.А. Орбели, СПб. - 2011. - С. 192.

9. Брагина Ю.В., **Федотов С.А.**, Беседина Н.Г., Камышев Н.Г. Генетический контроль устойчивости к тепловому стрессу у дрозофилы // XIV международное совещание и VII школа по эволюционной физиологии, посвященных памяти академика Л.А. Орбели, СПб. - 2011. - С. 37.

10. **Федотов С.А.**, Брагина Ю.В. Генетическое исследование моторных функций дрозофилы // Всероссийская молодежная конференция-школа «Нейробиология интегративных функций мозга», посвященная 120-летию создания Физиологического отдела под руководством И.П. Павлова в Императорском институте экспериментальной медицины. Медицинский академический журнал, Т. 11, Спецвыпуск, СПб. - 2011. -. С. 57.

11. **Fedotov S.A.**, Bragina J.V., Besedina N.G., Danilenkova L.V., Kamysheva E.A., Kamyshev N.G. Genetic determinants of generating the motor pattern of rhythmic movements in *Drosophila melanogaster* // X East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology “Simpler Nervous Systems”, Russia, Moscow. - 2012. - P. 15.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Развитие представлений о ЦГМП

Формирование моторного выхода в нервной системе животных определяется регуляторными и запускающими импульсами со стороны сенсорных и интегративных структур, а также собственными свойствами мотонейронов и их взаимодействием (Briggman, Kristan, 2008). При этом моторный выход на одиночное раздражение может быть в виде кратковременной вспышки активности (напр., коленный рефлекс), либо в виде продолжительной ритмически организованной последовательности импульсов (напр., взмахи крыльев у насекомых). Второй вид ответа связывают с наличием в нервной системе ЦГМП, представленных одиночными пейсмейкерами либо группами нейронов, взаимодействие между которыми обеспечивает ритмический выход.

Уже в 1911 году Т. Г. Браун (Brown, 1911) предположил наличие в спинном мозге центров, обеспечивающих попеременное ритмическое сокращение мышц-антагонистов. В его исследованиях на кошках было показано возникновение ритмически организованных сокращений мышц-антагонистов задней ноги кошки через некоторое время после наложения лигатуры на спинной мозг между 12 и 13 спинными корешками спинномозговых нервов. Кроме того, автором было определено, что полная афферентная денервация (перерезание спинных корешков) качественно не меняет паттерн сокращений. В дальнейшем результаты экспериментов Брауна были многократно подтверждены и уточнены (см. обзор Rossignol, 1996).

В 50-60-х годах появились работы отечественных и зарубежных авторов, в которых была ярко проиллюстрирована работа генераторов моторного паттерна у насекомых. Дональд Уилсон (Wilson, 1961) в 1961 году показал, что при отсечении передних управляющих ганглиев от торакального ганглия в ЦНС саранчи полет насекомого, вызываемый раздражением брюшка, сохраняет все свои параметры (частоту и фазовые отношения взмахов крыльев, траекторию их движения). Кроме

того, в своих экспериментах он обнаружил, что деафферентация крыльев и летательного аппарата саранчи приводит к снижению частоты взмахов при полете, вызываемом при раздражении экстерорецепторов головы. В дальнейшем С. И. Плотниковой (1979) в третьем торакальном ганглии саранчи были обнаружены нейроны, электрическая стимуляция которых приводила к генерации этими нейронами собственного ритма (Рисунок 1), который сохранялся в течение нескольких секунд после прекращения стимуляции.

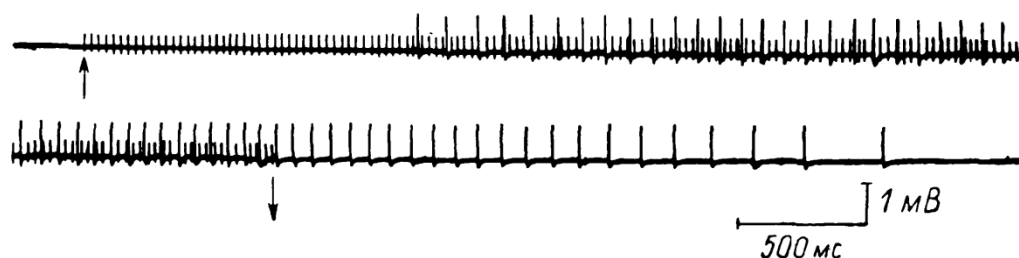


Рисунок 1. Запуск и характер активности нейрона III грудного ганглия перелетной саранчи, генерирующего ритм полета насекомого. Частота стимуляции 34 в 1 с. Стрелки - начало и прекращение стимуляции. Стимулы представлены в виде низкоамплитудных пиков. Ответ в нейроне возникает после 46 стимулов (Свидерский, 1965).

Под руководством В. Л. Свидерского (1973) были детально изучены нервные механизмы управления работой мышц тимбального органа, генерирующего призывную песню ясеновой цикады. В этих исследованиях было показано, что полная деафферентация синганглия, управляющего работой тимбальных мышц, не нарушает частоты и паттерна импульсов, посылаемых к мышцам при электрической стимуляции ганглия. Также были выделены моторная и премоторная области в синганглии цикады. Электрическое раздражение каудально расположенной моторной области вызывало импульсную активность в аксоне, иннервирующем тимбальную мышцу, с частотой равной частоте стимуляции (30 Гц). Однако при смещении раздражающих электродов к головному концу ганглия (в префронтальную область) от аксонов тимбальных

мышц регистрировались потенциалы действия (ПД) с частотой около 80 Гц и полностью отсутствовали ответы в ритме стимуляции. Получаемый характер импульсации аксона при стимуляции префронтальной зоны (регулярные пачки импульсов) полностью соответствовал паттерну звуковых колебаний в песне цикады и сохранялся в течение нескольких секунд после прекращения стимуляции.

Таким образом, уже в ранних исследованиях было показано, что центральные генераторы способны формировать ритмически организованный моторный выход в отсутствие влияний со стороны сенсорных и вышестоящих отделов нервной системы. Однако работа ЦГМП невозможна без участия высших отделов ЦНС, осуществляющих их запуск (прекращение стимуляции приводит к остановке генератора) и обеспечивающих тонкую подстройку моторного паттерна под текущие условия реализации ритмической активности.

К настоящему времени проведено огромное количество исследований ЦГМП, по результатам которых представления о механизмах формирования моторного ритмического выхода были существенно расширены и уточнены.

ЦГМП обычно образованы интернейронами, имеющими выход на мотонейроны. Однако есть и исключения как, например, в ротожелудочном ганглии (РЖГ) ракообразных, который состоит в основном из мотонейронов (Marder, 2007). **Ритмическая активность ЦГМП** в первую очередь основана на эндогенных пейсмейкерных свойствах некоторых нейронов генератора. Показано, что генерация ритма сохраняется после хирургического и фармакологического устранения взаимодействия между антагонистическими группами нейронов, формирующих ЦГМП (Arshavsky et al., 1993; Stein et al., 1995; Cowley, Schmidt, 1995; Perrins, Soffe, 1996; Kremer, Lev-Tov, 1997). Более того, нейроны, играющие ключевую роль в ЦГМП позвоночных и беспозвоночных животных, продолжают генерировать ритмическую импульсацию даже после извлечения из ганглия либо после функциональной изоляции клетки (Elson, Selverston, 1992; Hochman et al, 1994; Grillner et al, 1995; Onimaru et al., 1995; Panchin et al., 1996). Пейсмейкерные

интернейроны в дыхательном ЦГМП можно рассматривать в качестве постоянно функционирующих ритмоводителей. На определенном уровне мембранного потенциала их ритмическая активность сохраняется в отсутствие внешних входов (Onimaru, 1995; Ramirez, Richter, 1996). В противоположность дыханию, большинство автоматических движений является эпизодическими, которые запускаются командными входами от высших уровней нервной системы. Соответственно, пейсмейкерные нейроны в этих случаях проявляют свою эндогенную ритмическую активность только при действии определенных факторов (Рисунок 2). В частности, запуск локомоторных ЦГМП позвоночных может осуществляться при действии возбуждающих аминокислот (Soffe, 1996; Whelan, 1996), а осцилляции крыла у брюхоногого моллюска *Clione* (морской ангел) – при действии серотонина (Arshavsky et al., 1998). При этом командные

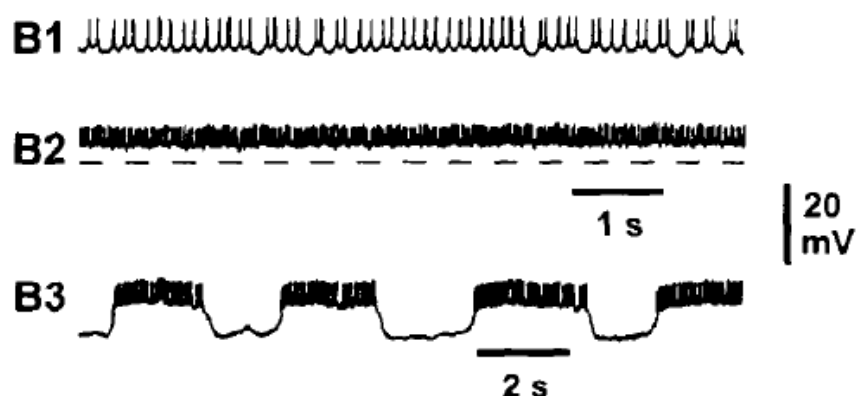


Рисунок 2. Запись внутриклеточного отведения от нейронов, выделенных совместно с аксонами из РЖГ лангуста. Показана активность бокового заднего желудочного нейрона ЦГМП желудочной мельницы после 2-х дней в культуре. B1 - первоначальная активность, нейрон генерирует импульсы без вспышек. B2 и B3 - активность через 10 минут после добавления пилокарпина в омывающий раствор. Пилокарпин деполяризует нейрон (первоначальный уровень мембранного потенциала обозначен штриховой чертой) и усиливает его тоническую активность (B2). Гиперполяризация нейрона (B3) вызывает пачечную активность, подобную активности желудочного нейрона *in situ* (Arshavsky et al., 1997).

входы, как и регуляторные, воздействуют на группу интернейронов, вовлеченных в генерацию ритма. Обнаружено также, что как регуляторные, так и командные входы могут действовать паракринно на открытые синапсы, где пресинаптические волокна не формируют синаптических контактов на конкретных клетках, а высвобождают нейромедиатор в межклеточное пространство, влияя сразу на несколько клеток (Arshavsky et al., 1988; Schotland et al., 1996). Кроме активирующих ЦГМП командных входов существуют и ингибирующие командные входы, которые либо просто гиперполяризуют нейроны генератора, либо изменяют мембранные свойства нейронов ЦГМП, подавляя эндогенную импульсацию (Cazalets et al, 1990; Grillner et al, 1995).

Межклеточные взаимодействия в ЦГМП, включая постингибиторную активацию, способствуют усилению ритмичности в системах с взаимно ингибирующими группами нейронов (Arshavsky et al., 1993; Grillner et al, 1995; Marder, 1996; Sharp et al., 1996). Однако ритмическая активность, основанная исключительно на эффекте постингибиторной активации представляет собой редкое явление, видимо, ввиду слабой надежности. Примером подобной системы может служить плавание моллюска тритонии, при котором реализуется лишь несколько циклов ритмического движения (Katz, 2009).

Как и с генерацией ритмической импульсации, **временной паттерн моторного выхода ЦГМП** в значительной степени определяется внутренними свойствами нейронов генератора. Частота ритмической активности, производимой изолированным пейсмейкером, попадает в диапазон, характерный для соответствующего движения, в то время как длительность колебаний мембранного потенциала сравнима с длительностью фазы движения. Так у эмбрионов первого поколения шпорцевой лягушки (5 мм), которые плавают с использованием ритмических ундуляций с периодом 50 мс, спинномозговые нейроны производят лишь одиночный спайк в ответ на их деполяризацию. В итоге нейроны генерируют один спайк на один цикл во время плавания. У эмбрионов следующего поколения (10 мм) и головастики шпорцевой лягушки,

спинномозговые нейроны способны генерировать пачки импульсов. Пачечная активность приводит к удлинению фаз цикла (Sillar, Simmers, 1994).

Кроме собственных свойств нейронов, фактором определяющим временные параметры моторного паттерна, являются синаптические взаимодействия нейронов ЦГМП. Так, например, изолированный нейрон протрактора в ЦГМП поглощения пищи у улитки *Planorbis* имеет собственные механизмы для прекращения активности, тем не менее, при работе генератора активность этого нейрона подавляется ингибирующими влияниями со стороны нейронов ретрактора (Arshavsky et al., 1991). Сходным образом, последовательное возбуждение интернейронов, формирующих ЦГМП глотания, также определяется как собственными свойствами клеток, так и их взаимосвязями (Tell, Jean, 1993; Zoungrana et al., 1997). Ниже на примерах будет подробнее рассмотрено значение синаптических взаимодействий в определении моторного паттерна.

Фазовые отношения между компонентами моторного выхода в основном определяются синаптическими взаимодействиями. Под компонентами моторного выхода в данном случае понимается отдельные действия в составе ритмического акта, выполняемые одновременно работающей группой мышц. В ЦГМП, который формирует монофазный моторный выход (одно действие, как в генераторе, контролирующем разряды электрического органа рыб), присутствуют только возбуждающие взаимодействия между пейсмейкерными интернейронами (Zuranc, Maler, 1997). Бифазный моторный паттерн, генерируемый в ЦГМП плавания у многих животных (два последовательных повторяющихся действия), в значительной степени определяется возбуждающими связями между синергичными нейронами и тормозными связями между антагонистическими нейронами (Arshavsky et al., 1991; Grillner et al, 1995). Трехфазный выход (три последовательных повторяющихся действия), формируемый генератором поглощения пищи у улитки, обеспечивается еще более сложной организацией межклеточных связей. В ЦГМП глотания в отличие от ЦГМП плавания связи между антагонистическими нейронами асимметричны. Интернейроны

протрактора возбуждают интернейроны ретрактора, которые затем ингибируют интернейроны протрактора (Quinlan, Murphy, 1996; Yeoman et al., 1996).

В дополнение к связям, определяющим паттерн моторного выхода, существуют дополнительные механизмы, которые поддерживают надежную смену фаз. Один из этих механизмов – **постингибиторная активация**, которая представляет собой деполяризацию мембраны после подачи гиперполяризационных стимулов (Angstadt et al., 2005). Другим механизмом является **запаздывающее возбуждение** между антагонистическими нейронами, которое существует наравне с взаимным ингибированием. У моллюска *Clione* интернейрон 8 ингибирует интернейрон 7 и возбуждает интернейрон 12. Интернейрон 12 вызывает ингибирование интернейрона 8 и отставленное во времени возбуждение интернейрона 7. Таким образом, нейроны ЦГМП обеспечивают окончание вентральной фазы и начало следующей дорсальной фазы в плавательных движениях (Panchin et al., 1995).

Взаимодействия между нейронами ЦГМП могут корректироваться теми же командными входами, которые запускают ЦГМП (Johnson et al., 1995; Selverston, 1995; Marder, Calabrese, 1996;). Поэтому все чаще говорят о **модуляторных входах** вместо командных, что, видимо, больше соответствует действительности, учитывая множественность влияний на генератор, которые в свою очередь также являются результатом сетевого взаимодействия. Кроме того, нисходящие командные входы не только включают ЦГМП, но также устанавливают тип взаимодействия между элементарными ЦГМП, контролирующими ритмические движения, например, различных конечностей у млекопитающих при локомоции. Тип взаимодействия между элементарными ЦГМП определяет походку животного. Так, более высокие концентрации NMDA (N-methyl-D-aspartate) и серотонина снижают реципрокное торможение между левыми и правыми ЦГМП в спинном мозгу крысы, что приводит к синхронизации работы этих центров (Kjaerulff, Kiehn, 1996). Вероятно, именно нарушение баланса тормозных и возбуждающих связей между антагонистическими локомоторными центрами

происходит у мутантов по рецептору EphA4, для которых характерно перемещение прыжками (Restrepo et al., 2011).

Взаимодействие ЦГМП может определяться непосредственно и влияниями со стороны сенсорных клеток. Работы, посвященные плаванию пиявки, показали, что соответствующая фазовая задержка в генераторах, расположенных в разных сегментах тела, обеспечивается обратными сенсорными связями от рецепторов растяжения мышц как непосредственно к элементам ЦГМП, так и к модуляторным нейронам (Cang, Friesen, 2002). Аналогичные выводы были сделаны и при изучении ЦГМП, управляющих работой ног у палочников. При изоляции торакального ганглия сохраняется попеременная импульсация в мотонейронах, обслуживающих антагонистические мышцы, однако межсуставная координация нарушается (Büschges et al., 2004).

Хотя ЦГМП формирует основной паттерн моторного выхода, мотонейроны не являются пассивными повторителями ритма. В большинстве случаев их свойства модулируются теми же командными входами, которые активируют генерацию ритма. Более того, многие мотонейроны проявляют тенденцию к ритмической активности под влиянием командных входов или их медиаторов (Grillner et al, 1995, Rioult-Pedotti, 1997; Kim, Chandler, 1995). У *Clione* серотонин вызывает некоторую ритмичность в мотонейронах, также как и активирует плавательный ЦГМП (Panchin et al, 1996). Кроме генерации ритмических осцилляций, некоторые спинномозговые мотонейроны у позвоночных могут генерировать продолжительный потенциал в виде плато при действии моноаминергических входов (Kiehn, 1991; Skydsgaard, Hounsgaard, 1996). Как следствие, ответы мотонейрона на синаптический вход усиливаются и по интенсивности и по длительности. Сами мышцы часто демонстрируют нелинейное преобразование активности мотонейронов в сокращения (Hooper, Weaver, 2000), что еще более усложняет анализ влияния различных факторов на работу ЦГМП.

Сети ЦГМП способны мощно перестраиваться под управлением модуляторных нейронов и нейромодуляторных веществ в такой степени, что одни

и те же элементы сети могут производить различные моторные выходы (Dickinson, et al, 1990; Meyrand et al, 1994). Исследования пищевого ЦГМП аплии выявили совместную активность большого количества интернейронов, которые регулируют поведенческий выход в этой **мультифункциональной сети** (Rosen et al, 1991; Hurwitz, 2002; Morgan et al, 2002). Консуматорное поведение у аплии представлено 2 формами - поглощением и экскрецией. Каждая из этих форм включает выдвижение и втягивание радулы. Различные комбинации движений радулы производятся одним генератором в ответ на совместную активность церебробуккальных интернейронов (СБИ) 1, 2 и 3. СБИ-2 возбуждается при касании губ с пищей и стимуляция СБИ-2 приводит к генерации программы поглощения. Активация же СБИ-3 при работе СБИ-2 переводит ритм поглощения в ритм экскреции (Morgan et al, 2002). В исследовании с визуализацией активности одновременно половины клеток в ганглии пиявки авторы приходят к выводу, что выбор между паттерном ползания или плавания в большей степени определяется комбинацией активности множества клеток, а не работой одного нейрона. Вместе с тем стимуляция или ингибирование клетки 208, нейрона, который имел большой вес в определении комбинации, склоняло решение в сторону плавания или ползания (Briggman, Kristan, 2006).

В исследованиях на эмбриональных и новорожденных животных было показано, что готовые к функционированию ЦГМП формируются еще до рождения (Pasquale et al, 1996; Champagnat, Fortin, 1997). Записи ритмической активности у крыс на препаратах *in vitro* выявили наличие ритмической активности, которая в период эмбрионального развития E14.5–E16.5 была синхронной как в обеих сторонах спинного мозга, так и в мышцах-антагонистах. Однако, начиная с E18.5, синхронность между двумя сторонами спинного мозга сменяется попеременной активностью. Двумя днями позже (E20.5) попеременная активность возникает и в моторных выходах флексора и экстензора (Nishimaru, Kudo, 2000). У лангустов нейрональная сеть РЖГ формируется еще в первой половине эмбрионального развития. При этом все нейроны в РЖГ также импульсируют в одном эмбриональном ритме, который непостоянен (Casasnovas,

Meugand, 1995). Однако если в эмбрионе удалить нисходящие модуляторные входы, то при стимуляции РЖГ производит характерные для него пилорический и желудочный ритмы (Feuvre, et al, 1999), что указывает на формирование пейсмейкерного ядра ЦГМП уже на самых ранних стадиях развития. Фенелон с соавт. (Fenelon et al., 2003) в обзоре по ритмогенезу в РЖГ приходит к выводу, что онтогенетические изменения под влиянием модуляторных входов, связаны не с постепенным увеличением числа модуляторных проекционных нейронов, а с постепенным появлением специфических нейротрансмиттеров (FLRF-амидов, тетрапептидов, ГАМК, серотонина) в той же модуляторной группе.

1.2 Морфофункциональная организация изученных ЦГМП

1.2.1 Сердечный генератор пиявки

Сердцебиение у пиявки координируется простой сетью, работа которой основана на взаимном ингибировании между парами сердечных интернейронов (Рисунок 3). Сердечные интернейроны проецируются на моторные нейроны почти в каждом сегменте и обеспечивают перистальтические или синхронные сокращения, которые приводят в движение кровь. Моторный паттерн сердечного ЦГМП представлен ритмически организованными пачками импульсов (Maranto, Calabrese, 1984). Взаимное ингибирование в паре интернейронов ЦГМП обеспечивает стабильную работу генератора, а сам ритм имеет эндогенную природу. При этом длительность пачечной активности связывают с кальциевыми токами, которые медленно активируются и медленно инактивируются в ответ на незначительные изменения потенциала. Возникновение пачечной активности связывают с нарастанием активируемых гиперполяризацией катионных токов, в том числе и «быстрых» кальциевых токов (Olypher et al, 2006).

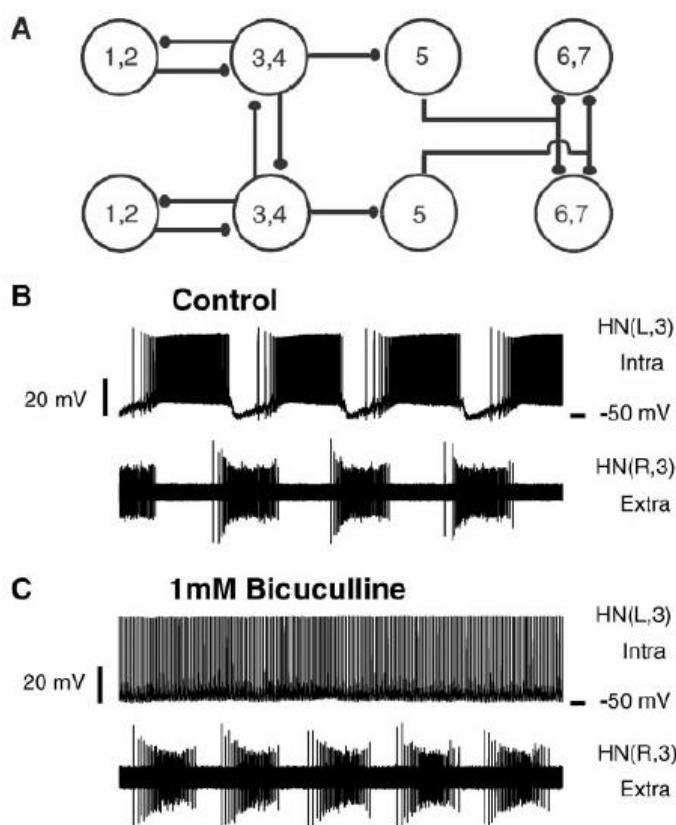


Рисунок 3. **A** - диаграмма связей в нейрональной сети, генерирующей ритм сердцебиения пиявки. Нейроны представлены кругами. Цифры обозначают ганглии, где располагаются клеточные тела. Маленькие закрашенные эллипсы обозначают ингибиторные химические синапсы. Две пары реципрокно тормозящих друг друга сердечных нейрона (HN, сердечные интернейроны), которые расположены в ганглиях 3 и 4, формируют ЦГМП. Эти пейсмейкеры связаны также с координирующими интернейронами, чьи тела расположены в ганглиях 1 и 2. Другие премоторные интернейроны, расположенные в ганглиях 6 и 7, ингибируют сердечные мотонейроны. Переключательные интернейроны в 5-ом ганглии обеспечивают реализацию альтернативных координационных состояний мотонейронов – перистальтическое или синхронное.

В, С – импульсация интернейронов в ЦГМП сердечной активности при записи острым микроэлектродом внутриклеточно (intra) и при внеклеточной регистрации (extra). Левый пейсмейкер во взаимноингибируемой паре записан внутриклеточно, правый – экстраклеточно. Продолжение описания на следующей странице.

1.2.2. Пилорический генератор ракообразных

Пилорический генератор в РЖГ ракообразных участвует в реализации пищевого поведения этих животных. В зависимости от вида он включает от 12 до 14 нейронов, которые совместно формируют трехфазный паттерн импульсной активности. Хотя период цикла пилорического ритма составляет обычно около 1 с, он может варьировать в диапазоне от 0.5 до 5 с в зависимости от действия таких факторов как температура или нейромодуляторное окружение (Hooper, Marder, 1987; Nusbaum, Marder, 1989; Tang et al, 2010). Ритм зарождается в ансамбле электрически связанных нейронов из переднего пейсмейкера (интернейрон АВ) и двух пилорических дилататоров (PD), а затем распространяется к другим нейронам сети через ингибиторные синапсы. Эти три нейрона импульсируют совместно в первой фазе ритма, открытии пилорического клапана (Рисунок 4). Другая группа нейронов, к которой относится латеральный пилорический нейрон (LP), активна во второй фазе, закрытии пилорического клапана. Третья группа нейронов состоит из 6-8 пилорических констрикторов (PY), активных на третьей фазе ритма, сокращения пилорической части желудка. LP и PY напрямую ингибируются PD нейронами и включаются по механизму постингибиторной активации (Marder, Bucher, 2007).

На частоту и фазовые отношения компонентов ритма пейсмейкерного ядра влияет множество нейромодуляторов, которые действуют гормонально и через входящие в РЖГ окончания командных и сенсорных органов (см. обзор Marder, Bucher, 2007). Некоторые модуляторы могут действовать на несколько различных

Рисунок 3, продолжение. В – в нормальных условиях два нейрона генерируют попеременно вспышки импульсов. С – функциональная изоляция нейронов при добавлении бикукулина (блокатор ГАМК-рецепторов) сопровождается переходом к тонической импульсации при внутриклеточной регистрации и сохранением пачечной активности при экстраклеточной регистрации (Symbalyuk et al, 2002).

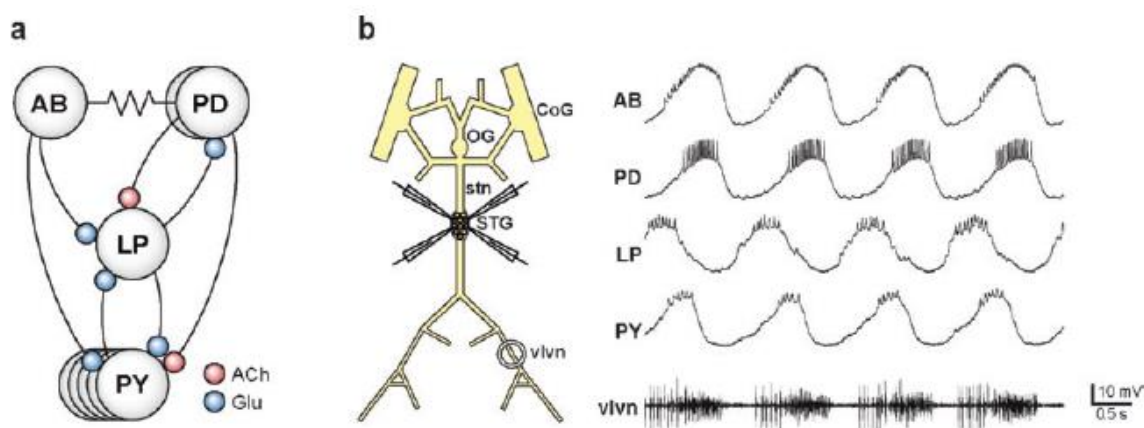


Рисунок 4. а - упрощенная диаграмма связей пилорической сети. Символ сопротивления обозначает электрическую связь между передним пейсмейкером (AB) и нейронами пилорического дилататора (PD). Кружки обозначают химические ингибиторные связи (ACh, холинергические; Glu, глутаматергические). б - схематическое изображение ротожелудочной нервной системы и одновременная внутриклеточная регистрация активности нейронов РЖГ (верхние 4 записи) и экстраклеточная (нижняя запись) регистрация активности моторного нерва у омара *Homarus americanus*. CoG, комиссуральный ганглий; OG, пищеводный ганглий; stn, ротожелудочный нерв; vlvn, вентральная ветвь латерального вентрикулярного нерва (Marder, Bucher, 2007).

потенциал-активируемых каналов в одном нейроне и, наоборот, действие нескольких различных медиаторов может сходиться на одной и той же потенциал-зависимой проводимости. При этом один и тот же модулятор может влиять на различные синапсы в противоположном направлении. Например, дофамин одновременно изменяет в нейроне LP токи I_A , I_{Ca} , и I_h (Harris-Warrick et al, 1995; Johnson, 2003). Тот же дофамин уменьшает I_A в нейронах LP и AB, но увеличивает в PD, оказывая противоположный эффект на активность этих клеток (Pesc et al, 2001). В результате при относительной простоте сети генератора исчерпывающего описания его работы до сих пор нет ввиду сложной картины регуляторных влияний.

1.2.3 Локомоторный генератор моллюска *Clione*

Плавание моллюска *Clione* осуществляется посредством махательных движений двух крылоподобных пароподий с частотой 1 Гц. Изолированный педальный ганглий выдает чередующиеся вспышки в плавательных мотонейронах, которые приводят к поднятию и опусканию пароподий. В педальном ганглии две антагонистические группы электрически связанных премоторных интернейронов формируют реципрокные ингибиторные синапсы. Эти группы генерируют сходные чередующиеся одиночные платоподобные потенциалы длительностью до 150 мс, которые управляют элеваторными (дорсальная фаза) и депрессорными (вентральная фаза) разрядами мотонейронов (Рисунок 5). Все интернейроны демонстрируют сильную постингибиторную

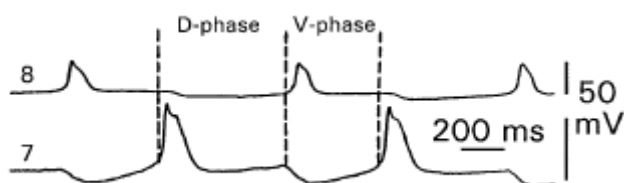


Рисунок 5. Активность групп интернейронов 7 и 8 во время «фиктивного плавания», генерируемая в изолированном педальном ганглии *Clione*. D-phase, дорсальная фаза; V-phase, вентральная фаза (Arshavsky et al., 1998).

активацию, в то же время часть из них может производить регулярные цепочки платоподобных потенциалов, будучи изолированной из ганглия (Arshavsky et al., 1998). Возникновение ритма связано с активностью эндогенных пейсмейкеров, а период одного цикла определяется в определенной степени длительностью реципрокных ингибиторных синаптических потенциалов. Запуск и ускорение работы генератора осуществляется из церебрального ганглия серотонинергическими командными нейронами, которые оказывают модулирующие влияния на мембранные свойства пейсмейкеров, переводя их в активное состояние (Panchin et al., 1996).

Необходимо отметить, что во многих случаях интернейроны, генерирующие ритм, являются электрически связанными друг с другом как, например, в пилорическом и локомоторном ЦГМП у беспозвоночных (Arshavsky et al., 1998; Marder, Bucher, 2007) и в локомоторных ЦГМП млекопитающих (Hinckley, 2006; Wilson et al., 2007). Шульц с соавт. (Schulz et al., 2006) в своем исследовании на нейронах PD пилорического генератора краба отмечает, что значения токов от препарата к препарату сильно варьируют, но их величины очень близки в электрически связанных нейронах в отдельном препарате. Таким образом, наличие электрических связей может объясняться, прежде всего, необходимостью синхронизации активности интернейронов, участвующих в формировании определенных компонентов моторного паттерна (Bennett, Zukin, 2004; Tazerart et al., 2004).

1.2.4 Локомоторный генератор палочников

У саранчи и речного рака локомоторный ЦГМП может быть фармакологически активирован в отсутствие обратных сенсорных связей от конечностей. При этом он генерирует координированный моторный выход для всех групп мотонейронов ноги, участвующих в движении вперед или назад (Ryckebusch, Laurent, 1993; Chrachri, Clarac, 1990). В то же время у **палочников координированный моторный выход, обеспечивающий шагание**, зависит от сенсорных обратных связей.

Моторный выход, контролирующий каждую ногу палочника, формируется отдельными генераторами, которые расположены в торакальном сегменте соответствующей ноги (Cruse, 1990; Bässler, Büschges, 1998). Для каждого из трех сочленений ноги палочника имеется свой генератор, производящий попеременную активность в антагонистических группах мотонейронов сочленения. Морфофункциональная организация локомоторных ЦГМП и их взаимодействие до сих пор не изучены. Однако ряд экспериментов подтверждает участие ЦГМП в моторном контроле ноги палочника. Во-первых, тактильная

стимуляция головы или брюшка вызывает вспышки попеременной импульсной активности в антагонистических пулах мотонейронов, обслуживающих сочленения ног (Bässler, Wegener, 1983; Büschges et al., 2004). Во-вторых, приложение пилокарпина, агониста мускариновых рецепторов, к торакальному ганглию, лишенного афферентных входов, также вызывает продолжительную попеременную активность в антагонистических пулах мотонейронов каждого ножного сочленения. При этом отсутствие устойчивых от цикла к циклу взаимоотношений между группами мотонейронов, контролирующих разные сочленения, предполагает существование отдельных ЦГМП для каждого сочленения, которые функционируют независимо друг от друга (Büschges et al., 1995).

Координированная работа ЦГМП всех сочленений ноги обеспечивается проприоцептивными сигналами о движениях сегментов ноги, нагрузке и растяжениях кутикулы. Так, например, сигналы о движении и положении сочленения бедро-голень от бедренного хордотонального органа определяют переключения генератора сочленения тазик-вертлуг между фазами поднятия и опускания, а кроме того направление этих переходов. Сигналы нагрузки от кампаниформных сенсилл бедра и вертлуга влияют на работу мотонейронов, контролирующих соответственно сочленения бедро-голень и тазик-вертлуг. Показано, что влияние обоих типов сенсорных сигналов не является независимым и интегрируется на уровне премоторной сети (Hess, Büschges, 1999; Akay et al., 2001; Bucher et al., 2003; Akay et al., 2004). Интересно, что установленная на палочниках роль сенсорных влияний в осуществлении перехода конечности между фазой опоры на субстрат (stance) и фазой переноса в исходную позицию (swing) имеет поразительное сходство с закономерностями, выявленными в исследованиях на кошках (Büschges et al., 2008).

Из представленных выше примеров видно, что ЦГМП, как правило, обеспечивают лишь устойчивое чередование импульсной активности, лежащее в основе ритмических действий, в то время как модулирующие сенсорные и нисходящие сигналы преобразуют и объединяют активность, генерируемую

ЦГМП, устанавливая адекватные параметры ритмической деятельности. Следует отметить также, что роль модуляторных влияний в генерации моторного паттерна существенно варьирует в зависимости от формы ритмической деятельности и вида животного.

1.3 Молекулярные механизмы функционирования и развития ЦГМП

Молекулярные механизмы генерации и регуляции моторного паттерна включают в себя участие и взаимодействия множества макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты), определяющих функциональные свойства пейсмейкерных нейронов, а также влияния со стороны других клеток нервной системы. При этом значение тех или иных механизмов в развитии и функционировании ЦГМП может оцениваться как по функциональным характеристикам импульсной активности клеток генератора, так и по параметрам самого ритмического действия.

Ритмическая активность пейсмейкера зависит от свойств множества **ионных каналов**, которые функционируют в пейсмейкере и отвечают за **различные токи**, описанные в исследованиях генераторов (Рисунок 6). В состав этих токов входят: токи, активируемые гиперполяризацией (I_h), токи утечки калия (I_{K-LEAK}), Ca^{2+} -активируемые калиевые токи с малой проводимостью (I_{SK}), устойчивые токи натрия (I_{NaP}), низкопороговые токи кальция (I_{Ca-T}) и ряд других (Grillner, 2003; Harris-Warrick, 2010). Роль большинства токов в генерации пейсмейкерной активности была первоначально описана у позвоночных, однако в дальнейшем сходные токи были обнаружены и в генераторах беспозвоночных животных (Nash et al., 2002; Staras et al., 2002).

Прежде всего, для генерации ритма в виде пачечной активности мембранный потенциал покоя (МПП) пейсмейкера должен поддерживаться в определенном диапазоне, за пределами которого импульсация нейрона исчезает либо приобретает тонический характер. МПП формируется преимущественно в результате утечки ионов калия из клетки по градиенту концентрации и составляет в среднем -65-75 мВ (Talley et al., 2003; Honore, 2007). Однако плазмалемма

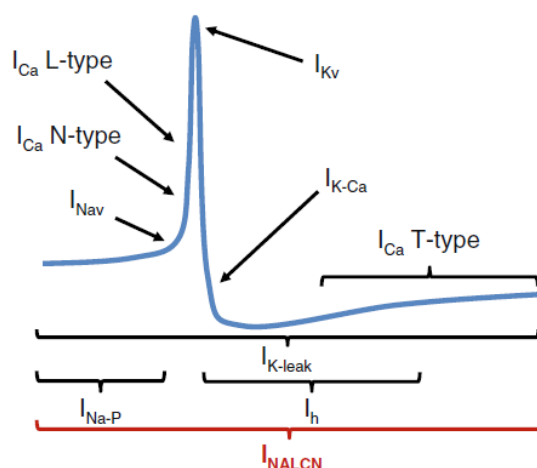


Рисунок 6. Роль токов в генерации ПД в ритмической активности пейсмейкера. Потенциал-зависимые устойчивые токи натрия I_{NaP} деполяризуют мембрану нейрона до порога активации потенциал-зависимых быстрых токов натрия (I_{Nav}). Быстрая деполяризация активирует потенциал-зависимые кальциевые каналы N- и L-типа (I_{Ca} N-type, I_{Ca} L-type) и потенциал-зависимые токи калия (I_{Kv}). Последующая гиперполяризация опосредуется кальций-зависимыми токами калия (I_{K-Ca}), после которых следуют токи, активируемые гиперполяризацией I_h , и низкопороговые токи кальция I_{Ca-T} (I_{Ca} T-type). Токи утечки калия I_{K-LEAK} определяют МПП вместе с токами утечки натрия через NALCN-каналы (I_{NALCN}). Последние являются пассивным регулятором деполяризующей фазы ПД (Lu, Feng, 2012).

большинства пейсмейкерных клеток в меньшей степени поляризована при сравнении с другими нервными клетками. МПП в клетках-ритмоводителях соответствует диапазону -45-60 мВ (Feldman, Del Negro, 2006; Mangoni, Nargeot, 2008; Khaliq, Bean, 2010). Данное свойство пейсмейкеров определяется наличием уникального для этих клеток **фоновых тока утечки натрия**, возникновение которого связывается с работой неселективных катионных каналов нечувствительных к тетродотоксину (Na⁺ leak channel, NALCN, Lu, Feng, 2012). Так нокдаун гена, кодирующего NALCN-подобные каналы (U-типа), приводит к гиперполяризации МПП и прекращению пейсмейкерной активности интернейрона RPed1, изолированного из ЦГМП дыхания обыкновенного

прудовика. Обратная принудительная деполяризация пейсмейкера на нормальный уровень (-45 мВ) восстанавливает ритмическую активность, но уже с несколько измененными частотными характеристиками. *In vivo* нокдаун гена, кодирующего у прудовика канал U-типа, вызывает снижение частоты дыхания примерно в 2 раза, а также незначительное уменьшение времени открывания пневмостома (Lu, Feng, 2011).

Сходные нарушения в ритмической двигательной активности обнаруживаются у мутантов дрозофилы по гену *na*, также кодирующего NALCN-подобные каналы (Krishnan, Nash, 1990; Nash et al., 2002). Показано, что животные с мутантными аллелями гена *na* – *har38* и *har85* – передвигаются урывками, делая несколько шагов, останавливаются, а потом снова начинают движение. Механические воздействия еще больше усиливают «неуверенность» в движении мух. У личинок, мутантных по *na*, существенно снижена миграция из освещенной области в темную. В работе Нэша с соавт. (Nash et al., 2002) было продемонстрировано существенное снижение во всех структурах мозга мух *har38* и *har85* количества белка, кодируемого геном *na*, и, кроме того, дополнительно были выявлены нарушения в ритме суточной активности. В дальнейшем Лир с соавторами (Lear et al., 2005) показал, что *na* экспрессируется в пейсмейкерных клетках, управляющих суточным ритмом, и что локальная экспрессия в этих клетках функционального гена *na* восстанавливает нормальную суточную активность мутантов *na^{har}*. При этом авторами отмечается роль этого гена именно в поддержании суточного ритма активности, а не ее интенсивности.

Многими авторами показано, что важным фактором эндогенной ритмической активности пейсмейкера является I_{NaP} , которые деполяризуют мембрану до порога ПД, а параметры инактивации этих токов определяют терминацию пачечной активности (Do, Bean, 2003; Wu et al., 2005; Enomoto et al., 2006; Tazerart et al., 2008). I_{NaP} являются чувствительными к тетродотоксину (ТТХ) токами, которые активируются при значениях мембранного потенциала ниже порога ПД и медленно инактивируются (Crill, 1996). Во многих исследованиях блокада натриевых каналов ТТХ, как, например, в вентральных мшистых клетках

гиппокампа, приводит к исчезновению I_{NaP} , прекращению ритмической пачечной активности и установлению стабильного МПП (Del Negro et al., 2002; Jinno et al., 2003; Koizumi, Smith, 2008). Следует отметить, что активация I_{NaP} возможна лишь при величине мембранного потенциала положительнее -70 мВ, т.е. как раз при значениях МПП, которые свойственны пейсмейкерным клеткам (Cepeda et al., 1995). В то же время высокая частота импульсации при пачечной активности достигается за счет **регенеративных токов натрия** (I_{NaR}), которые возникают на стадии реполяризации после пика ПД и которые облегчают (ускоряют) повторное появление импульса (Khaliq et al. 2003; Raman and Bean 2001).

Молекулярной основой устойчивого и регенеративного токов натрия, вероятнее всего, являются модальные (по механизму открытия ворот) изменения в проницаемости обычных потенциал-зависимых натриевых каналов, которые также обеспечивают быстрый входящий ток при возникновении ПД (Alzheimer et al., 1993; Taddese, Bean, 2002; Do, Bean, 2003). Потенциал-зависимые натриевые каналы представляют собой комплексы из порообразующих альфа-субъединиц и вспомогательных бета-субъединиц (Catterall, 2000). В мозге млекопитающих экспрессируется несколько различных альфа субъединиц, в том числе $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ и $Na_v1.6$ (Goldin et al., 2000). Раман с соавт. (Raman et al., 1997) в исследованиях на мышах, лишенных $Na_v1.6$, продемонстрировал существенное снижение I_{NaP} и I_{NaR} в клетках Пуркинье мозга. Временная экспрессия $Na_v1.1$, $Na_v1.2$ и $Na_v1.3$ в культуре клеток приводит к появлению I_{NaP} , величина которого при этом может усиливаться коэкспрессией бета-гамма-субъединицы G-белка, связывающей $Na_v1.1$ и Na_v2 . (Chen et al., 2000; Mantegazza et al., 2005). Активность субъединиц $Na_v1.1$ и Na_v2 , но не $Na_v1.6$, также регулируется путем фосфорилирования протеинкиназой A при запуске внутриклеточных каскадов через дофаминовые рецепторы (Smith, Goldin, 1998; Catterall, 2000; Maurice et al., 2001). Также выявлена роль бета субъединицы $Na_v\beta4$, которая вероятно блокирует открытые натриевые каналы, обеспечивая появление входящего тока на стадии реполяризации после ПД (Bant, Raman 2010). Нокдаун гена *Scn4b*, кодирующего $Na_v\beta4$ в гранулярных клетках мозжечка приводит к существенному снижению I_{NaP}

и I_{NaR} и изменению их свойств. Вместе с тем не во всех нейронах, экспрессирующих *Scn4b*, регистрируется I_{NaR} (Aman et al., 2009). Таким образом, существующие различные сочетания и соотношения альфа- и бета-субъединиц в составе натриевых каналов могут приводить к огромному разнообразию функциональных характеристик импульсной активности, в том числе и варьированию паттернов пейсмейкерной активности.

Во многих работах отмечается, что блокада высокопороговых кальциевых токов лишь незначительно влияет на спонтанную активность нейронов, так как их величина, как правило, существенно меньше натриевых токов (Do, Bean, 2003; Taddese, Bean, 2002; Jackson et al., 2004). Однако в настоящее время обнаружены нейроны, чья ритмическая активность в большей степени зависит от кальциевых токов (L- и P/Q- типа) и блокада которых ТТХ не приводит к прекращению импульсации. Также следует отметить, что МПП в этих случаях имеет более отрицательные значения, нежели в пейсмейкерах с натриевым механизмом спонтанной импульсации (Puorolo et al., 2007).

Отдельно стоит упомянуть **низкопороговые токи кальция Т- типа** (I_{Ca-T}), которые возникают после гиперполяризации мембраны при незначительных изменениях потенциала за счет каналов $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$ (Perez-Reyes, 2003) и приводят к постингибиторной активации, обеспечивая устойчивую попеременную активность ингибирующих друг друга антагонистических групп нейронов ЦГМП (Fan et al., 1999; Angstadt et al., 2005; Anderson et al., 2012). Наличие медленно и быстро инактивирующихся I_{Ca-T} объясняет участие этих токов как в реализации пачечной активности, так и в ее терминации. Показано, что временные параметры инактивации низкопороговых токов кальция определяют длительность пачки импульсов в сердечном генераторе пиявки (Olypher et al., 2006).

Другим источником постингибиторной активации являются устойчивые токи натрия, активируемые гиперполяризацией, I_h (Sekirnjak, du Lac 2002; Robinson, Siegelbaum, 2003), которые возникают за счет активации катионных неселективных HCN-каналов (hyperpolarization-activated, cation nonselective). Показано, что I_h могут обеспечивать деполяризационный сдвиг на мембране для

запуска I_{Ca} Т-типа (Bal, McCormick, 1997), а параметры активации I_h влияют на величину периода пачечной активности (Sorensen et al., 2004). Увеличение/уменьшение в клетке уровня циклического аденозинмонофосфата и гуанозинмонофосфата (цАМФ и цГМФ) при действии различных нейромедиаторов приводит к смещению порога открытия HCN-каналов в сторону положительных/отрицательных значений МПП, облегчая/затрудняя включение I_h (Robinson, Siegelbaum, 2003). Интересно, что действие цАМФ/цГМФ на I_h достигается за счет непосредственного связывания с HCN-каналами, а не путем фосфорилирования белков (DiFrancesco, Tortora, 1991). У млекопитающих обнаружено 4 изоформы субъединиц, образующих HCN-каналы (HCN1-HCN4) с различными функциональными характеристиками (Santoro et al., 2000). Уровень и локализация экспрессии генов, кодирующих различные HCN-изоформы, существенно варьирует в мозге мышей и крыс (Monteggia et al., 2000; Notomi, Shigemoto, 2004), что, видимо, и приводит к функциональной гетерогенности I_h (Robinson, Siegelbaum, 2003).

На свойства ионных каналов, определяющих активность нейронов ЦГМП, оказывает влияние внеклеточное окружение, вследствие чего нейрон может функционировать в определенных условиях как пейсмейкерный и проявлять пейсмейкерные свойства в других условиях. Важную роль в индукции, усилении, подавлении пейсмейкерных свойств играют **нейромодуляторы**, такие как глутамат, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), ацетилхолин, биогенные амины, нейропептиды и NO (Ramirez et al., 2004; Marder et al., 2006). Например, эндогенно высвобождаемый серотонин необходим для генерации пачечной активности в пейсмейкерах респираторной сети в срезах ствола мозга мыши (Peña, Ramirez, 2002), а действие вещества Р на эти пейсмейкеры усиливает активность последних (Peña, Ramirez, 2004).

В стоматогастрическом ганглии ракообразных серотонин и дофамин вызывают пачечную импульсацию нейрона АВ за счет увеличения соответственно натриевых и кальциевых токов в мембране (Ayali, Harris-Warrick, 1999). В сети отростков нейрона АВ лангуста дофамин вызывает высвобождение кальция из

внутриклеточных депо непосредственно перед появлением колебаний мембранного потенциала. Данный эффект блокируется антагонистами каналов рианодиновых (RyR) и инозитолтрифосфатных (IP₃R) рецепторов, а также кальциевого насоса (SERCA). Выброс кальция из депо приводит к усилению кальций-зависимого входящего тока (I_{CAN}) и уменьшению потенциал-зависимых кальциевых токов в АВ (в LP и PD I_{CAN} не изменялись). Предполагается, что связывание дофамина с рецепторами D_{1αPan} и D_{1βPan} активирует сигнальные каскады (Gq - фосфолипаза C - IP₃R/Gs - цАМФ - протеинкиназа A - RyR), которые вызывают увеличение концентрации кальция внутри клетки с последующей деполяризацией МПП и запуском пачечной активности нейрона АВ (Kadiri et al., 2011). Кроме усиления I_{CAN} действие дофамина в нейроне АВ сопровождается также уменьшением I_A и усилением I_h , что ускоряет деполяризацию мембраны (Pesk et al., 2001, 2006). Модуляция дофамином кальциевых и калиевых токов через рецепторы D₁ в нейронах LP также приводит к увеличению возбудимости клетки. В то же время активность нейрона PD подавляется дофамином, так как его действие на PD опосредуется рецепторами D₂ (Zhang et al., 2010), для которых установлено, что они связаны с белком Gi/o (Perez et al., 2006).

Похожие закономерности выявлены и у круглых червей *Caenorhabditis elegans*, мутации IP₃R у которых замедляют или останавливают ритмическую дефекацию, в то время как сверхэкспрессия наоборот ускоряет ритм. В клетках кишечника у мутантов были выявлены колебания уровня кальция, которые имели период ритмической дефекации, при этом максимум в уровне кальция достигался непосредственно перед первым мышечным сокращением (Dal Santo et al., 1999).

Для IP₃R также показано их участие не только в инициации и реализации ритмических действий, но и в формировании нервных сетей, обеспечивающих ритмический моторный выход. Так, например, установлено, что мутанты дрозофилы по гену *itpr*, кодирующего IP₃R, не способны к полету, хотя при этом демонстрируют нормальные показатели в тесте на отрицательный геотаксис при движении в трубке, а также способны совершать прыжки. Регистрация активности группы не прямых мышц полета показала увеличенную спонтанную импульсацию

и отсутствие ритмического паттерна полета в ответ на обдув воздухом. Сверхэкспрессия аллеля *itpr* дикого типа в моноаминергических нейронах мутантов восстанавливала паттерн полета. Включение экспрессии аллеля *itpr* дикого типа у мутантов на разных этапах развития показало, что нарушения полета возникают в случае отсутствия экспрессии рецептора в первые 48 часов развития на стадии куколки (Banerjee et al., 2004).

Другим хорошо изученным объектом с точки зрения нейромодуляторного воздействия на молекулярном уровне является **нервная сеть миноги, управляющая плаванием** (Рисунок 7). Работа этой сети запускается глутаматергическими ретикулоспинальными нейронами, которые возбуждают все типы спинальных интер- и мотонейронов (Ohta, Grillner, 1989).

Функционирование ЦГМП плавания в отдельном полусегменте основано на активности ипсилатеральных глутаматергических интернейронов, оказывающих возбуждающее действие через AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole

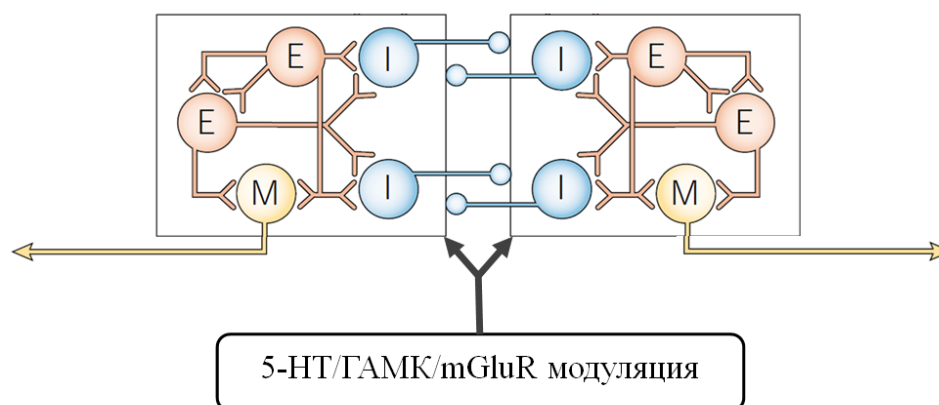


Рисунок 7. Нервная сеть миноги, управляющая плаванием. Все символы нейронов обозначают группы нейронов. Возбуждающие глутаматергические интернейроны (E) возбуждают все типы спинальных нейронов. Ингибиторные глицинергические интернейроны (I) ингибируют все типы нейронов на контралатеральной стороне. М - мотонейроны. Во время плавания также активируются рецепторы серотонина (5-HT), ГАМК и метаботропные рецепторы глутамата (mGluR), которые являются неотъемлемыми компонентами нервной сети (Grillner, 2003).

propionic acid) и NMDA-рецепторы друг на друга и на ипсилатеральные моторные нейроны, а также, на глицинергические нейроны, ингибирующие контралатеральные нейроны (Buchanan, Grillner, 1987; Parker, Grillner, 1999, 2000).

G-белок опосредованные системы также интегрированы в нормальное функционирование локомоторной сети миноги. Моноаминергические нейроны спинного мозга активны во время фиктивной локомоции (в изолированном препарате) и влияют на паттерн пачечной активности через рецепторы 5-HT_{1A} на интер- и мотонейронах (Schotland et al., 1995; Zhang, Grillner, 2000). Блокирование этих рецепторов приводит к ускорению моторного паттерна и часто сопровождается снижением регулярности. Хотя серотонинергические нейроны демонстрируют во время плавания фазную пачечную активность, 5-НТ действует через медленную G-белок опосредованную модуляцию следовой гиперполяризации (sAHP, slow afterhyperpolarization) и синаптической эффективности (Schotland et al., 1995; Wikström et al., 1995; Parker, Grillner, 1999; Zhang, Grillner, 2000). В частности, действие серотонина поддерживает высокую амплитуду тормозных постсинаптических потенциалов, возникающих последовательно друг за другом (Harris-Warrick, Cohen, 1985). Во многих других исследованиях на позвоночных также показано, что серотонин поддерживает регулярный моторный паттерн, хотя у некоторых видов эта модуляция зависит в основном от нисходящих проекций (Sillar et al., 1995; Dale, Kuenzi, 1997; Rossignol et al., 1998; Schmidt, Jordan, 2000).

ГАМК-система в спинном мозге миноги также активна во время плавания, однако блокирование ГАМК-рецепторов не препятствует локомоции миноги. Блокирование рецепторов GABA_A и GABA_B, как и в случае с серотонином, вызывает ускорение пачечной активности (Alford et al., 1991; Tegner et al., 1993; Tegner, Grillner, 1999). Действие ГАМК-рецепторов на работу генератора связано отчасти с пресинаптическим торможением интернейронной синаптической передачи и отчасти с влиянием на кальциевые каналы, что отражается на динамике следовой гиперполяризации (Matsushima et al., 1993). Сходная роль

ГАМК-систем в работе локомоторной сети обнаруживается и у головастика после вылупления (Reith, Sillar, 1999).

Глутамат в плавательном генераторе миноги действует через пре- и постсинаптические метаботропные рецепторы. Постсинаптические рецепторы mGluR1 ускоряют локомоторную активность, блокада этих рецепторов замедляет плавание. mGluR оказывают действие на NMDA-рецепторы, а также блокируют токи утечки. Ток через NMDA-рецепторы увеличивает частоту пачек за счет входа кальция в клетку, который активирует Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы, что приводит к более ранней терминации пачки импульсов. Эффект активации mGluR1 на работу сети снижается при действии антагонистов каннабиноидных рецепторов (Krieger et al., 2000; Grillner, 2003).

В плавательном генераторе миноги обнаружена также **пептидергическая модуляция**. Некоторые моноаминергические нейроны средней линии экспрессируют тахикинины (Van Dongen et al., 1986; Schotland et al., 1995). 10-минутное воздействие тахикининов (вещества Р) на плавательную сеть вызывает длительное (24 часа) и выраженное усиление темпа моторного паттерна (Schotland et al., 1995; Parker et al., 1998). Введение антагонистов D_2 -рецепторов приводит к сходному длительному увеличению темпа локомоции, и данный эффект блокируется антагонистами тахикининов. Длительность эффекта усиления первоначально (в течение часа) обеспечивается потеннциацией NMDA-рецепторов через активацию протеинкиназы С, а затем подключаются процессы связанные с синтезом белков и РНК. Кроме вещества Р влияние на работу плавательного генератора оказывают также такие пептиды как соматостатин, нейротензин, нейропептид Y (Parker, 2000; Grillner et al., 2001).

Интересные данные получены о влиянии **аденозинтрифосфата (АТФ)** и аденозина на работу плавательного генератора у головастика. Головастики плывут рывками по несколько секунд. В начале каждого рывка АТФ высвобождается и оказывает возбуждающий эффект на нервную сеть генератора через рецепторы P_2Y . Во время плавания АТФ преобразуется в аденозин, который, в свою очередь, оказывает тормозное действие на сеть через рецепторы P_2Y

вследствие открытия калиевых каналов. Таким образом, контролируется длительность плавательных рывков (Dale, Gilday, 2000).

Как мы видим на примере миноги и ракообразных, активность пейсмейкерных клеток находится под постоянным влиянием большого количества активных веществ, которые при этом могут иметь как внутрисетевые, так и внесетевые источники и сразу несколько точек приложения (Marder, Bucher, 2007). Вследствие этого изоляция нейронов ЦГМП от модуляторных влияний также приводит к существенным изменениям активности. В частности, при отделении стоматогастрического ганглия ракообразных от нисходящих модуляторных входов пропадает ритм привратника желудка (пилорический). Тем не менее, если препараты содержать в стерильных условиях *in vitro*, то через несколько дней пилорический ритм восстанавливается, но теперь уже в отсутствие нейромодуляторных входов (Luther et al., 2003). Процесс восстановления блокируется ингибиторами синтеза мРНК (Thoby-Brisson, Simmers et al., 2000) и связан с возрастающей возбудимостью PD нейронов (Thoby-Brisson, Simmers et al., 2002).

Основная версия, которая выдвигается для объяснения **восстановления активности**, заключается в том, что нейроны РЖГ обладают механизмом детекции уровня активности и изменяют при необходимости ионные потоки на мембране посредством изменений в экспрессии генов каналов и других агентов, влияющих на возбудимость (LeMasson et al., 1993; Liu et al., 1998). Не исключается и прямое действие выключения нейромодуляторных влияний на регуляторные механизмы импульсной активности клетки (Zhang, Golowasch, 2011). Так, введение в нейроны PD мРНК гена *shal*, который кодирует субъединицу K(v)4 калиевых каналов, опосредующих кратковременные токи калия I_A (Baro et al., 1996), приводит к усилению I_A в этих нейронах, но при этом не влияет на паттерн импульсации (MacLean et al., 2003). Отсутствие изменений в возбудимости при введении *shal* объясняется компенсаторной положительной регуляцией I_h . Однако такая же положительная регуляция I_h происходит, когда экспрессируется неактивная форма гена *shal*, что подтверждает наличие прямого

молекулярного механизма компенсаторных изменений в нейроне, несвязанного с его импульсной активностью (MacLean et al., 2005). Данная взаимосвязь между двумя токами не является реципрокной, так как введение мРНК гена *PAIH*, который кодирует у лангуста субъединицу каналов, опосредующих I_h , не приводит к изменениям I_A и вызывает отклонения в паттерне активности (Zhang et al., 2003).

Представленные выше данные свидетельствует о том, что идет интенсивное исследование молекулярных основ работы и развития ЦГМП, однако возможности исследователей во многих случаях ограничены методической базой, применяемой на изучаемых объектах.

1.4 Дрозофила как модельный объект в исследованиях молекулярно-генетических механизмов моторной активности

Drosophila melanogaster обладает простой нервной системой и является модельным объектом, для которого разработаны уникальные по своим возможностям генетические методы. Использование дрозофилы уже внесло существенный вклад в понимание механизмов реализации моторных функций, в том числе и механизмов функционирования и управления работой ЦГМП (см. выше Banerjee et al., 2004; Nash et al., 2002). Важно что, наличие сходства на молекулярном уровне в функционировании нервной системы позвоночных и насекомых позволяет переносить выявляемые на дрозофиле закономерности на более сложные объекты (Marder, Bucher, 2001; Fradkin et al., 2010).

Плодовитость дрозофилы, короткий период развития, простота массового содержания явились причиной широкого использования в научных исследованиях **скрининга коллекций линий дрозофилы** по поведенческим, физиологическим, нейроанатомическим и другим параметрам, на изучение которых направлено исследование. Коллекции линий, несущих разнообразные фенотипические отклонения, создаются путем **химического и Р-инсерционного (пи-инсерционного) мутагенеза** и могут содержать до нескольких тысяч линий.

В качестве химического мутагена в экспериментах на дрозофиле и других животных широко используется этилметансульфонат (ethyl methanesulfonate, EMS). Он вызывает точечную замену пары оснований GC на пару оснований AT, вероятней всего, вследствие алкилирования гуанина и возникновения O⁶-этилгуанина, который при репликации связывается в комплементарной цепи с деокситимидилатом (Snow et al., 1984; Pastink et al., 1991). Данный подход был использован, например, Страуссом и Хейзенбергом (Strauss, Heisenberg, 1993) для выяснения поведенческой значимости центрального комплекса мозга. Ими был проведен гистологический скрининг коллекции, полученной с использованием EMS, на наличие структурных нарушений в центральном комплексе мозга. Были отобраны 15 линий дрозофилы, в которых идентифицировали гены, затронутые мутациями. Все отобранные мутантные линии демонстрировали отклонения значений параметров двигательной активности (длительность, скорость, прямолинейность) при их сравнении с линиями дикого типа дрозофилы. В дальнейшем автоматизация регистрации и обработки параметров локомоции позволила выделить уже в поведенческом скрининге 230 мутантов с локомоторными отклонениями из почти 11 тысяч линий (Strauss, 2002). Из этих 230 линий было отобрано 30 линий с нарушениями центрального комплекса. Детальное исследование мутантных линий позволило установить роль структур центрального комплекса в определении временных, амплитудных и координационных параметров шага, типа походки, частоты побегов (см. ниже). Интересно, что базовая координация движения ноги не зависела от выявленных анатомических дефектов центрального комплекса (Strauss, 2002).

Другим распространенным методом генерации случайных мутаций у дрозофилы является введение в геном Р-элемента (Rubin, Spradling, 1982). В отличие от химического мутагенеза, при котором происходят множественные одиночные замены, здесь при определенных условиях вставка Р-элемента происходит в единственной точке, которую можно локализовать методами молекулярной генетики. Источником Р-элемента служит либо плаزمид, инъецированная в яйцо, либо геном одного из родителей, несущего Р-элемент.

При наличии фермента транспозазы Р-элемент вырезается из первоначального местоположения и встраивается в случайном участке генома. Встраивание Р-элемента может происходить как непосредственно в ген, так и между генами, что приводит к нарушению экспрессии гена или его регуляции. Отбор в потомстве мух, лишенных транспозазы, обеспечивает в дальнейшем стабильное положение инсерции, а наличие в составе Р-элемента маркерного гена, например, *white* (красноглазость), подтверждает его наличие в геноме.

В качестве примера можно привести работу Ямамото с соавт. (Yamamoto et al., 2008), которые использовали Р-инсерционный мутагенез в целях выяснения генетической архитектуры двигательной активности, инициированной резким стимулом, потряхиванием (стартл-реакция). Ими было протестировано 720 линий дрозофилы с одиночной инсерцией Р-элемента и было отобрано 267 линий с измененными показателями стартл-реакции. 15 мутантных линий, имеющих наиболее выраженные отклонения, были скрещены между собой для получения всех 105 возможных нерцепирующих двойных гетерозигот. Поведенческий и нейроанатомический анализ потомства позволил авторам выделить группу генов, формирующих частично перекрывающуюся генетическую сеть, которая определяет параметры стартл-реакции и формирование эллипсоидного тела и долей грибовидных тел.

Использование Р-элементов в работе с дрозофилой привело к разработке большого количества методов, существенно расширяющих возможности исследователей (Venken, Bellen, 2007). Удаляя из генома Р-элемент, можно получить **нокаутные линии** дрозофилы, когда в результате **неточной эксцизии** вместе с мобильным элементом удаляется фланговые участки ДНК, которые могут содержать кодирующие последовательности прилежащих к инсерции генов. При этом путем точной эксцизии того же Р-элемента исследователь получает идеальный контроль для нокаутных мух, имеющих с ним идентичный генотип за исключением частично или полностью делетированного гена. В случае точной эксцизии геномная последовательность восстанавливается и все эффекты, связанные с инсерцией должны исчезнуть. С помощью такого подхода Сарасвати с

соавт. (Saraswati et al., 2004) было установлено, что дрозофила с полученной в результате неточной эксцизии нуль-мутацией в гене, который кодирует фермент тирамин-бета-гидроксилазу (аллель $T\beta h^{nM18}$), демонстрирует сниженную локомоторную активность на стадии личинки. У мутантов с $T\beta h^{nM18}$ оказался снижен уровень октопамина (аналога адреналина млекопитающих) и увеличен уровень тирамина в сравнении с ревертантами (аллель $T\beta h^{rM6}$), у которых функция гена была восстановлена в результате точной эксцизии, а также в сравнении с мухами дикого типа. Запись активности сегментных нервов у мутантов с аллелью $T\beta h^{nM18}$ (Fox et al., 2006) выявила нарушения в посегментной координации нейрональной активности во время сократительной волны абдоминальных мышц стенки тела личинки дрозофилы. Ритмическая пачечная активность, которая возникает при локомоторных волнах, гораздо реже наблюдается у мутантов $T\beta h^{nM18}$ в сравнении с линией дикого типа. Большая часть пачек импульсов ассоциирована с изолированными, локальными, нераспространяющимися сокращениями. Вместе с тем, тактильная стимуляция головы или хвоста у мутантов вызывает нормальный ритмический паттерн и координированную волну сокращения тела. Авторы заключают, что биогенные амины вовлечены в инициацию и модуляцию координированной активности сегментных ЦГМП, ответственных за ползание личинок дрозофилы.

Интеграция Р-элементов в геном дрозофилы чаще всего происходит в области 5'-конца генов, непосредственно перед или после точки начала транскрибируемой последовательности (Bellen et al., 2004). Вследствие этого маркерные и другие гены в составе мобильного элемента могут попадать под управление регуляторных последовательностей того гена, в области 5'-конца которого произошла инсерция. Данное свойство Р-элементов используется в различных типах скринингов линий с так называемыми **энхансерными ловушками** (enhancer-trap screens), в которых экспрессия генов в составе Р-элемента в значительной степени соответствует пространственно-временному паттерну экспрессии гена, перед которым произошла инсерция (Bellen et al., 1990). Так, например, Ньюбай и Джексон (Newby, Jackson, 1993) в результате скрининга

P-инсерционных линий по наличию отклонений во временной динамике вылупления (вектор *P-lacW*) был выявлен мутант *lark*, у которого обнаруживалось более раннее вылупление личинок относительно контроля, при этом временная динамика суточной активности оставался в норме. Анализ экспрессии гена бета-галактозидазы в составе Р-элемента позволил установить, что транскрипционная единица, затронутая инсерцией, экспрессируется по всей нервной системе эмбриона и в определенных популяциях нервных клеток у взрослых мух. Данные, полученные путем оценки активности бета-галактозидазы, оказались в полном соответствии с оценкой экспрессии, выполненной методом *in situ* гибридизации.

Возможности применения Р-инсерций в исследованиях нервных функций дрозофилы были существенно расширены за счет сочетания методов мутагенеза и трансгенеза с системой **GAL4/UAS** (Brand, Perrimon, 1993). В данном подходе в составе Р-элемента, используемого в качестве энхансерной ловушки или носителя трансгенной конструкции (вектора), имеется ген, кодирующий дрожжевой транскрипционный фактор GAL4. Экспрессия *GAL4* может определяться энхансерами, регулирующими транскрипцию в области инсерции, либо может управляться дополнительными трансгенными регуляторными элементами в составе Р-элемента, которые пришиваются к *GAL4*. При скрещивании линии, несущей Р-элемент с *GAL4*, *P[GAL4]*, с линией, содержащей регуляторную последовательность UAS (upstream activation sequence), GAL4 связывается с промотором UAS, что приводит к активации экспрессии следующего за UAS трансгена. UAS и расположенный за ней трансген также располагаются в составе своего Р-элемента, но паттерн экспрессии в данном случае определяется GAL4 (Duffy, 2002). Система GAL4/UAS позволяет экспрессировать различные гены, используя одну и ту же GAL4 линию. Например, конструкции *UAS-lacZ* (Yang et al., 1995) или *UAS-gfp* (Brand, Dormand, 1995) могут быть использованы для идентификации клеток, в которых активен тот или иной энхансер (Рисунок 8). *UAS-tra* позволяет феминизировать клетки, а *UAS-reaper* – разрушать клетки, экспрессирующие *GAL4* (Ferveur et al., 1995; Stoleru et al., 2004). *UAS-shi^{ts}* может быть использован для эффективного и обратимого подавления активности

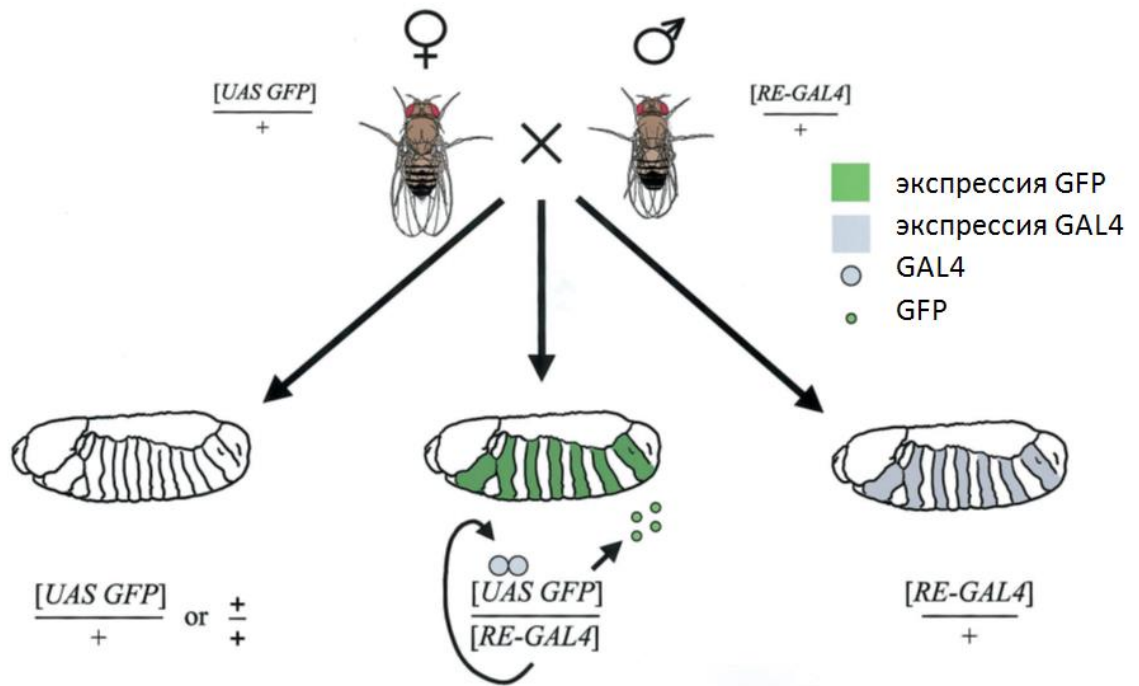


Рисунок 8. Экспрессия *GAL4* под управлением регуляторных элементов (RE) в чередующихся сегментах эмбриона дрозофилы запускает экспрессию гена флуоресцентного белка GFP, находящегося под контролем UAS (Duffy, 2002).

определенных нейронов (Park et al., 2003), а *UAS-TNT* предотвращает нейрональную передачу путем сверхэкспрессии гена легкой цепи столбчатого токсина, который разрезает белок синаптических везикул синаптобревин (Sweeney et al., 1995). Наличие конструкций с индуцируемым включением системы *GAL4/UAS* обеспечивает возможность структурно-функционального анализа фенотипических отклонений, вызванных активацией *GAL4/UAS* в специфических клетках строго на определенной стадии развития. В частности, Хан с соавторами (Han et al., 2000) продемонстрировал эффективное использование вместо *GAL4* химерного белка (*GAL.ER*), полученного путем сшивания лиганд-связывающего домена эстрогенового рецептора человека и ДНК-связывающего домена *GAL4*. Включение экспрессии трансгена, контролируемого UAS, происходит в данном случае лишь после связывания *GAL.ER* с эстрогеном, который попадает в организм мухи с пищей на этапе развития, определяемого исследователем (на стадии личинки или имаго).

Моран и Кириакоу (Moran, Kyriacou, 2009), используя подход по созданию линий дрозофилы с энхансерными ловушками в сочетании с системами *GAL4/UAS-TNT*, *GAL4/UAS-tra* и *GAL4/UAS-gfp*, смогли провести масштабное исследование нейрональных основ генерации песни ухаживания. Первоначально был выполнен скрининг 727 линий с инсерцией *P[GAL4]* на наличие дефектов в песне ухаживания. Затем эти линии были скрещены с линиями, содержащими *UAS-TNT* и *UAS-tra*, чтобы выяснить нарушается ли звукопродукция при прекращении нейрональной коммуникации или феминизации групп клеток, экспрессирующих *GAL4*. По результатам скрининга были отобраны 38 линий, которые были затем скрещены с линиями, содержащими *UAS-gfp*, для определения структур центральной нервной системы, опосредующих реализацию звукопродукции. Для 12 из 13 линий, которые демонстрировали выраженное ухаживание, но не «пели», была показана экспрессия *GFP* в грибовидных телах, в гигантских нисходящих нейрональных трактах и/или в личиночных межполушарных связях. Для 27 линий была установлена локализация инсерций, что позволило определить список генов-кандидатов на роль детерминант песенной активности, среди которых были гены, вовлеченные в сигналинг белков Ras и hedgehog, а также участвующие в мезоторакальном и аксональном процессах развития.

Огромные возможности, которые предоставляет исследователю система Gal4/UAS, привела к появлению большого количества работ с использованием данного метода в различных его модификациях. Вместе с тем, применение системы **Gal4/UAS имеет ряд ограничений и недостатков**. Прежде всего, следует учитывать, что активность Gal4 минимальна при 16°C, а при 29°C достигает максимального уровня, оказывая незначительный эффект на плодовитость и жизнеспособность животных (Duffy, 2002). В некоторых случаях экспрессия *GAL4* может приводить к дефектам развития и апоптозу клеток, в которых происходит синтез и накопление GAL4 (Kramer, Staveley, 2003), а также поведенческим отклонениям (Rezaval et al., 2007). Причиной подобных

нарушений, по данным Лиу и Лехмана (Liu, Lehmann 2008), может быть геномный ответ в дрозофиле, вызываемый синтезом GAL4.

Комбинация системы Gal4/UAS с технологией **РНК-опосредованной интерференции** (RNA interference, RNAi) привело к появлению мощного инструмента для анализа функций гена. В опытах с RNAi система GAL4/UAS используется для синтеза транскрипта, способного образовывать шпильку размером в 150-200 пар нуклеотидов. Процессинг шпильки приводит к формированию малых шпилечных РНК (shRNA, small hairpin RNA), подавляющих экспрессию генов, транскрипты которых имеют комплементарные к shRNA участки (Рисунок 9). Регуляция экспрессии гена, кодирующего предшественника shRNA, посредством GAL4 дает возможность локализовать нокдаун в определенных тканях либо привязать к определенной стадии развития животного (Dietzl et al., 2007).

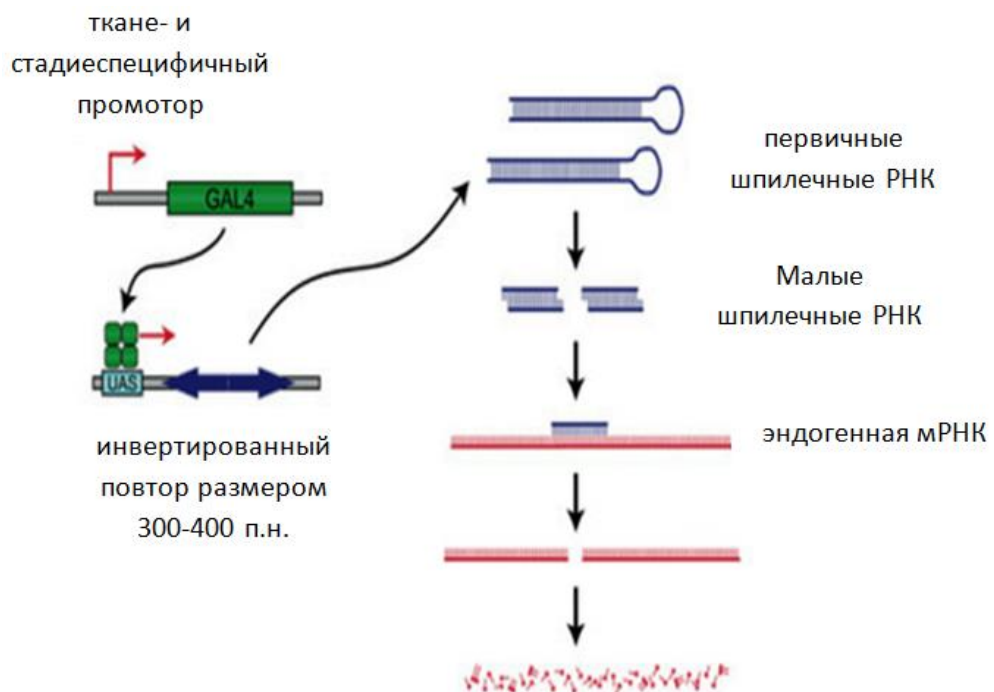


Рисунок 9. РНК-интерференция с использованием системы GAL4/UAS.

Используя RNAi, Уинтер с соавт. (Winther et al., 2006) проанализировали обонятельное восприятие и локомоторную активность мух *Drosophila*, у которых

был подавлен синтез в нервной системе пептидов, родственных тахикинину (tachykinin-related peptides, TKRPs). Было известно, что TKRPs модулируют ритмический моторный паттерн в РЖГ краба (Nusbaum et al., 2001; Swensen, Marder, 2001), однако данные *in vivo* о физиологической роли TKRPs в ЦНС отсутствовали. По результатам поведенческих тестов мухи, лишенные белка DTK, предшественника TKRPs, демонстрировали незначительные специфичные по запаху дефекты и усиление локомоторной активности. Выявленные отклонения были связаны авторами с возможными дисфункциями центрального комплекса, где наравне с обонятельными долями обнаруживается TKRP-иммунореактивный материал (Nassel, 2002) и нехватка TKRPs в котором нарушает поддержание и переход между состояниями локомоторной активности.

Представленные выше молекулярно-генетические методы исследования моторных функций разработаны и применяются преимущественно на дрозофиле, что определяет перспективность и диапазон подходов в исследовании ЦГМП на данном модельном объекте. В то же время на дрозофиле разработаны и интенсивно применяются электрофизиологические, морфологические, биохимические и биофизические тесты как и в исследованиях на других животных. Уникальность молекулярно-генетических подходов наряду с широтой и разнообразием общей методической базы, созданной для дрозофилы, дает неограниченные возможности в раскрытии закономерностей функционирования одного из самых сложных объектов биологии – нервной сети. В качестве примера можно привести работу, Маймон с соавт. (Maimon et al., 2010), которыми был разработан метод регистрации активности генетически идентифицированных нейронов во время «фиксированного» полета дрозофилы в динамическом визуальном поле. Используя данный метод, авторы, в частности, показали, что во время полета дрозофилы происходит деполяризация мембраны зрительных нейронов, вызванная торможением синаптических влияний, в результате чего возрастает ответ нейронов на зрительные стимулы.

1.5 Характеристика ритмических форм поведения дрозофилы

Наряду с возможностями, которые открываются исследователю при использовании огромного арсенала методов, разработанных на дрозофиле, данный модельный объект привлекателен и с точки зрения изученности различных форм поведения. Наиболее часто используемыми параметрами при анализе поведения дрозофилы являются параметры локомоции, звукопродукции и полета, детально рассмотренные в ряде работ (Strauss, Heisenberg, 1990; Martin et al., 1999; Попов и др. 2000; Tauber, Eberl, 2003, Lehmann, 2004). В то же время молекулярно-генетические и физиологические механизмы генерации моторного паттерна при реализации данных моторных функций остаются малоизученными и крайне малопонятными.

В исследованиях с **локомоторными тестами** на дрозофиле анализируются такие параметры как средняя скорость, траектория движений, длительность и частота побегов, реактивность, а также выполнение простых моторных заданий вроде подъема вверх по вертикальной поверхности (Branson et al., 2009; Slawson et al., 2009; Robie et al., 2010). Особую роль с позиций изучения локомоторных ЦГМП играет детальное описание параметров шага плодовой мухи, динамическая картина положения следов относительно тела (Strauss, Heisenberg, 1990; Wosnitza et al., 2012).

В отличие от позвоночных, дрозофила не переключается отчетливо с одной походки на другую, вместо этого она демонстрирует непрерывный спектр походок, которые коррелируют со скоростью бежки. Мухи в первую очередь используют трехногую походку (Рисунок 10), при которой в каждый момент времени передняя и задняя нога с одной стороны и средняя нога с другой опираются на поверхность (фаза опоры), а три остальные ноги переносятся над субстратом (фаза переноса) (Strauss, Heisenberg, 1990; Wosnitza et al., 2012). При снижении скорости бежки мухи начинают чаще использовать четырехногие и неканонические комбинации. В идеальной четырехногой бежке только 2 ноги находятся на стадии переноса, а остальные на стадии опоры (Рисунок 11). Две

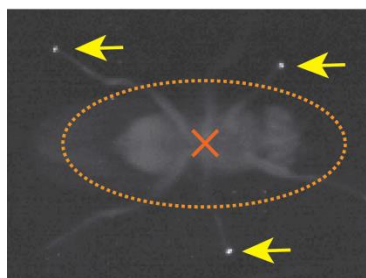


Рисунок 10. Кадр записи движения мухи, на которой видны световые точки, соответствующие точкам опоры трех ног (обозначены желтыми стрелками). Фоновый свет частично освещает тело мухи, очерченное овалом, центр которого обозначен крестом (Mendes et al., 2013).

ноги на стадии переноса располагаются на противоположных сторонах соседних сегментов торакса. Дополнительно при низких скоростях случайно возникают пятиногие комбинации, которые соответствуют так называемым волновой походке (wave gait), в которой ноги переносятся в виде волны от передней к задней (Wosnitza et al., 2012).

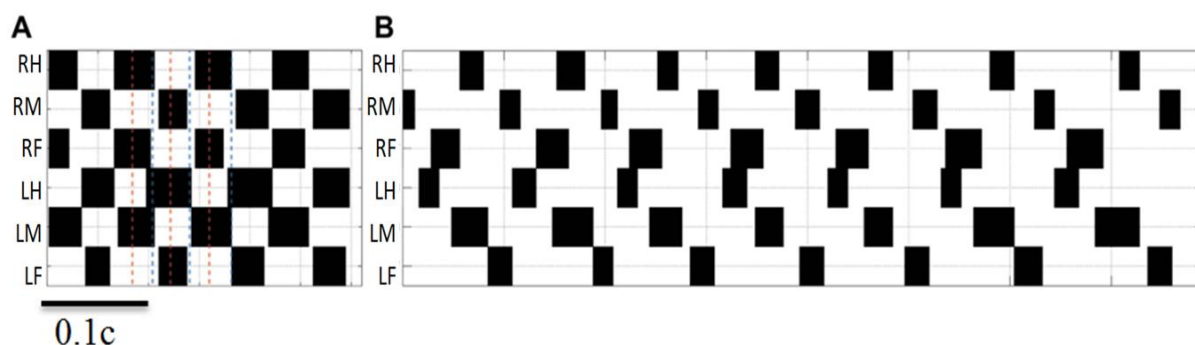


Рисунок 11. Паттерн шагов животного, движущегося со скоростью 44.7 (A) и 14.6 мм/с (B). Для каждого шага фаза переноса обозначена черным. Сверху вниз ноги: правая задняя (RH); правая средняя (RM); правая передняя (RF); левая задняя (LH); левая средняя (LM); левая передняя (LF) (Mendes et al., 2013).

Средняя скорость каждой мухи варьирует в диапазоне 7.2-44.7 мм/с (6-17 шагов/с) с наиболее представленным значением 28 мм/с и наименее представленным - 20 мм/с (Robie et al., 2010; Mendes et al., 2013), что напоминает

низкую представленность скоростей в диапазоне перехода между походками у людей и копытных (Hoyt and Taylor, 1981). При повышении скорости побежки длительность фаз опоры и переноса уменьшается, а длина шага увеличивается (Strauss and Heisenberg, 1990; Mendes et al., 2013).

Положение ног на неровной поверхности контролируется в первую очередь тактильными, но не визуальными стимулами (Strauss, 2002). Постановка ноги у дрозофилы происходит в точке, которой касалась на предыдущем шаге передняя ипсилатеральная нога. Совпадение следов выражено в большей степени при высоких скоростях побежки (>34 мм/с), нежели при медленном движении (<20 мм/с), и в целом с ускорением побежки уменьшается разброс координат следов относительно тела (Mendes et al., 2013).

Мендес с соавт. (Mendes et al., 2013) показали, что инактивация хордотонального органа и вызываемая экспрессией гена столбнячного токсина нейрональная инактивация значительной субпопуляции сенсорных нейронов в ногах мухи, приводит к замедлению побегов при сохранении типичной трехногой походки. Замедление побегов определялось увеличением длительности фаз опоры и переноса при шагании. Также увеличивалась длина шага, уменьшалось совпадение следов. Снижение скорости побежки мухи обнаруживается и при структурных нарушениях центрального комплекса мозга у мутантных линий дрозофилы. Снижение скорости в данном случае связано с отсутствием увеличения длины шага при повышении частоты шагания, в то же время фазовые отношения между ногами и длительность фаз соответствовала значениям параметров у мух дикого типа. Кроме того, мутанты с нарушениями центрального комплекса гораздо слабее реагируют на изменение стимулов во время полета и демонстрируют изменения в ориентации. Животные либо менее активны, либо их активность быстро снижается, они не способны начать движение в условиях, в которых мухи дикого типа с готовностью это делают, а сама побежка также сокращается по длительности (Strauss et al., 1992; Strauss, Heisenberg 1993; Martin, 1999). Удаление или блокирование активности грибовидных тел приводит к

увеличению длительности побегов, в то время как частота инициаций и другие параметры побежки остаются без изменений (Martin, 1998).

Данные о влиянии сенсорной депривации и дефектов мозга на параметры локомоции показывают сохранение во всех случаях координации ног в норме, что указывает на наличие в брюшной цепочке ЦГМП, способных автономно формировать программу движения ног при локомоции. Йеллман с соавт. (Yellman et al., 1997) установил, что нанесение биогенных аминов на разрезанную шейную коннективу обезглавленных мух стимулирует локомоцию и пренинг. Однако нервная сеть, формирующая паттерн локомоторных движений в брюшной цепочке, до сих пор не описана. Можно лишь отметить, что на настоящий момент охарактеризованы моторные нейроны, управляющие мышцами ног (их развитие, мышечная иннервация, дендритные разветвления), что обеспечивает возможность регистрации локомоторного паттерна на нейрональном уровне и дальнейшего приближения к нервным сетям генератора (Baek, Mann, 2009).

Более значительные успехи были достигнуты в изучении нейрональных механизмов генерации другой часто тестируемой формы ритмической активности дрозофилы - **песни ухаживания**. Самцы *D. melanogaster*, ухаживая за самками с целью копуляции, выполняют сложный ритуал, одним из элементов которого является вибрация отставленным в сторону крылом (Попов и др., 2000). Вибрируя крылом, мухи производят сменяющие друг друга звуки двух типов. Первый тип, синусоидальная песня, является периодичным звуком (жужжанием) с частотой 140-170 Гц. Второй тип, импульсная песня (ИП), состоит из повторяющихся посылок, построенных из 2-50 звуковых импульсов, каждый из которых содержит от 1 до 3 колебаний длительностью 5-6 мс (Рисунок 12). ИП является видоспецифичным сигналом, играющим, по-видимому, важную роль в изоляции видов дрозофилы (Ewing, Bennet-Clark, 1968; Waldron, 1964). По данным с Ричи соавт. (Ritchie et al., 1999) самки дрозофилы спариваются чаще и быстрее при стимуляции песней их собственного вида. Данный эффект в большей степени выражен у *D. melanogaster*, чем у *D. simulans*, что коррелирует со сниженной вариабельностью значений среднего МИИ у *D. melanogaster*. В процессе

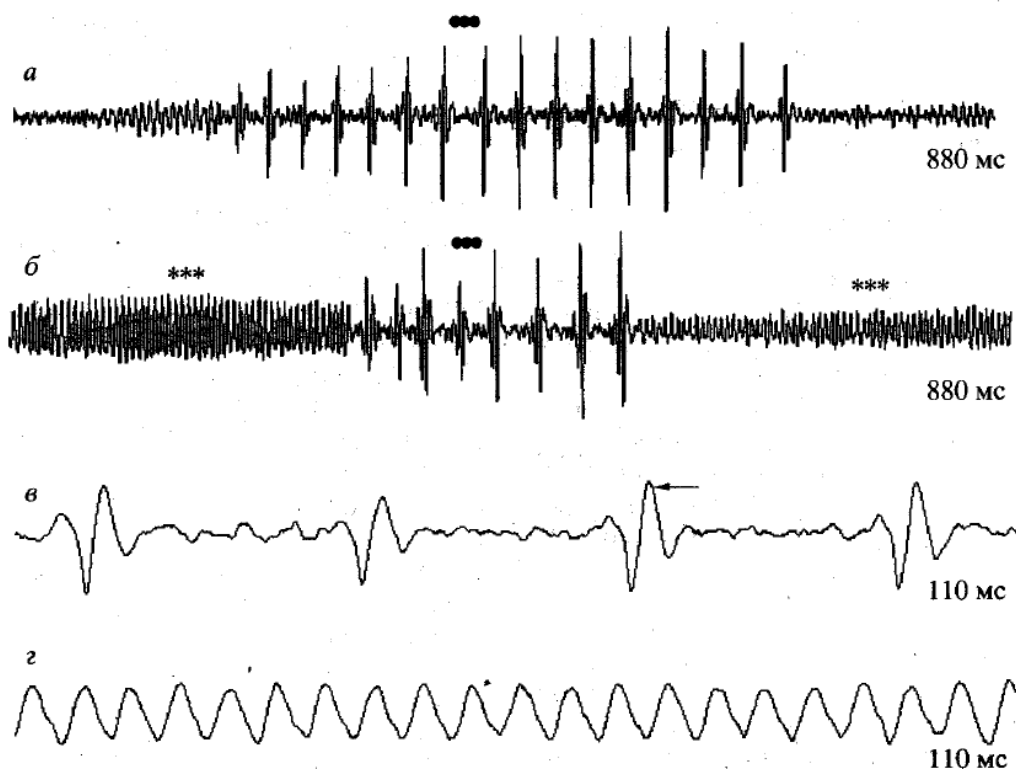


Рисунок 12. Песня ухаживания самца *D. melanogaster*.

а - посылка импульсного компонента (•••); б - отрезки синусоидального компонента (***) до и после короткой посылки импульсного компонента; в - отрезок импульсной посылки (стрелкой обозначен один пульс, состоящий из одного колебания); г - отрезок синусоидального компонента. Цифры обозначают длительность представленной осциллограммы. Объект ухаживания - девственная зрелая самка (Попов и др., 2000).

ухаживания межимпульсный интервал (МИИ) колеблется в основном в пределах 30-45 мс, но время от времени возникают значительно более длительные МИИ. Однако еще более важным по сравнению с вариабельностью среднего МИИ для увеличения скорости спаривания является наличие периодических колебаний среднего МИИ в последовательности импульсных посылок в процессе ухаживания (Kyriacou & Hall cycles).

Биофизика излучения песни ухаживания при вибрации крыльев детально изучена Беннет-Кларком и Юингом (Bennet-Clark, Ewing, 1968), а нервно-мышечный комплекс, ответственный за ее генерацию – в работах Юинга (Ewing,

1977, 1979a). Как и в полете, основная мощность при движении крыла в песне ухаживания обеспечивается непрямыми крыловыми мышцами, которые не крепятся непосредственно к основанию крыла. Вспомогательные и прямые крыловые мышцы контролируют выдвижение крыла, большинство параметров движения крыла, а также тайминг ИП (Рисунок 12).

Синусоидальная песня производится точно таким же образом как полет, но только с гораздо сниженной выходной мощностью. Во время синусоидальной песни не прямые мышцы полета стимулируются с более низкой частотой, чем во время полета и при ИП, в результате чего часть двигательных единиц остается бездействующими. Это обуславливает малую мощность, производимую мышцами, и объясняет низкую частоту и амплитуду крыловых движений в синусоидальной песне (Ewing, 1977; 1979a).

Звуковой импульс в ИП является результатом движения крыла вверх-вниз при сокращении не прямых мышц (Bennet-Clark, Ewing, 1968). ПД большинства вспомогательных мышц регистрируются между импульсами (Рисунок 13). Им приписывается роль депрессоров крыла либо деформаторов груди, сокращение которых обеспечивает натяжение дорсовентральных не прямых мышц и инициирует сокращение последних, что приводит к звукообразующему взмаху крыла вверх. Прямые базальарные мышцы импульсируют синхронно с движениями крыла (как в полете, так и в песне) и, вероятно, контролируют амплитуду взмаха, а также обеспечивают выдвижение крыла (Lehmann, Gotz, 1996). Стернобазальарная прямая мышца также импульсирует при движении крыла вверх во время ИП, но не функционирует при синусоидальной песне. Стернобазальарной мышце приписывается функция подавления крыловых колебаний, благодаря чему производятся одиночные импульсы с 1-2 циклами. Повреждение этой мышцы сопровождается появлением полициклических звуковых импульсов (Ewing, 1979a). Дорсальные продольные, вторые и третьи дорсовентральные, а также вспомогательные мышцы демонстрируют ПД за 18 мс перед каждым звуковым импульсом, в то время как дорсовентральные, базальарные и стернобазальарные мышцы импульсируют через 3 мс после начала каждого

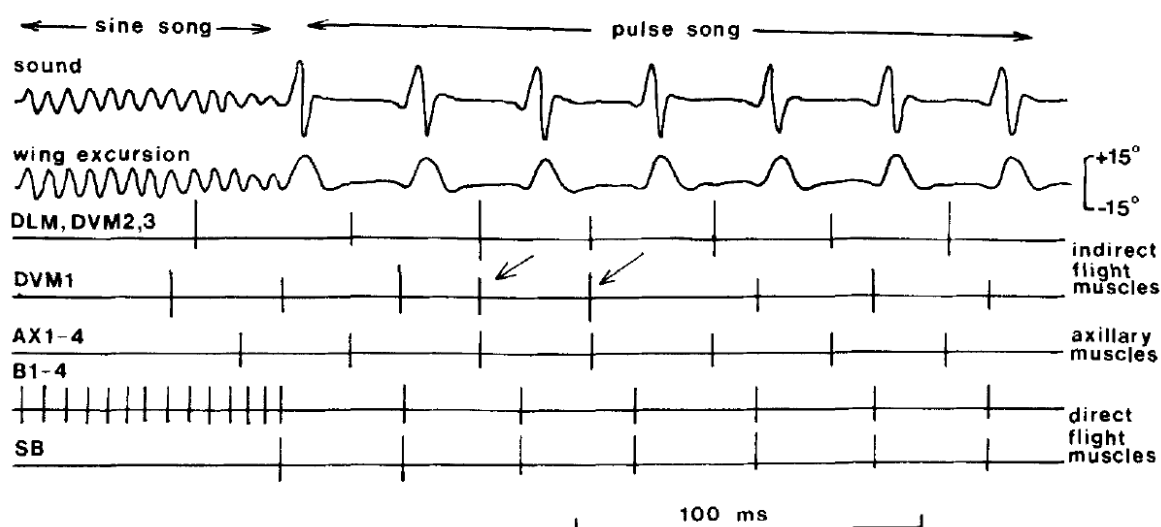


Рисунок 13. Временная динамика нейромышечных событий, ассоциированных со звукопродукцией. См. пояснения в тексте. Sine song – синусоидальная песня; pulse song – импульсная песня; sound – запись песни ухаживания; wing excursion – движения крыла. Регистрация потенциалов действия мышц: DLM, DVM2, 3 – дорсальные продольные и дорсовентральные мышцы 2, 3; DVM1 – дорсовентральные мышцы 1; AX1-4 – вспомогательные мышцы 1-4; B1-4 – базальные мышцы 1-4; SB – стернобазальные мышцы (Ewing, 19796).

импульса (Рисунок 13). Тайминг этих событий остается неизменным у мух с удаленными антеннами. Ухаживающие самцы с рудиментарными крыльями (мутация гена *vestigial*) в отсутствие движений оснований крыльев производят потенциалы не прямых мышц с интервалами соответствующими МИИ. Т.е. проприоцептивная обратная связь также не важна в определении интервалов между импульсами. Однако во время звукопродукции и полета тайминг потенциалов базальной мышцы становится нерегулярным. Кроме того, если крыло принудительно двигается с частотой отличной от таковой в полете, то базальные и, в меньшей степени, первые дорсовентральные мышцы демонстрируют активность, фаза которых зависит от принудительной частоты. По мнению Ewing (19796) эти результаты свидетельствуют в пользу того, что тайминг этих мышц, которые импульсируют в начале звукового импульса, устанавливается проприоцептивной обратной связью.

В норме только самцы производят песню ухаживания. Первые данные о нейрональных центрах, ответственных за звукопродукцию основаны на создании половых мозаиков (гинандроморфов), животных, у которых в одном организме перемежающиеся участки тела или клеточные популяции имеют генотип и признаки разных полов. Эти исследования показали, что область дорсального заднего мозга должна быть мужской для инициации песенной активности, а область мезоторакального ганглия – для обеспечения правильной песенной структуры (Hall, 1977; von Schilcher and Hall, 1979). Молекулярно-генетические подходы позволили еще точнее определить нейрональные сети ответственные за звукопродукцию. Почти все стороны развития половых различий у дрозофилы контролируются двумя генами: *fruitless (fru)* и *doublesex (dsx)*. Из них *fru* играет доминирующую роль в половой дифференциации нервной системы и поведения, включая песню ухаживания. Изоформа *fru* специфичная для самцов, *fruM*, необходима для песенной активности самца (Ryder et al., 1996; Villella et al., 1997). Экспериментальный синтез *fruM* у самок обеспечивает песенную активность также и у них (Demir, Dickson, 2005). Песни *fruM*-самок, однако, не являются совершенным исполнением песни самцов, но становятся такими при наличии изоформы *dsx*, специфичной для самцов (*dsxM*, Rideout et al., 2007). *dsxM* сама по себе не является ни необходимой, ни достаточной для звукопродукции (Taylor et al., 1994; Villella, Hall, 1996).

fruM экспрессируется в 2000 нейронах, распределенных небольшими группами по ЦНС самцов (Lee et al., 2000). Генетический доступ к этим нейронам был получен посредством направленного включения трансгена, кодирующего транскрипционные активаторы GAL4, *lexA* или FLP-рекомбиназу, в локус *fru* (Manoli et al., 2005; Stockinger et al., 2005; Mellert et al., 2010; Yu et al., 2010). Эти агенты используются, чтобы направлять экспрессию генетически кодируемых модуляторов активности нейронов, экспрессирующих *fru* у самцов или их двойников у самок. Подавление активности этих нейронов у самцов нарушает поведение ухаживания, включая и звукопродукцию (Manoli et al., 2005; Stockinger et al., 2005). Наоборот, запускаемая светом активация *fru*-нейронов у

обезглавленных мух обоих полов вызывает звукопродукцию и другие элементы поведения ухаживания (Clyne, Miesenbock, 2008).

Используя *fru*^{FLP} аллель, удалось разделить *fru*-нейроны на 100 различных нейрональных классов (Yu et al., 2010). фон Филиппсборн с соавт. (von Philipsborn et al., 2011) разработал систему генетического маркирования отдельных групп нейронов в каждом из ранее выделенных классов и применил стратегию тепловой активации этих нейронов для выяснения их роли в песне ухаживания. Авторами были идентифицированы 2 типа нейронов в мозге, P1 и pIP10, активация которых вызывает подлинную звукопродукцию без нарушений. pIP10 является нисходящим нейроном с аксональными окончаниями в мезоторакальном ганглии, а P1 вероятно является одним из входов pIP10. Три других типа нейронов в торакальных ганглиях, dPR1, vPR6 и vMS11, по-видимому, контролируют отдельные характеристики отведения крыла и песни ухаживания и по сути их можно рассматривать как компоненты торакального ЦГМП песни ухаживания, который контролируется сигналами от командных нейронов P1 и pIP10 (Рисунок 14). Нейроны P1, pIP10, и dPR1 специфичны для самцов, что может объяснить, почему самцы поют, а самки нет.

В противоположность нейронам P1 и pIP10 в мозгу, активация торакальных нейронов dPR1, vPR6 и vMS11 вызывает звукопродукцию с отклонениями, специфичными для каждого из этих трех типов нейронов. Нейроны dPR1 и vPR6 могут быть прямыми мишенями командного нейрона pIP10. Песни, индуцируемые активацией каждого из этих нейронов, имеют увеличенный МИИ. При этом для vPR6, но не для dPR1, МИИ обратно коррелирует с предполагаемым уровнем активации. Т.е. активность нейронов vPR6 может быть критической детерминантой МИИ. Третий торакальный песенный нейрон, vMS11, по-видимому, определяет выбор крыла и его выдвижение. Ипсилатеральная активация vMS11 приводит к выдвижению крыла, но не его вибрации. vMS11 возможно представляет один из выходных каналов ЦГМП импульсной песни, который интегрирует сигналы о начале звукопродукции из ЦГМП с нисходящими сигналами, сообщающими о местоположении самки, и передает информацию на

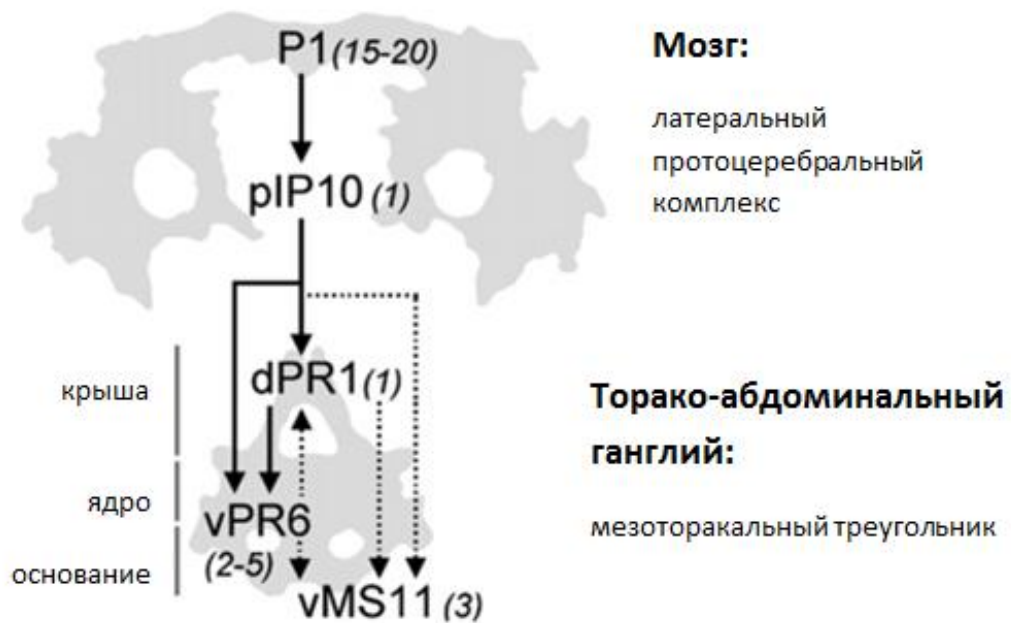


Рисунок 14. Предполагаемая нейронная сеть, связывающая *fru*-нейроны P1, pIP10, dPR1 и vPR6. Среднее число клеток в каждом полушарии указано в скобках (von Philipsborn et al., 2011).

мотонейроны, контролирующие положение соответствующего крыла. Другой выходной канал ЦГМП возможно несет ритмические сигналы, которые контролируют вибрацию крыла. Эксперименты с подавлением синаптической активности заставляют думать, что vMS11 также может контролировать количество циклов в импульсе. Частичное подавление активности vMS11, а также других торакальных *fru*-нейронов dMS2 и vMS12, приводит к уменьшению числа импульсов, большая часть которых является полициклическими.

В работе фон Филипсборн с соавт. (von Philipsborn et al., 2011) отмечается необходимость проведения электрофизиологических исследований роли нейронов, составляющих предполагаемую нейронную сеть, в звукопродукции. Кроме того, авторы указывают на возможность исследования роли генов, вовлеченных в звукопродукцию (Moran, Kyriacou, 2009) и, в целом, молекулярных механизмов в функционировании данной сети. Следует отметить, что данные о молекулярно-генетических механизмах развития и работы песенного ЦГМП практически отсутствуют.

По сравнению с дрозофилой, для которой представления о работе генераторов только начинают формироваться, для многих беспозвоночных животных дано исчерпывающее описание клеточной организации и механизмов функционирования центральных генераторов моторного паттерна (ЦГМП) различных форм ритмической деятельности (Arshavsky et al., 1998; Cymbalyuk et al., 2002; Marder, Bucher, 2007). Однако для модельных объектов с детально изученной морфофункциональной организацией ЦГМП, как правило, не существует готовых к использованию молекулярно-генетических методов, а также баз биоинформационных данных о генах и их продуктах. Вследствие этого сведения о молекулярных механизмах генерации моторного паттерна носят фрагментарный характер, а сама проблема остается крайне малоизученной. В последние годы появились работы, в которых были описаны отдельные молекулярные факторы, необходимые для генерации моторного паттерна разных форм ритмических движений (Marder, Bucher, 2007; Ping et al., 2010; Lu, Feng, 2012). Успех этих исследований связан во многих случаях с использованием плодовых мушек *Drosophila melanogaster* либо непосредственно в опытах с изучением их моторной активности (Banerjee et al., 2004; Nash et al., 2002; Ping et al., 2010), либо как источник биоинформационных данных о возможных молекулярных участниках работы и развития ЦГМП (Littleton, Ganetzky, 2000). Преимущество дрозофилы перед другими модельными объектами заключается в том, что для данного вида разработаны уникальные молекулярные и генетические методы, существенно расширяющие возможности исследования различных физиологических параметров, а также полностью секвенирован и подробнейше изучен его геном. Биоинформационный анализ позволяет оценивать функциональные свойства тех или иных структурных элементов генома и прогнозировать их роль в изучаемых процессах.

Исследование молекулярно-генетических основ генерации моторного паттерна ритмических движений у дрозофилы является актуальным и

перспективным, так как между классами насекомых и млекопитающих имеется определенное сходство между функциональными характеристиками молекулярных продуктов, кодируемых генами ортологами в этих двух таксонах (Fradkin et al., 2010; Ping et al., 2010; Xiong et al., 2012). Подобное сходство не только позволяет раскрывать ранее неизвестные молекулярные детерминанты исследуемых физиологических процессов, но и обеспечивает параллельное исследование этих процессов одновременно у млекопитающих и дрозофилы (Iijima-Ando et al., 2009; Mallik, Lakhotia, 2010; Read et al., 2009). Кроме того, стратегия развития в современной фармацевтике все больше разворачивается в сторону поиска и создания агентов, специфически влияющих на конкретные молекулярные компоненты, участвующие в патологических процессах, что связано с более высокой эффективностью лекарственной терапии и меньшим количеством побочных эффектов (Zheng et al., 2006).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Тестирование моторной активности мутантных линий

В исследовании использована коллекция мутантных линий *Drosophila melanogaster* (1064 линии, лаборатория сравнительной генетики поведения ИФ РАН), полученных методом Р-инсерционного мутагенеза (Cooley et al., 1988). Схема получения коллекции представлена на Рисунке 15.

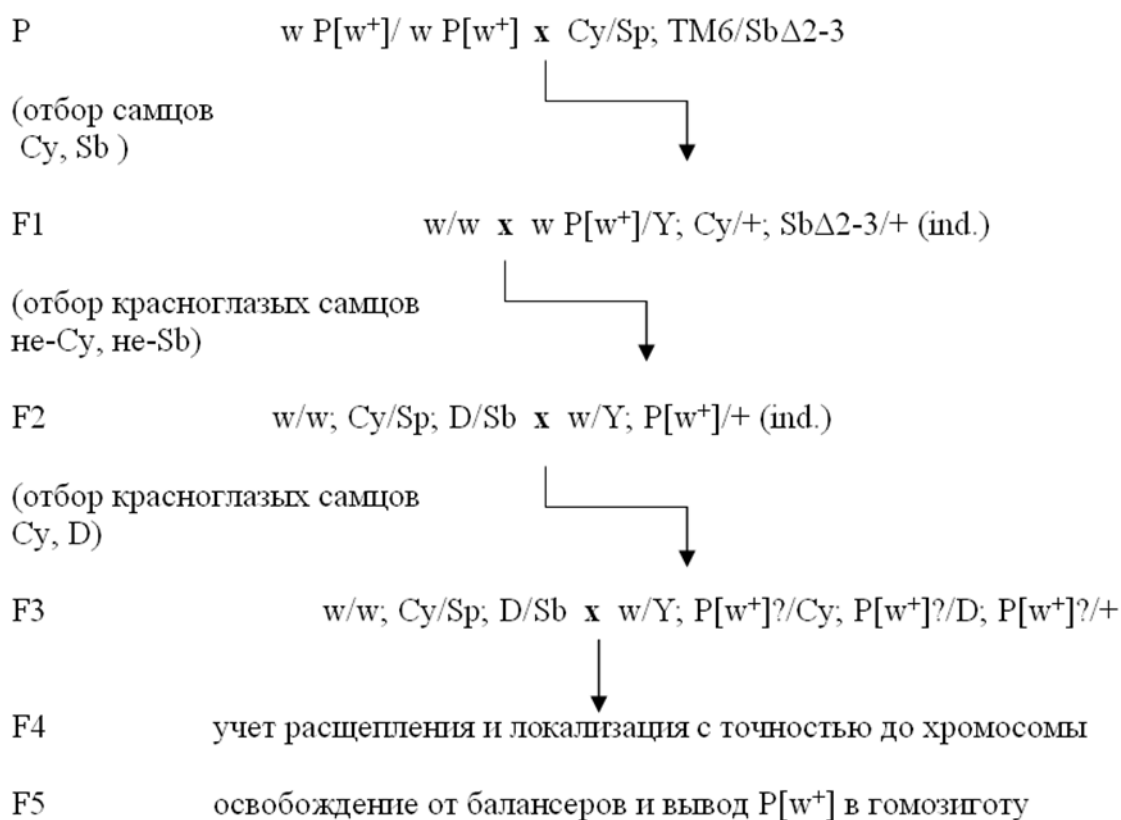


Рисунок 15. Создание коллекции линий со случайными инсерциями *PdL*-транспозона ($P[w^+]$). *Cy/Sp; TM6 SbΔ2-3* – родительская линия, экспрессирующая ген транспозазы.

Каждая тестируемая линия содержала одиночную случайную инсерцию Р-элемента (в некоторых случаях двойную) — *PdL*-транспозона (Landis et al., 2001) –

в одной из аутосом (Рисунок 16). В качестве контроля служила линия дикого типа Canton-S (CS).

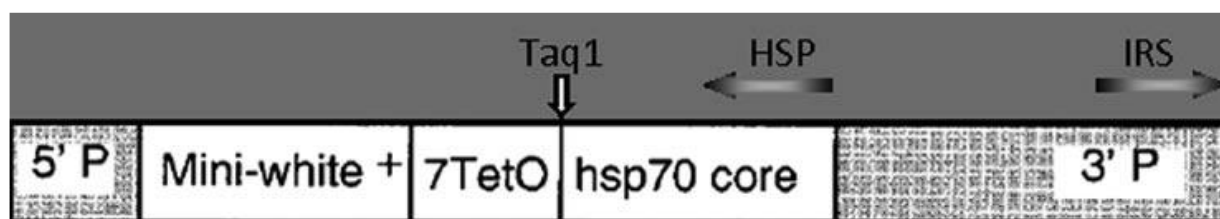


Рисунок 16. Структура *PdL*-транспозона. 5'- и 3'-концевые последовательности Р-элемента необходимые для транспозиции обозначены заштрихованными прямоугольниками. Показаны сайт рестрикции *Taq1* и праймеры, используемые в инвертированной ПЦР для амплификации фланговой последовательности геномной ДНК со стороны 3'-конца транспозона (см. пункт 2.2). Масштабы не соблюдены.

Мух разводили и содержали на стандартной изюмно-дрожжевой среде при 25°C и 12-часовом световом дне. Регистрацию двигательной активности и запись песни ухаживания проводили у трехсуточных самцов с 9.00 до 18.00 при $t = 25^\circ\text{C}$. Для измерения двигательной активности мух собирали под холодовым наркозом и содержали до опыта в группе по 30 особей. Запись двигательной активности одновременно 20-ти особей, каждая из которых находилась в отдельной плексигласовой камере (диаметр 15 мм, высота 5 мм), осуществляли с помощью двух веб-камер и программы *Drosophila tracks* (автор — Н. Г. Камышев) с частотой 10 Гц. Обработка данных выполнялась анализирующим модулем программы (Камышев, 2011), которая автоматически рассчитывала различные параметры локомоторного поведения (Таблица 1).

Для регистрации звукопродукции самцов собирали без наркоза и содержали до опыта индивидуально. Запись звуков осуществляли при ухаживании самца за оплодотворенной самкой линии CS. Регистрацию звукопродукции проводили по методу Попова и др. (2000). Установка для регистрации звукопродукции находилась в звукоизолированной комнате и включала в себя 4

Таблица 1. Основные параметры, по которым проводилось сравнение моторной активности мутантных линий с контрольной линией CS

Параметры локомоторного поведения	Параметры звукопродукции, характеризующие работу ЦГМП
<ul style="list-style-type: none"> • Индекс двигательной активности, время, занятое локомоцией, % • Длительность побежки, с • Частота побежки, n инициаций/100с • Средняя скорость побежки, мм/с 	<ul style="list-style-type: none"> • Индекс ИП, время, занятое ИП, % • Межимпульсный интервал, мс • Несущая частота импульса, Гц • Длительность отдельной посылки ИП, мс • Частота ИП, n инициаций/100с

высококчувствительных микрофона, каждый со своим усилителем, и аналого-цифровой преобразователь (АЦП) в составе компьютера. Для звукозаписи самца и самку помещали в специальные плексигласовые камеры, имеющие вместо дна тонкую решетку, камеры располагались непосредственно на микрофонах. Звукозапись велась одновременно по 4-м каналам с частотой 11025 Гц с помощью специально созданного программного обеспечения для АЦП. Программа DCSA (Drosophila courtship song analysis, автор – Н. Г. Камышев) автоматически распознавала импульсный (ИП) и синусоидальный компоненты песни самца (Рисунок 17), и рассчитывала различные параметры песни ухаживания (Таблица 1).

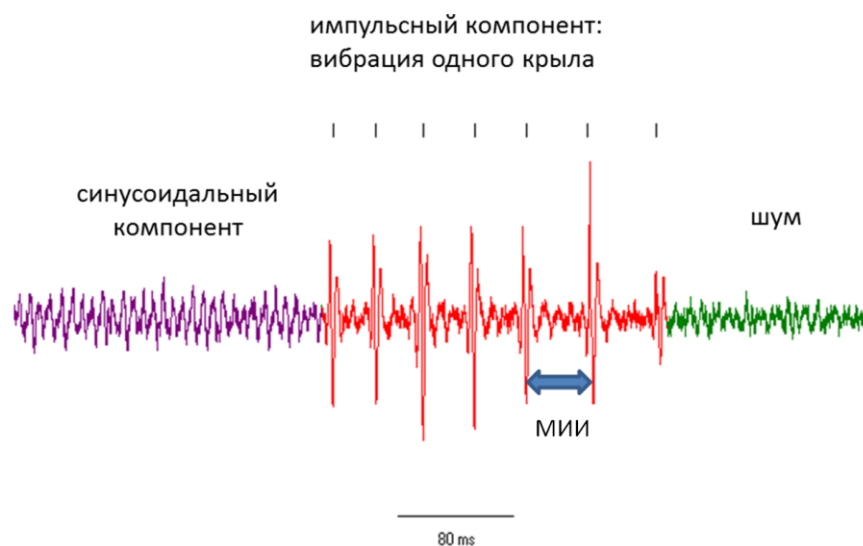


Рисунок 17. Участок записи песни ухаживания самца дрозофилы. МИИ – межимпульсный интервал.

Статистический анализ параметров локомоторной активности и звукопродукции проводили тестом рандомизации (Welch, 1990) в аналитическом модуле программы *Drosophila courtship Lite* (автор – Н. Г. Камышев), корреляционным и кластерным анализами (Jain et al., 1999; Taylor, 1990) в программе Statistica 8.0 (StatSoft).

2.2 Определение локализации и направленности *PdL*-транспозона в геноме

ДНК выделяли из 10 самок каждой мутантной линии. Для этого мух замораживали (-20°C , 5 минут), гомогенизировали в 200 мкл лизирующего буфера (0.1M NaCl, 6.8% сахара, 0.1M Трис-HCl, pH 8.5, 0.05M этилендиаминтетрауксусная кислота, 0.5% лаурилсульфат натрия, 0.5% диэтилпирокарбонат), инкубировали лизат 30 минут при 65°C , добавляли в лизат 300 мкл ацетата натрия (pH 5.2), перемешивали, инкубировали на льду 30 минут и центрифугировали в течение 10 минут при 12100 g. Полученный супернатант переносили в новый эппендорф и осаждали ДНК равным объемом 96% этанола с последующим центрифугированием. Осажденную ДНК промывали 75% этанолом, центрифугировали, подсушивали в термостате (10 минут, 37°C), растворяли в 0.01M Трис-HCl, pH 7.5 и помещали на хранение при -20°C .

Для амплификации фланговой последовательности геномной ДНК, примыкающей к месту вставки *PdL*-транспозона, использовали метод инвертированной ПЦР (Рисунок 18). Выделенную ДНК в количестве эквивалентном трем мухам расщепляли рестриктазой TaqI или BstKTI (СибЭнзим) при 65°C в течение 2-х часов, а затем проводили лигирование фрагментов ДНК самих на себя Т4-лигазой (СибЭнзим) при 4°C на протяжении 16 часов. После рестрикции и самолигирования ДНК осаждали тремя объемами 96% этанола с последующим центрифугированием. Полученный осадок подсушивали в термостате (10 минут, 37°C), растворяли в бидистиллированной воде и использовали в качестве матрицы в ПЦР. ПЦР-амплификацию осуществляли с

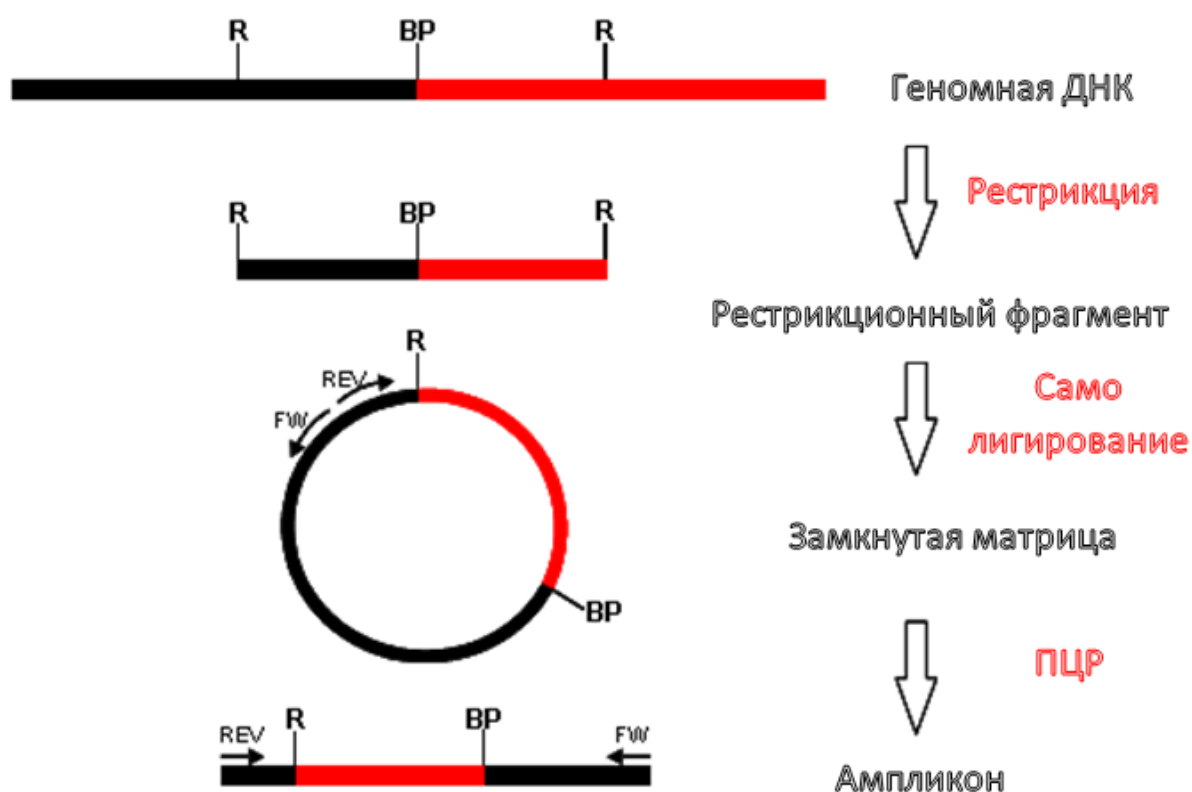


Рисунок 18. Схема проведения инвертированной ПЦР. Красный участок – фланговая геномная ДНК, черный – 3'-конец транспозона. R – сайты рестрикции; BP – точка инсерции; FW – прямой праймер (IRS); REV – обратный праймер (HSP).

использованием праймеров HSP (CTGCAGATTGTTTAGCTTGTTTC) и IRS (CGGGACCCACCTTATGTTAT) в термоциклере «Veriti» (Applied Biosystems) при следующих условиях: 95°C (3 мин.)×1; [95°C (30 с), 53°C (30 с), 72°C (60с)]×35; 72°C (7 мин.)×1. Количество продуктов ПЦР определяли методом ДНК-электрофореза в 1% агарозном геле. Для визуализации ДНК после проведения электрофореза гель погружали на 30 минут в раствор этидия бромид в концентрации 0.5 мкг/мл, промывали в дистиллированной воде и затем проводили фотосъемку флуоресцентного сигнала от ПЦР-продуктов на трансиллюминаторе. Для последующего анализа отбирали пробы из мутантов с единственным ПЦР-продуктом, что указывало на наличие в геноме соответствующей линии наличие одиночной инсерции *PdL*-транспозона (Рисунок 19).

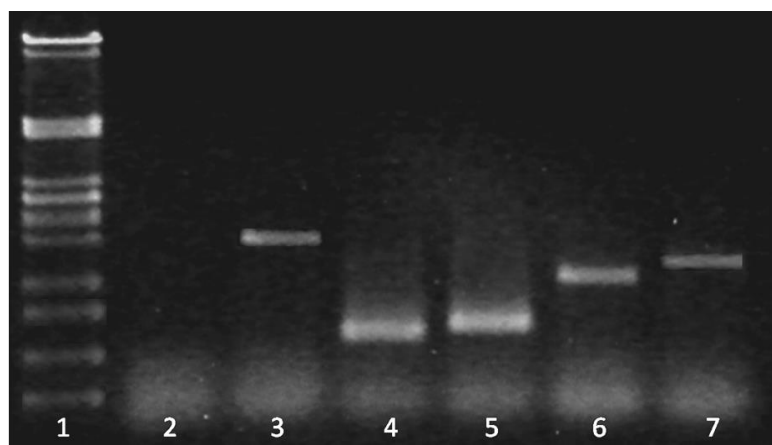


Рисунок 19. Фотоснимок геля с ДНК-пробами из линий с единственным ПЦР продуктом. Внизу рисунка указаны номера дорожек (пробы). 1 – ДНК-маркер (ДНК бактериофага лямбда, обработанная рестриктазой PstI), 2 – контрольная проба, полученная в результате ПЦР без матрицы, 3-7 – пробы с разными ПЦР-фрагментами, полученными по четырем мутантным линиям.

Секвенирование очищенного продукта ПЦР выполняли методом Сэнгера на оборудовании и реактивах Applied Biosystems. Сиквенсную реакцию проводили с использованием праймера HSP при следующих условиях: 95°C (60 с)×1; [95°C (10 с), 50°C (5 с), 60°C (4 мин.)]×25. Обработка сиквенсов осуществлялась с помощью программного обеспечения Applied Biosystems: Data Collection v3.0, Sequencing Analysis 5.3.1, SeqScape®Software. Полученную фланговую нуклеотидную последовательность сопоставляли с базой данных о геномной последовательности ДНК *Drosophila melanogaster* в программе Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), предоставляемых в интернет ресурсе National Center for Biotechnology Information (NCBI, blast.ncbi.nlm.nih.gov).

2.3 Система локального нокадауна генов-кандидатов

Подавление экспрессии гена-кандидата в нервных клетках тестируемых линий осуществлялось посредством интерферирующей РНК (инРНК), синтезируемой в трансгенных мухах системой GAL4/UAS (Duffy, 2002). Мух с системой GAL4/UAS получали путем скрещивания двух трансгенных линий, одна

из которых содержала рекомбинантный ген транскрипционного активатора GAL4 (материнская линия, GAL4-линия), а другая регуляторную последовательность UAS (UAS-линия). Связывание GAL4 с UAS запускает транскрипцию трансгенного элемента, расположенного за UAS и кодирующего интерферирующую РНК (*UAS-инРНК*). Тканеспецифичность интерференции обеспечивается постановкой гена активатора GAL4 под управление промоторами генов (*elav*, *appl*, *nrv2*, *tsh2*, *repo*), экспрессирующихся конститутивно в нервной системе дрозофилы (Luo et al., 1990; Fasano et al., 1991; Luo et al., 1994; Reifegerste et al., 1999; Sun et al., 1999). Конструкция, включающая ген *GAL4* и управляющий его экспрессией промотор, носит название драйвер.

Наряду с конститутивными эффектами нокдауна оценивалось также влияние стадиеспецифичной RNAi на параметры моторной активности. Для выполнения индуцированного нокдауна на стадии имаго был использован драйвер *GAL4.ER*, который, как и конститутивные драйверы, также экспрессируется в ЦНС дрозофилы. *GAL4.ER* кодирует химерный белок, включающий ДНК-связывающий домен GAL4 и лиганд-связывающий домен рецептора эстрогена. Активация экспрессии *UAS-инРНК* белком *GAL4.ER* происходит только после связывания последним эстрогена, добавляемого в питательную среду (Han et al., 2000). Для осуществления эстроген-индуцированного нокдауна β-эстрадиол (Sigma) растворяли в диметилсульфооксиде (ДМСО) в концентрации 260мг/мл и смешивали в отношении объемов 1:3 с дрожжевой пастой. Отобранные для тестирования мухи с момента вылупления содержались в стаканчиках со стандартной изюмно-дрожжевой средой и нанесенной на ее поверхность 100 мкл дрожжевой пасты с эстрогеном, обновляемой ежедневно.

Трансгенные линии, несущие ген активатора GAL4, были получены из Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC, Indiana University, США) и имели следующие генотипы:

№ линии	Имя драйвера	Генотип линии
BL#8760	<i>elav-GAL4</i>	w^* ; $P\{GAL4-elav.L\}3$
BL#8765	<i>elav-GAL4</i>	w^* ; $P\{GAL4-elav.L\}2/CyO$
BL#6794	<i>nrv2-GAL4</i>	w^* ; $P\{nrv2-GAL4.S\}8 P\{UAS-GFP.S65T\}eg^{T10}$
BL#30546	<i>appl-GAL4</i>	$P\{Appl-GAL4.Gla\}l, y^1 w^*$; $Mlf^{\Delta 10}/CyO$
BL#3040	<i>tsh-GAL4</i>	$y^1 w^{1118}; p\{GawB\}tshmd621/CyO$; $P\{UAS-y.C\}MCI/TM2$
BL#7415	<i>repo-GAL4</i>	w^{1118} ; $P\{GAL4\}repo/TM3, Sb^1$
BL#25038	<i>GAL4.ER</i>	w^* ; $P\{hs-GAL4.ER\}ER156$

Линии, содержащие *UAS-инPHK* (RNAi-линии) были получены из The Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Campus Science Support Facilities, Австрия) и Transgenic RNAi Project (TRiP, Harvard Medical School, США). В качестве контроля в экспериментах с RNAi брали потомков от скрещивания соответствующей GAL4-линии и линии, которая использовалась для создания RNAi-линии и была лишена *UAS-инPHK* (линия 60100 для VDRC-линий и линия 36033 для TRiP-линий). *UAS*-линии имели следующие генотипы:

№ линии/источник	Ген, супрессируемый инPHK	Генотип линии
60100/VDRC	Нет (контроль)	$y, w^{1118}; P\{attP, y^+, w^3\}$
37843/VDRC	<i>CG15630</i>	$y, w^{1118}; P\{attP, y^+, w^3\}$
102288/VDRC	<i>CG8708</i>	$y, w^{1118}; P\{attP, y^+, w^3\}$
103625/VDRC	<i>CG6746</i>	$y, w^{1118}; P\{attP, y^+, w^3\}$
105268/VDRC	<i>Sps2</i>	$y, w^{1118}; P\{attP, y^+, w^3\}$
109410/VDRC	<i>Dgp-1</i>	$y, w^{1118}; P\{attP, y^+, w^3\}$
110120/VDRC	<i>CG34460</i>	$y, w^{1118}; P\{attP, y^+, w^3\}$
36303/TRiP	Нет (контроль)	$y^1 v^1$; $P\{CaryP\}attP2$
26714/TRiP	<i>lola</i>	$y^1 v^1$; $P\{TRiP.JF02254\}attP2$
27024/TRiP	<i>jing</i>	$y^1 v^1$; $P\{TRiP.JF02345\}attP2$
28699/TRiP	<i>Mef2</i>	$y^1 v^1$; $P\{TRiP.JF03115\}attP2$
29602/TRiP	<i>drl</i>	$y^1 v^1$; $P\{TRiP.JF03281\}attP2$

Тестирование и анализ моторной активности самцов мух при нокдауне генов-кандидатов выполняли аналогично этим процедурам, проводимым на Р-инсерционных мутантах. Локомоторная и песенная активность оценивалась по всем параметрам (Таблица 1) за исключением несущей частоты импульсной песни по причине замены АЦП установки и модификации программного обеспечения.

2.4 Количественная оценка уровня экспрессии генов-кандидатов

Уровень экспрессии генов-кандидатов в тестируемых линиях оценивали методом количественной ПЦР с использованием флуоресцентного красителя EvaGreen (Biotium, Inc.). Тотальную РНК выделяли из 30 самцов дрозофилы с использованием реагента TRIzol по методу Хомчинского и Саки (Chomczynski, Sacchi, 2006). Полученные образцы обрабатывали ДНКазой (Fermentas) и использовали для синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции по протоколу и с реактивами компании «СибЭнзим» (russia.sibenzyme.com/service/protocols). ПЦР с пробами кДНК проводили в термоциклере StepOnePlus (Applied Biosystems) с детекцией количества амплифицируемого продукта в режиме реального времени. ПЦР осуществляли при следующих условиях: 95°C (5 мин.)x1; [95°C (30 с), 67°C (30 с), 72°C (60 с)]x35. В качестве внутреннего контроля реакции использовали ген *RpL32*. Были использованы праймеры:

CG15630-RA

(5'ATTCGTTGAGATTCTCGCAATGCG3'/5'CGGCGATTTCCAATGGAGCT 3'),

Sps2-RA

(5'TGAGAAGGAACGCGACGTTGTG3'/5'GCTGCGCGTTTGACGGTAGTATTAT3'),

Mef2-RA

(5'TGTACCAGTACGCCAGCACCGA3'/5'TTGTA CT TGGCCTCCGTTTCGC3'), и

RpL32-RA

(5'TATGCTAAGCTGTCGCACAAATGGC3'/5'GTTCTGCATGAGCAGGACCTCCA3').

Отрицательным контролем служил образец, для которого проводилась ложная реакция обратной транскрипции без транскриптазы. Дополнительно использовался отрицательный контроль, не содержащий матрицу. Базовая линия флуоресцентного сигнала и значения порогового цикла реакции определялись автоматически в программе StepOne software v.2.0 (Applied Biosystems). Относительный уровень мРНК рассчитывался на основе сравнительного метода delta-Ct. Статистическая обработка данных выполнялась рандомизационным тестом с уровнем значимости $\alpha = 0.05$, количеством итераций 10000 с

использованием свободно распространяемого программного обеспечения REST 2009 (Pfaffl et al., 2002).

2.5 Флуоресцентная микроскопия

Экспрессию конститутивных GAL4-драйверов оценивали по наличию и локализации флуоресценции белка GFP в эмбрионах дрозофилы на стадиях развития 13-16. Тканеспецифичные драйверные линии скрещивали с линией, содержащей трансген *UAS-GFP*. Линия была получена из BDSC (BL#32202) и имела генотип w^* ; P{10XUAS-IVS-GFP-WPRE}attP2. Эмбрионы дрозофилы дехорионизировали согласно протоколу Supatto с соавт. (2009), помещали на предметное стекло в 50% раствор фосфатного буфера (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) в глицерине и проводили анализ флуоресценции GFP с использованием люминесцентного микроскопа МикМед2 (ЛОМО, Россия) со стандартным флуоресцентным FITC-фильтром. Цифровые фото эмбрионов производились при 20-кратном увеличении камерой CX05 Baumer Optronics и обрабатывались в программе PHOTOSHOP (Adobe Systems). В качестве контроля была использована родительская UAS-линия BL#32202.

У самцов дрозофилы в условиях нокдауна гена *CG15630* под контролем драйвера *nrv2-GAL4* был выполнен анализ флуоресценции GFP в ЦНС на стадии имаго. Драйверная материнская линия BL#6794 является гомозиготной по трансгену *UAS-GFP*. Соответственно, в потомстве от скрещивания присутствует одна копия *UAS-GFP* и GFP синтезируется в тех же клетках, в которых подавляется экспрессия *CG15630*. В качестве контроля было взято потомство от скрещивания линий BL#6794 и 60100. Для эксперимента использовали трехсуточных самцов, которых содержали в стандартных условиях. Мух обездвигивали холодовым наркозом и из них извлекали ЦНС путем механического препарирования в фосфатном буфере (Fore et al., 2011). Препараты ЦНС помещали в каплю фосфатного буфера (50 мкл) дорсальной поверхностью на покровное стекло. Анализ флуоресценции GFP проводили на конфокальном

лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss). Изображения получали при 5- и 20-кратном увеличении, сканирование образцов выполнялось с шагом 2-5 мкм, приблизительным разрешением 0.5-1 пиксель/мкм и усреднением по 8 повторным замерам флуоресценции в пикселе. Настройки лазера и фильтров соответствовали предустановленным значениям для позиции EGFP в программном обеспечении ZEN 2009 (Carl Zeiss). Анализ и редактирование полученных изображений выполнялся в свободно распространяемой версии ZEN 2011 (black edition, 64 bit, Carl Zeiss).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Характеристика локомоторных отклонений у Р-инсерционных мутантов

По результатам проведенного ранее в лаборатории поведенческого тестирования коллекции Р-инсерционных мутантов дрозофилы (1064 линии) отобраны 82 линии с ярко выраженными и воспроизводимыми отклонениями по параметрам локомоторной активности при сравнении с линией дикого типа CS. На Рисунке 20 показано распределение у 83-х исследованных линий параметров двигательной активности: индекса двигательной активности, частоты инициаций побегов, длительности побежки и скорости побежки. Для удобства последующего представления и анализа результатов линиям присвоены числовые идентификаторы (ЧИ) - порядковые номера по возрастанию индекса активности. Соответствие ЧИ и лабораторных названий Р-инсерционных линий может быть установлено с помощью Таблицы 2.

Изменения индекса двигательной активности у отобранных мутантов происходит как в сторону увеличения (19 линий), так и в сторону уменьшения (56 линий) относительно значения данного параметра у CS. Величина индекса двигательной активности определяется из того, как часто и как долго муха выполняет побегов. Все линии со сниженным индексом активности демонстрируют уменьшение частоты побегов, в то же время длительность побегов в группе этих линий изменяется в обоих направлениях либо сохраняется на уровне CS. Увеличение индекса двигательной активности в большинстве случаев (15 из 19 линий) сопровождается увеличением длительности побежки, в то время как частота побегов в группе линий с увеличенным индексом активности превышает уровень CS значительно реже (7 из 19 линий). Изменения частоты и длительности побежки чаще всего сонаправлены (38 из 82 линий) либо изменения затрагивают лишь один из этих двух параметров (32 из 82 линий).

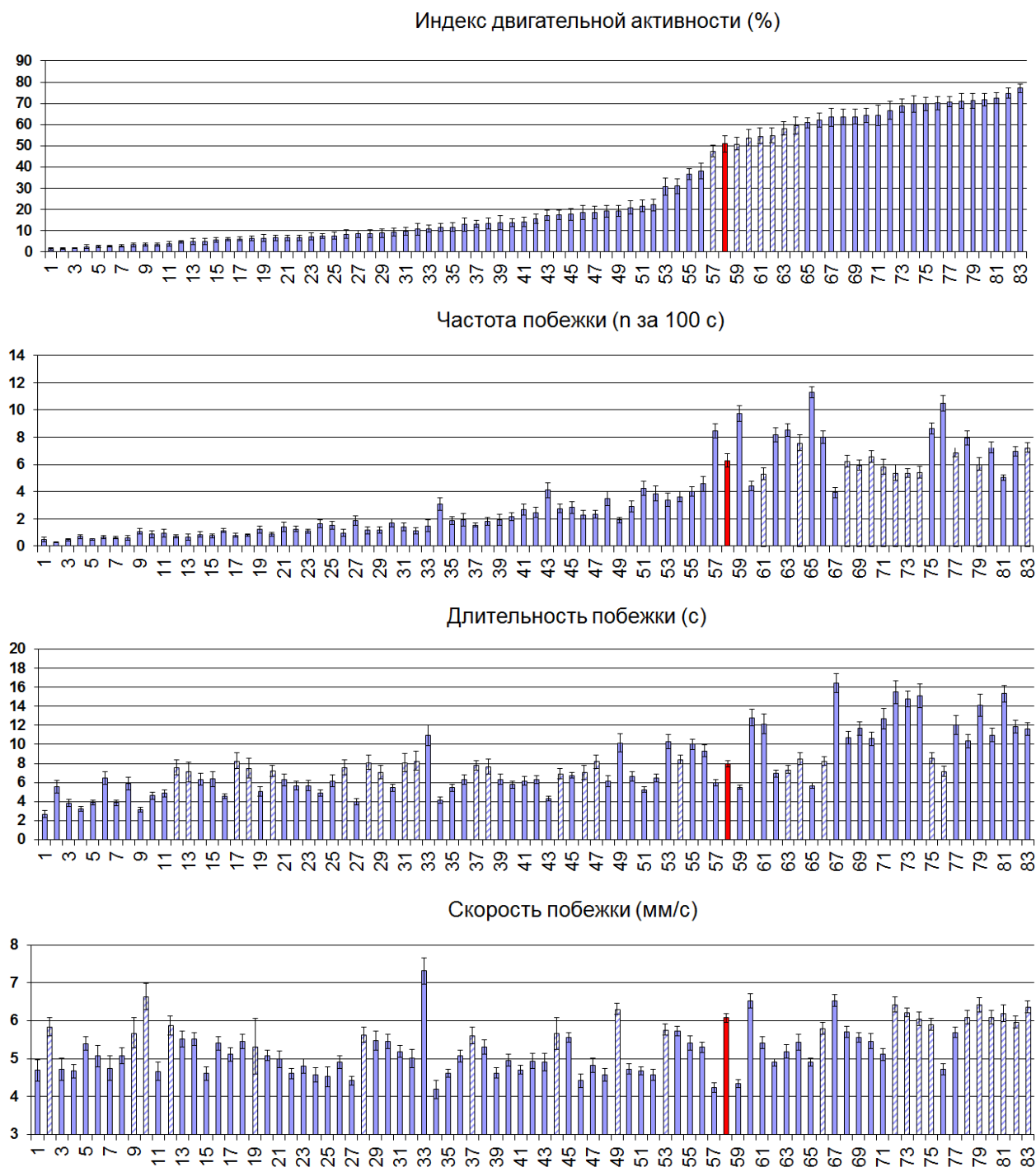


Рисунок 20. Распределение значений параметров двигательной активности среди 82-х Р-инсерционных линий и линии дикого типа CS (столбик выделен красным цветом). Показаны средние и стандартные ошибки. По горизонтальной оси – числовой идентификатор (ЧИ) линии, совпадающий с порядковым номером при ранжировании линий по индексу активности. Синие столбики – достоверные отличия параметра от такового для линии CS (двусторонний тест рандомизации, $P < 0.05$). Заштрихованные – отличия недостоверны.

Таблица 2. Соответствие числовых идентификаторов (ЧИ) лабораторным названиям исследованных линий.

ЧИ	Название	ЧИ	Название	ЧИ	Название	ЧИ	Название
1	6225a	22	205b	43	5480a	64	3507
2	3404a	23	4162b	44	5429b	65	843k
3	3328b	24	3534	45	5198a	66	4203
4	3724	25	2833a	46	1059	67	6387a-s2
5	3550	26	578b	47	5266b	68	4090-s2
6	7465	27	3389	48	7006b	69	3979a-s2
7	5063-t3	28	5730b	49	2498-t3	70	6100
8	4288b	29	4187	50	1305	71	5567a
9	5511-t3	30	4197a	51	663	72	2542-s2
10	6198-t3	31	5526	52	3037b	73	4277-s2
11	2540a	32	2125	53	2836b-s2	74	3467-s2
12	5433-t3	33	4653	54	523b-s2	75	760b-s2
13	5192-t3	34	2248	55	3573a	76	5312c
14	788-t3	35	4834	56	907	77	3146
15	5769	36	1564a	57	5527b	78	7151
16	2540b-t3	37	5180-t3	58	Canton-S	79	7287-s2
17	2102	38	5493	59	3494	80	4262c-s2
18	1473	39	7081	60	995a-t3	81	3041-t3
19	5209	40	2200c-t3	61	5777	82	5282b
20	2169	41	4994	62	4262b	83	3305
21	6145	42	4767b	63	3290		

Разнонаправленные изменения выявляются в значительно меньшем количестве линий (12 из 82 линий), при этом индекс активности может также изменяться.

Отклонения в скорости побежки наблюдались у 61 из 82 мутантных линий. При этом только три мутантные линии демонстрировали увеличение скорости побежки, в остальных линиях данный параметр был снижен в сравнении с CS. Следует отметить, что за исключением линии 63 (3290) во всех случаях изменения скорости сопровождались изменениями частоты и/или длительности побежки.

Для статистического подтверждения выявленных аналитически закономерностей, а также установления других неочевидных зависимостей в параметрах локомоторной активности отобранных линий был выполнен корреляционный и кластерный анализ. Исследованные линии были разделены на 3 группы (Рисунок 20): линии, у которых индекс активности ниже такового у линии дикого типа CS (группа 1, ЧИ: 1-56); линии, достоверно не отличающиеся

по уровню активности от дикого типа (группа 2, ЧИ: 57-64); линии с более высоким, чем у линии CS, уровнем активности (группа 3, ЧИ: 65-83). Результаты корреляционного анализа (Таблица 3) подтвердили наличие в группе 1 прямой зависимости индекса активности от частоты побегов ($r=0,91$). В группе 3

Таблица 3. Коэффициенты корреляции между параметрами двигательной активности, вычисленные по их средним значениям у 83 исследованных линий. Жирным шрифтом показаны достоверные коэффициенты корреляции ($P<0.05$).

Для всех линий: 1-83

	Индекс активности (ИА)	Частота побегов (ЧП)	Длительность побегов (ДПоб)	Скорость побегов (СП)
ИА	1.000000	0.900414	0.746277	0.418145
ЧП	0.900414	1.000000	0.436720	0.162615
ДПоб	0.746277	0.436720	1.000000	0.657140
СП	0.418145	0.162615	0.657140	1.000000

Для линий 1-56

	Индекс активности (ИА)	Частота побегов (ЧП)	Длительность побегов (ДПоб)	Скорость побегов (СП)
ИА	1.000000	0.906015	0.575061	0.047194
ЧП	0.906015	1.000000	0.294600	-0.132832
ДПоб	0.575061	0.294600	1.000000	0.475668
СП	0.047194	-0.132832	0.475668	1.000000

Для линий 57-64

	Индекс активности (ИА)	Частота побегов (ЧП)	Длительность побегов (ДПоб)	Скорость побегов (СП)
ИА	1.000000	-0.094854	0.293854	0.325074
ЧП	-0.094854	1.000000	-0.938227	-0.857608
ДПоб	0.293854	-0.938227	1.000000	0.775705
СП	0.325074	-0.857608	0.775705	1.000000

Для линий 65-83

	Индекс активности (ИА)	Частота побегов (ЧП)	Длительность побегов (ДПоб)	Скорость побегов (СП)
ИА	1.000000	-0.040588	0.215415	0.484678
ЧП	-0.040588	1.000000	-0.935116	-0.609920
ДПоб	0.215415	-0.935116	1.000000	0.670364
СП	0.484678	-0.609920	0.670364	1.000000

обнаруживается отрицательная корреляция между частотой и длительностью побегов ($r=-0,94$), что соответствует факту увеличения уровня двигательной активности в третьей группе либо за счет увеличения частоты побегов, либо за счет увеличения их длительности. Всего лишь в трех линиях выявлено одновременное увеличение частоты и длительности побежки. Во всех группах обнаружилась положительная корреляция между длительностью и скоростью побегов, что предполагает наличие физиологической зависимости систем, определяющих эти параметры. Применение кластерного анализа к трем независимым переменным двигательной активности (программа Statistica 8.0, в анализ включены все 83 линии, все переменные стандартизированы) также показывает связь мутационных изменений длительности и скорости побежки, тогда как действие мутаций на частоту побегов осуществляется независимо (Рисунок 21).

3.2 Характеристика песенных отклонений у Р-инсерционных мутантов

Для отобранных по локомоторным нарушениям мутантных линий (82 линии) проведены запись и анализ песни ухаживания самца дрозофилы (Рисунок 22). Если в локомоторных тестах мутанты чаще демонстрировали снижение индекса активности (56 линий из 82), то в звукопродукции наоборот чаще наблюдалось увеличение индекса ИП (46 линий). Достоверное снижение индекса было зафиксировано только у 14 из 82 линий. Все линии, чей индекс активности превышал таковой у CS (за исключением линии 35), имели либо одновременное увеличение частоты инициации и длительности посылок ИП (31 из 46 линий), либо увеличение одного из параметров при сохранении второго в норме. Снижение индекса ИП определялось, прежде всего, снижением частоты посылок (11 из 14 линий). В двух случаях уменьшение частоты сопровождалось возрастанием длительности посылок (линии 49 и 53). Лишь в одной линии зафиксировано снижение индекса ИП только за счет снижения длительности посылок (линия 12).

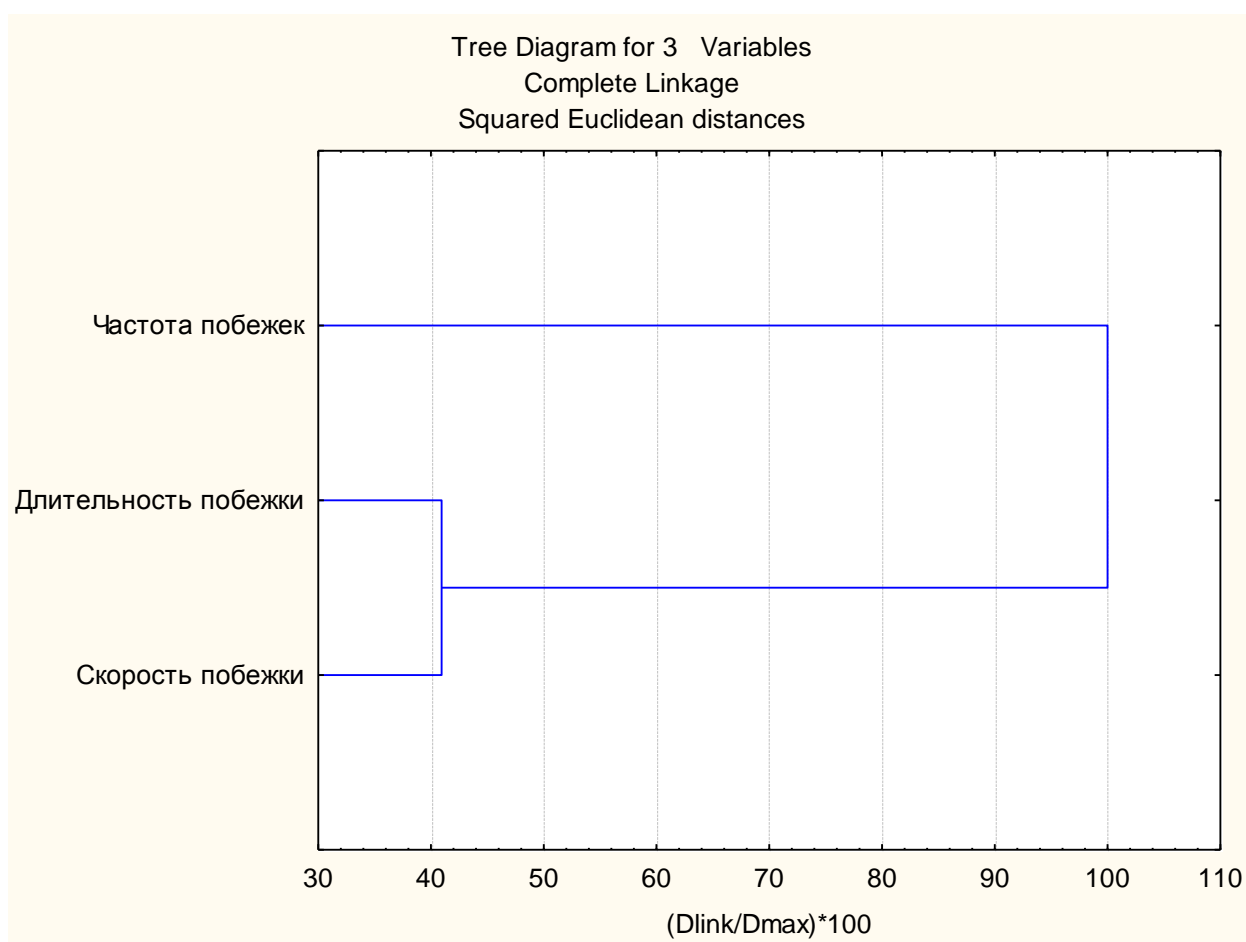


Рисунок 21. Результаты кластерного анализа трех математически независимых параметров, характеризующих двигательную активность 83 исследованных линий. Чем меньше показатель по горизонтальной оси, тем больше сходство значений соответствующих параметров в группе линий.

МИИ у мутантных линий изменялся преимущественно в сторону увеличения значений (23 из 29 линий), а несущая частота – в сторону уменьшения (48 из 53 линий), т.е. сам импульс и МИИ приобретали большую длительность. Сокращение МИИ обнаружено у 6 линий, 5 из которых имели увеличенный индекс ИП. Увеличение несущей частоты (величина обратная длительности цикла импульса) у 4 из 5 линий, наоборот, шло параллельно со снижением индекса. Коэффициенты корреляции между параметрами ИП приведены в Таблице 4 и полностью согласуются с замечаниями выше. Индекс ИП связан с частотой инициации отдельных ее посылок ($r=0.94$) и их длительностью ($r=0.75$). В свою очередь частота и длительность посылок демонстрируют отрицательную

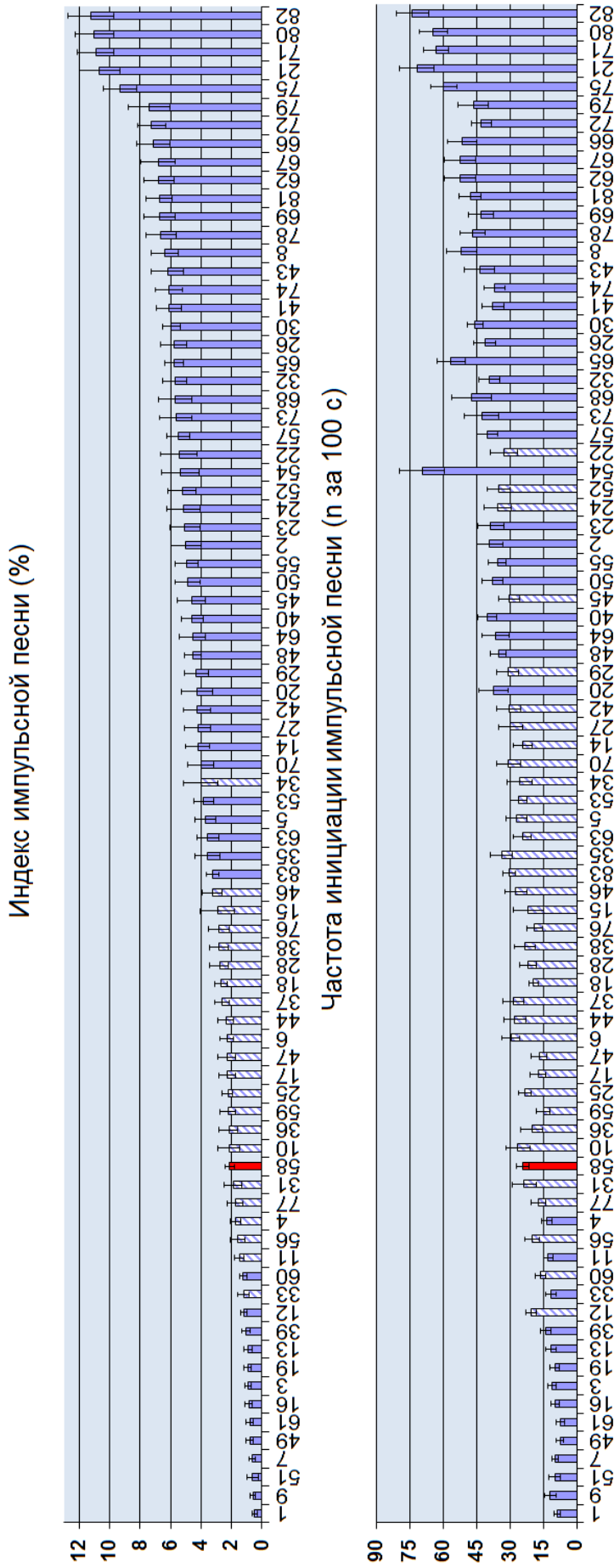


Рисунок 22. Распределение значений параметров ИП ухаживания среди 82-х Р-инсерционных линий и линии дикого типа CS (столбик выделен красным цветом). Показаны средние и стандартные ошибки. По горизонтальной оси – числовой идентификатор (ЧИ) линии, совпадающий с порядковым номером при ранжировании линий по индексу двигательной активности. Синие столбики – достоверные отличия параметра от такового для линии CS (двусторонний тест рандомизации, $P < 0.05$). Заштрихованные – отличия недостоверны.

Длительность отдельной посылки импульсной песни (мс)

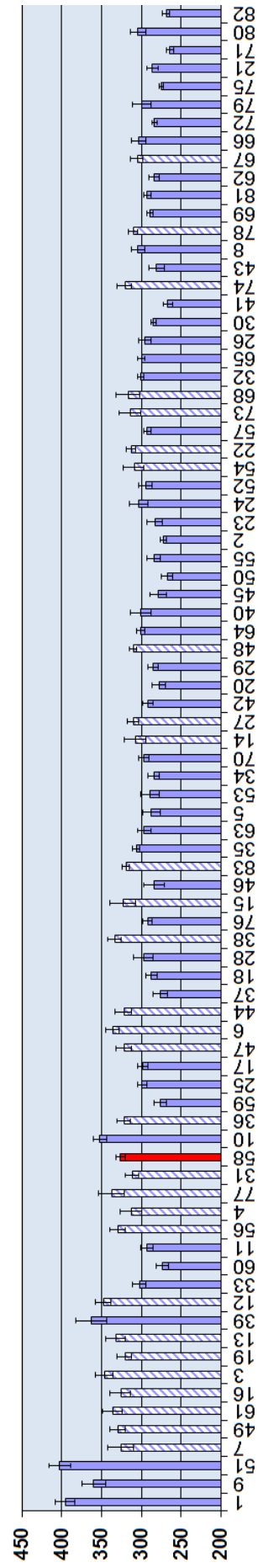
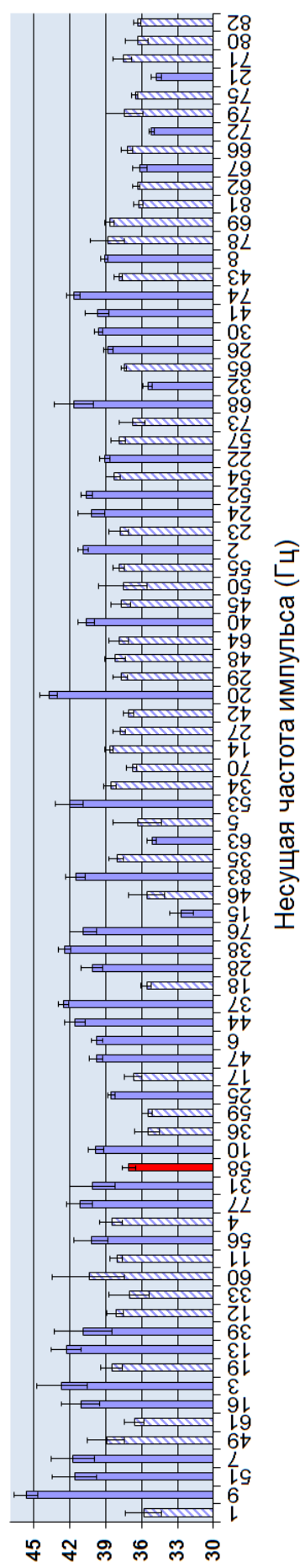
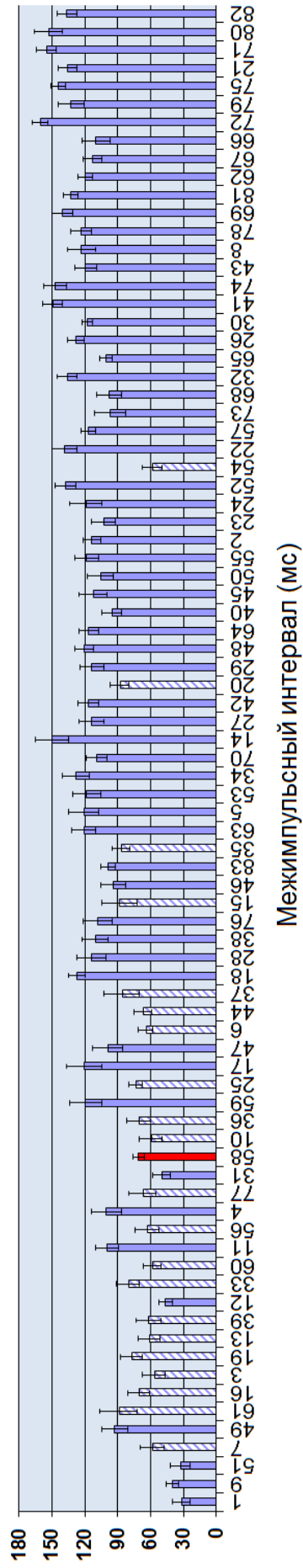


Рисунок 22. Продолжение.

корреляцию с МИИ и несущей частотой импульса. Из неочевидных закономерностей интересно наличие положительной корреляции между величиной МИИ и несущей частотой импульса. Оценивая эти корреляции, можно заключить, что во многих линиях инсерция вызывает однонаправленные изменения в группе четырех параметров, которые проявляются либо в виде одновременного увеличения времени звукопродукции, частоты импульсов в посылке и их длительности, либо, наоборот, к подавлению звукопродукции, урежению импульсов и уменьшению их длительности.

Таблица 4. Коэффициенты корреляции между параметрами ИП ухаживания самца, вычисленные по их средним значениям у 83 исследованных линий. Жирным шрифтом показаны достоверные коэффициенты корреляции ($P < 0.05$).

	Индекс ИП (ИИП)	Частота инициации посылок ИП (ЧИПИП)	Длительность посылки ИП (ДПИП)	Меж- импульсный интервал (МИИ)	Несущая частота импульса (НЧИ)
ИИП	1.000000	0.940189	0.754381	-0.370825	-0.567784
ЧИПИП	0.940189	1.000000	0.563524	-0.305159	-0.501383
ДПИП	0.754381	0.563524	1.000000	-0.378174	-0.688658
МИИ	-0.370825	-0.305159	-0.378174	1.000000	0.294543
НЧИ	-0.567784	-0.501383	-0.688658	0.294543	1.000000

Кластерный анализ четырех независимых переменных ИП ухаживания самца (программа Statistica 8.0, в анализ включены все 83 линии, все переменные стандартизированы) выявил два первичных кластера (Рисунок 23). Первый включает частоту инициации и длительность посылки ИП. Второй – МИИ и несущую частоту импульса.

Естественный интерес представляет возможная **связь между параметрами двигательной активности и параметрами ИП**. В корреляционной матрице семи математически независимых друг от друга параметров, представленной в Таблице 5, таких корреляций четыре. Частота побегов коррелирует с частотой инициации ($r=0.38$) и длительностью ($r=0.30$) посылок импульсной песни. Длительность

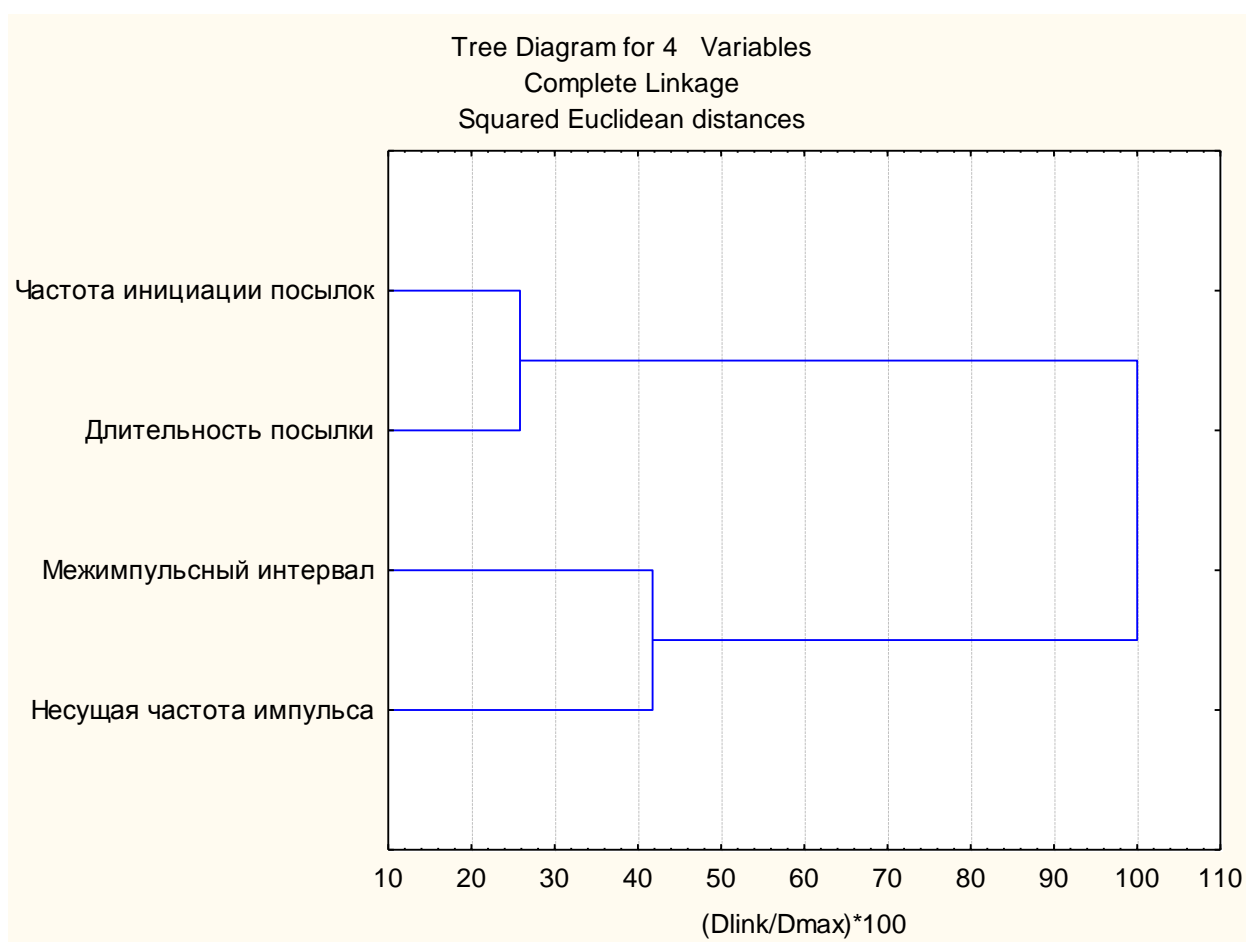


Рисунок 23. Результаты кластерного анализа четырех математически независимых параметров, характеризующих импульсную песню ухаживания 83 исследованных линий. Чем меньше показатель по горизонтальной оси, тем больше сходство значений соответствующих параметров в группе линий.

побежки обнаруживает корреляции с теми же параметрами ИП: $r=0.32$ для частоты инициации посылок и $r=0.31$ для длительности посылки ИП. Таким образом, обнаружено сходное влияние ряда мутаций на параметры запуска и длительности работы локомоторного и песенного ЦГМП. Характерно, что частота и длительность побегов не связаны с МИИ и несущей частотой импульса. Специфичность отклонений по последним двум параметрам обнаруживается и по результатам кластерного анализа, в котором выявляется первичный кластер, состоящий из двух переменных (МИИ и несущая частота импульса), который отставлен от всех остальных кластеров (Рисунок 24).

Таблица 5. Коэффициенты корреляции между параметрами двигательной активности и импульсной песни (ИП) ухаживания самца, вычисленные по их средним значениям у 83 исследованных линий. Включены только те параметры, которые не имеют между собой априорной математической зависимости. Жирным шрифтом показаны достоверные коэффициенты корреляции ($P < 0.05$).

	Частота побежек (ЧП)	Длит-сть побежки (ДПоб)	Скорость побежки (СП)	Частота инициации посылок ИП (ЧИПИП)	Длительность посылки ИП (ДПИП)	Меж- импульсный интервал (МИИ)	Несущая частота импульса (НЧИ)
ЧП	1.000000	0.436720	0.162615	0.384286	0.301006	-0.201783	-0.212928
ДПоб	0.436720	1.000000	0.657140	0.321975	0.309653	-0.161900	-0.188101
СП	0.162615	0.657140	1.000000	0.141009	0.005769	0.035576	0.008612
ЧИПИП	0.384286	0.321975	0.141009	1.000000	0.563524	-0.305159	-0.501383
ДПИП	0.301006	0.309653	0.005769	0.563524	1.000000	-0.378174	-0.688658
МИИ	-0.201783	-0.161900	0.035576	-0.305159	-0.378174	1.000000	0.294543
НЧИ	-0.212928	-0.188101	0.008612	-0.501383	-0.688658	0.294543	1.000000

Обобщая результаты по моторной активности Р-инсерционных мутантов, можно заключить следующее:

- снижение индекса локомоторной активности всегда сопровождается снижением частоты инициаций побегов, а его увеличение в большинстве случаев – увеличением длительности побега;
- между длительностью и скоростью побегов обнаруживается положительная корреляция;
- изменения скорости побега происходят преимущественно в сторону уменьшения значений;
- увеличение индекса ИП связано в большинстве случаев с одновременным увеличением частоты инициаций и длительности посылок (31 из 46 линий), в то время как снижение индекса ИП определяется, прежде всего, снижением частоты инициаций посылок (11 из 14 линий);
- увеличение индекса ИП сопровождается сокращением МИИ и длительности цикла импульса; при уменьшении индекса происходит все ровно наоборот;

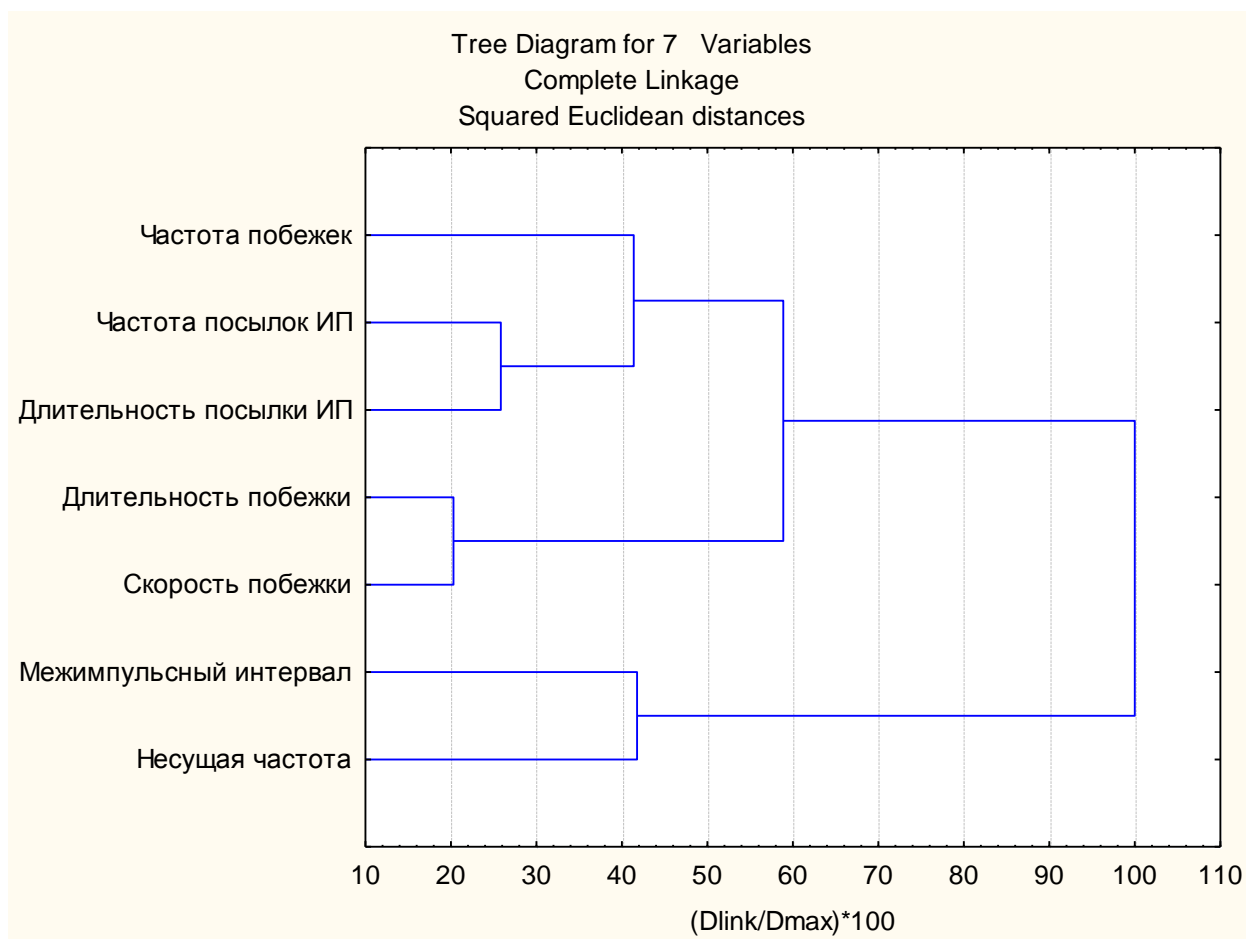


Рисунок 24. Результаты кластерного анализа семи математически независимых параметров, характеризующих двигательную активность и импульсную песню ухаживания у 83 исследованных линий. Чем меньше показатель по горизонтальной оси, тем больше сходство значений соответствующих параметров в группе линий.

- частота инициаций и длительность побегов имеет положительные корреляции с частотой и длительностью посылок импульсной песни, но не связаны с МИИ и несущей частотой импульса.

Выявленные закономерности в нарушениях двух описанных форм моторной активности подтверждают факт преимущественно системных перестроек в работе моторных структур у мутантов, когда изменения параметров происходят не в случайных вариантах, а взаимосвязано. При этом часть параметров можно рассматривать как общие показатели функционирования моторных систем (длительность и частота инициаций), а часть – как специфические показатели

работы отдельных форм моторной активности (скорость побегов, МИИ, несущая частота). Проведенный анализ показал специфичность и относительную независимость МИИ, параметра, непосредственно характеризующего работу песенного ЦГМП. В дальнейшей работе именно этот параметр стал основным критерием отбора линий для молекулярно-генетического анализа нейрогенных нарушений моторики.

3.3 Идентификация мутаций в линиях с отклонениями в моторной активности

По результатам тестирования локомоторной активности и песни ухаживания самцов дрозофилы для дальнейшего анализа выбраны 35 линий, проявляющих выраженные отклонения в параметрах каждого типа моторной активности при сравнении с линией дикого типа CS. Особое внимание уделялось значениям МИИ в импульсной песне самца, непосредственно характеризующим работу песенного генератора.

Из 35 выделенных по отклонениям в моторной активности мутантных линий для 22 были успешно определены локализация и направленность *PdL*-транспозона в геноме (Таблица 6). 13 линий были исключены из дальнейшего анализа ввиду наличия двух копий *PdL*-транспозона в геноме (10 линий) или невозможности локализовать инсерцию по методическим ограничениям (3 линии). Каждая из 22 проанализированных линий имела уникальную точку инсерции *PdL*-транспозона. В 15 случаях вставка транспозона произошла в некодирующих участках интронов и экзонов генов *Cf2*, *Dpg-1*, *Ext2/CG10731*, *lola*, *MESR4*, *Map205*, *Mef2*, *Sps2*, *Treh*, *wdp*, *ups*, *CG1943*, *CG5807*, *CG6746*, *CG15630*; в двух случаях в кодирующей области генов *jumi*, *CG8708*; в одном случае в кластере транспозонов в перицентромерной области (*no gene*); в четырех остальных случаях в той или иной степени удаленности от 5'-конца генов *drl*, *jing*, *Hsrw*, *CG34460*.

Таблица 6. Локализация *PdL*-транспозона в геноме мутантных линий и гены-кандидаты, нарушение функций которых предположительно определяет наблюдаемые отклонения в поведении животных. Обозначения во второй колонке: XX:YYYYYYYY[+/-], где XX – хромосомное плечо; YYYYYYYYYY – номер нуклеотида, следующий за инсерцией в геномной последовательности *Drosophila*; [+/-] – прямая (5'-3') или обратная (3'-5') ориентация *PdL*-транспозона на хромосоме.

Линия	Положение инсерции и направленность <i>PdL</i> -транспозона	Ген-кандидат	Аллель
663	2R:5842843[-]	<i>Mef2</i>	<i>Mef2</i> ⁶⁶³
5282b	2R:6429208[+]	<i>lola</i>	<i>lola</i> ^{5282b}
6387a-s2	2R:12036471[+]	<i>Ext2/ CG10731</i>	<i>Ext2</i> ^{6387a-s2}
4262c-s2	2R:16964321[+]	<i>Treh</i>	<i>Treh</i> ^{4262c-s2}
3494	2R:2389393[-]	<i>jing</i>	<i>jing</i> ³⁴⁹⁴
2169	2R:13435745[+]	<i>MESR4</i>	<i>MESR4</i> ²¹⁶⁹
843K	2R:14059049[+]	<i>Dgp-1</i>	<i>Dgp-1</i> ^{843K}
3979a-s2	2R:18199553[-]	<i>wdp</i>	<i>wdp</i> ^{3979a-s2}
4653	2R:4047132[+]	<i>CG8708</i>	<i>CG8708</i> ⁴⁶⁵³
3290	2R:12716378[-]	<i>CG34460</i>	<i>CG34460</i> ³²⁹⁰
3724	2L:4882790[+]	<i>Cf2</i>	<i>Cf2</i> ³⁷²⁴
3404a	2L:4793956[+]	<i>CG15630</i>	<i>CG15630</i> ^{3404a}
2248	2L:19190341[-]	<i>drl</i>	<i>drl</i> ²²⁴⁸
6225a	2L:20116133[+]	-	-
3389	2L:12002261[-]	<i>CG6746</i>	<i>CG6746</i> ³³⁸⁹
5769	2L:10342643[+]	<i>Sps2</i>	<i>Sps2</i> ⁵⁷⁶⁹
3328b	3R:20639718[-]	<i>CG5807</i>	<i>CG5807</i> ^{3328b}
5433-t3	3R:17122251[+]	<i>Hsrow</i>	<i>Hsrow</i> ^{5433-t3}
5180-t3	3R:2901187[+]	<i>CG1943</i>	<i>CG1943</i> ^{5180-t3}
5567a	3R:27894136[-]	<i>Map205</i>	<i>Map205</i> ^{5567a}
5493	3R:6182222[+]	<i>jumu</i>	<i>jumu</i> ⁵⁴⁹³
7081	3L:12118218[-]	<i>yps</i>	<i>yps</i> ⁷⁰⁸¹

Частота попадания инсерций в различные хромосомные плечи неодинакова. Из 22 инсерций *PdL*-транспозона, приводящих к отклонениям в моторной активности, в 10 случаях инсерция произошла в правом плече второй хромосомы, в 6 случаях – в левом плече второй хромосомы, в 5 случаях – в правом плече третьей хромосомы и в одном случае - в левом плече третьей хромосомы. Преимущественная локализация инсерций во второй хромосоме может быть связана с функциональной гетерогенностью генома дрозофилы, вследствие

которой либо инсерции *PdL*-транспозона происходили чаще во второй хромосоме, либо вторая хромосома в большей степени вовлечена в моторные функции животного.

3.4 Характеристика генов-кандидатов, определяющих параметры ритмических движений

На основе анализа экспериментальных и биоинформационных данных по генам, затронутым вставкой *PdL*-транспозона, были определены или предположены функции продуктов этих генов и их роль в функционировании организма. Ниже дано описание генов-кандидатов, предположительно затронутых в мутантных линиях. Результаты анализа вкратце отображены в сводной Таблице 7. Данные о моторной активности линий, в которых была определена точка инсерции, представлены на Рисунках 25, 26.

Таблица 7. Характеристика генов-кандидатов, предположительно затронутых у мутантов с измененными показателями моторной активности.

Линия	Ген-кандидат	Продукт гена	Функция гена	Локализация продукта гена в клетке	Гомолог у человека
6225a	---	предположительно пиРНК	---	---	---
3404a	<i>CG15630</i>	предположительно рецепторный компонент клеточной поверхности	---	---	<i>NCAM</i>
3328b	<i>CG5807</i>	предположительно мембранный рецептор гидрофобных агентов в составе липокалина	развитие половых клеток, регуляция секреции	---	<i>LMBR1</i>
3724	<i>Cf2</i>	транскрипционный фактор РНК-полимеразы II	развитие мышечных органов	ядро	---
5433-t3	<i>Hsro</i>	РНК, предположительно связывающаяся со сплайсосомой и рибосомой	регуляция созревания пре-мРНК и белкового синтеза	ядро, цитоплазма	---

5769	<i>Sps2</i>	предположительно синтетаза моноселенофосфата 2	синтез селеноцистеина	цитоплазма	<i>SEPHS</i>
2169	<i>MESR4</i>	---	Негативная регуля- ция Ras/MAPK сигнальных каскадов	ядро	---
3389	<i>CG6746</i>	Тирозиновая фосфатаза	---	---	<i>PTPL</i>
7081	<i>ups</i>	трансляционный репрессор	распределение факторов в формирующемся яйце и эмбрионе	цитоплазма	<i>YBX</i>
5493	<i>jumu</i>	предположительно транскрипционный фактор	нейрогенез	ядро	<i>FOXN1</i>
5180- t3	<i>CG1943</i>	---	---	---	---
2248	<i>drl</i>	предположительно тирозинкиназный рецептор	Направление роста нервных окончаний, Wnt-сигналинг	---	<i>RYK</i>
4653	<i>CG8708</i>	бета-1,3- галактозилтрансфераза	О-гликозилиро- вание белков	аппарат Гольджи	<i>C1GALT1</i>
663	<i>Mef2</i>	предположительно транскрипционный фактор	развитие скелетных, гладких и сердечных мышц, регуляция активности нейронов, определяющих суточные ритмы	ядро	<i>MEF2</i>
3494	<i>jing</i>	предположительно транскрипционный фактор	развитие трахейной и центральной нервной системы	ядро	<i>AEBP2</i>
843K	<i>Dgp-1</i>	предположительно трансляционный фактор элонгации	ответ на стрессорные воздействия	---	<i>GTPBP</i>
3290	<i>CG34460</i>	предположительно секретируемый защитный белок	---	---	---
5567a	<i>Map205</i>	белок, связывающий микротрубочки	участие в ремоделировании тубулиновой сети	цитоплазма	<i>MAP4</i>
3979a- s2	<i>wdp</i>	предположительно рецептор клеточной поверхности	направление роста аксонов	плазматичес- кая мембрана	---
6387a-	<i>Ext2/</i>	предположительно	биосинтез	аппарат	<i>EXT2/</i>

s2	<i>CG10731</i>	глюкуронозилтранс- фераза/компонент АТФсинтазы	протеогликанов/ре- гуляция транспорта протонов на мембране	Гольджи и эндоплазма- тическая сеть /митохондрия	<i>ATP5S</i>
4262c- s2	<i>Treh</i>	трегалаза	расщепление трегалозы	мембрана	<i>TREH</i>
5282b	<i>lola</i>	предположительно транскрипционный фактор	регуляция роста нервных окончаний	ядро	---

Линия 6225a (на рисунках 25 и 26 обозначена как по gene)

В области инсерции (точка 2L:20116133[+]) отсутствуют аннотированные транскрибируемые элементы (Рисунок 27), однако обнаруживается множество транспозонов. Кластеры транспозонов перицентромерной (гетерохроматиновой) области являются местом экспрессии пиРНК (Brennecke et al., 2007). Инсерция транспозона может нарушать непосредственно транскрипцию РНК на этом участке, либо регуляцию транскрипции различными факторами (Klattenhoff et al., 2009). пиРНК активно синтезируется в зародышевых и прилежащих к ним клетках, подавляя активность транспозонов (разрушение транскриптов, подавление транскрипции транспозон-содержащих участков ДНК). В таком случае моторная депрессия, наблюдаемая в линии 6225a, может быть следствием аномального развития из-за неконтролируемой активности транспозонов, однако характер физиологических отклонений предсказать сложно.

Линия 3404a

Инсерция произошла в точке 2L:4793956[+] в нетранслируемой части первого экзона гена *CG15630* на расстоянии 84 п.н. от 5-конца гена. Аннотирован только один транскрипт *CG15630-RA* (FlyBase, flybase.org). Согласно данным Чинтапали с соавт. (Chintapalli et al., 2007), представленным в базе FlyAtlas (flyatlas.org), *CG15630* является нейроспецифичным геном, который экспрессируется в ЦНС на стадиях личинки и имаго. По биоинформационным данным (InterPro, ebi.ac.uk/interpro, accession number Q9VR25) *CG15630* кодирует белок-связывающий белок, который содержит иммуноглобулин-подобные домены и домены фибронектина типа III. Данные домены обнаруживаются в

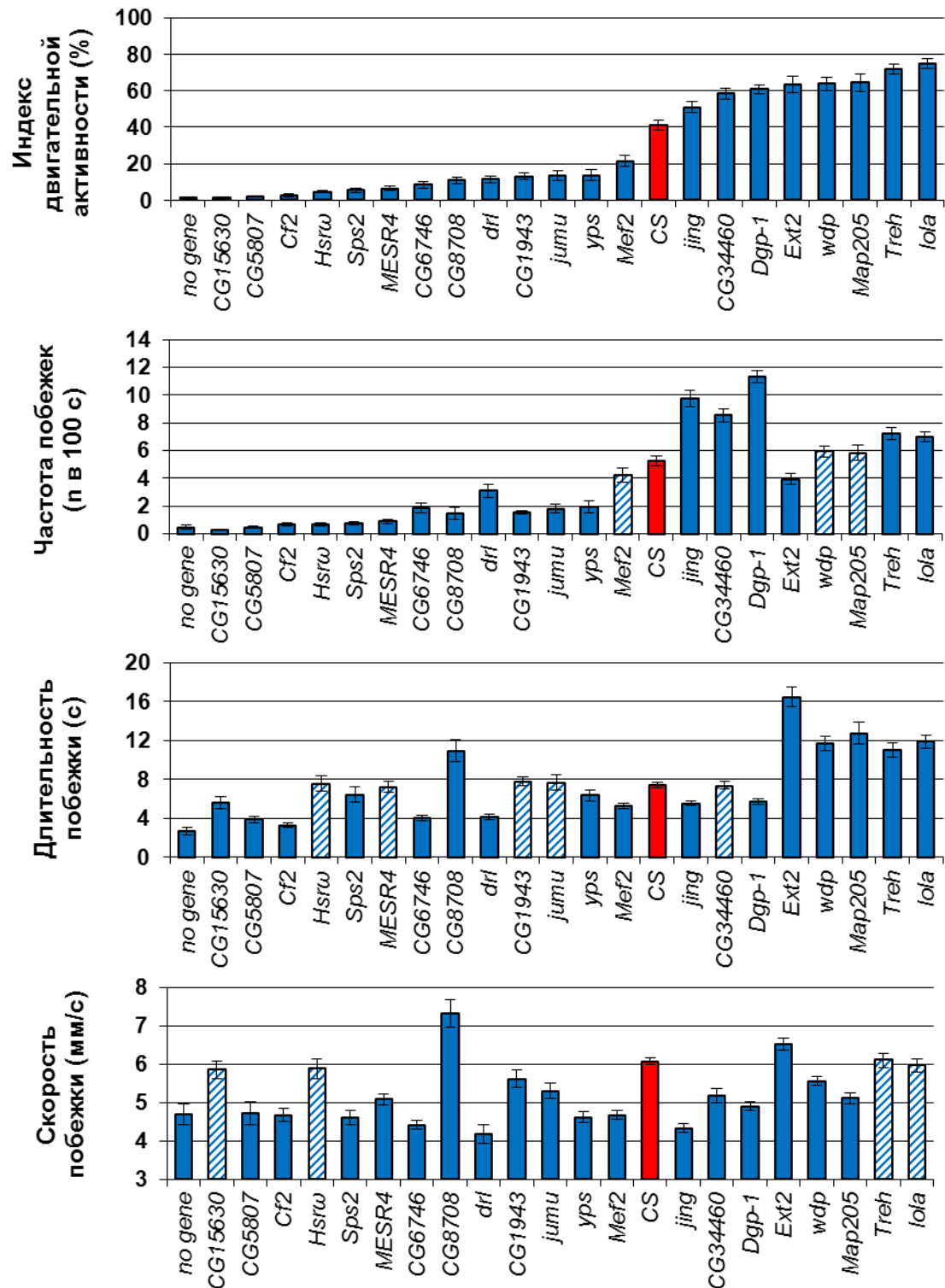


Рисунок 25. Параметры локомоторной активности в группе линий с идентифицированными мутациями (по горизонтальной оси указаны гены-кандидаты). Показаны средние значения и стандартные ошибки. Синие столбики – достоверные отличия параметра от такового для линии CS (красный столбик, двусторонний тест рандомизации, $P < 0.05$). Заштрихованные – отличия недостоверны.

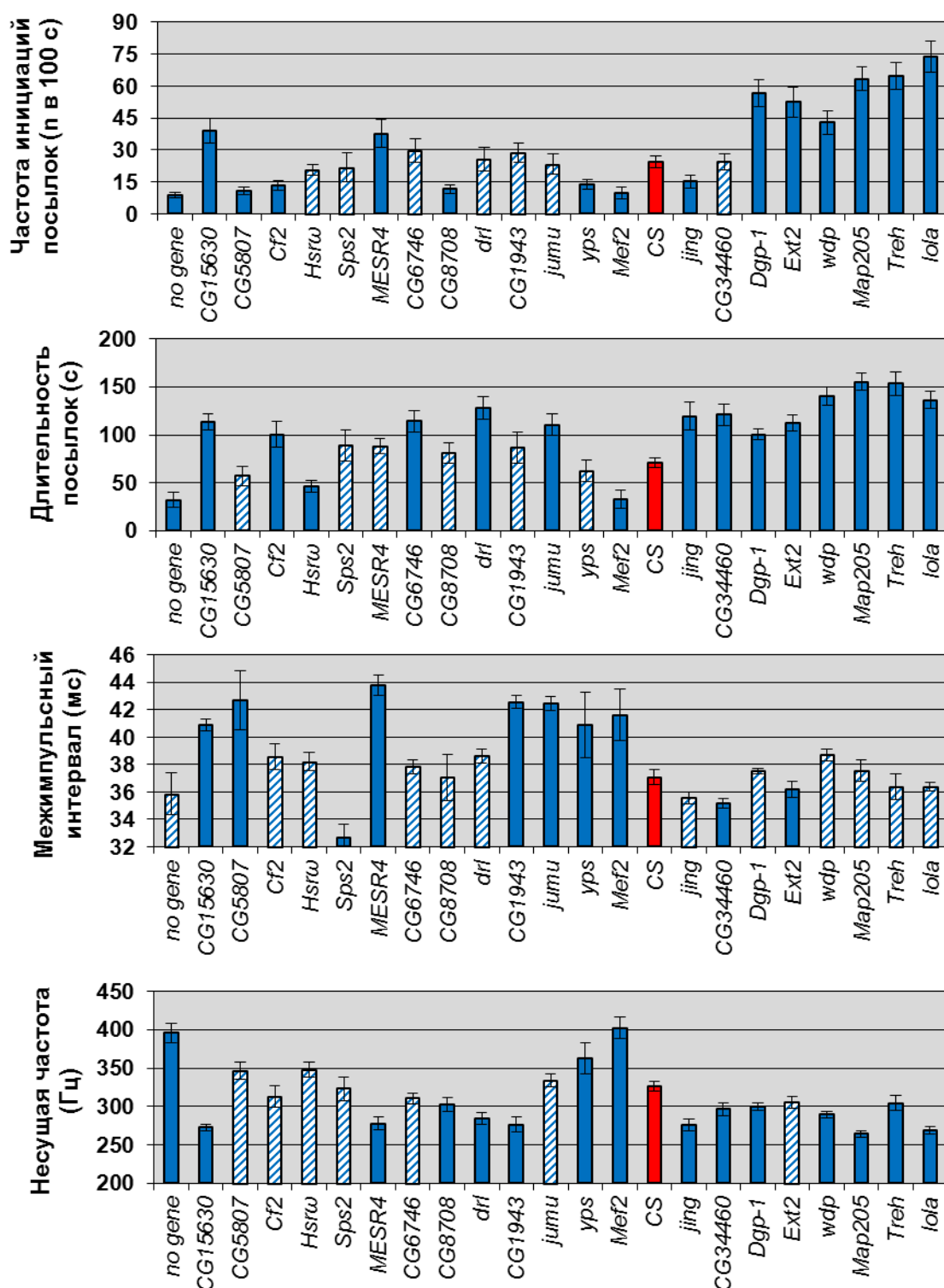


Рисунок 26. Параметры песенной активности в группе линий с идентифицированными мутациями. См. подпись к Рисунку 25.

различных рецепторах на поверхности клетки и молекулах клеточной адгезии (Vogel et al., 2003). Сходная доменная организация обнаруживается в продукте, кодируемом геном *CG33543*, который также предположительно является белком

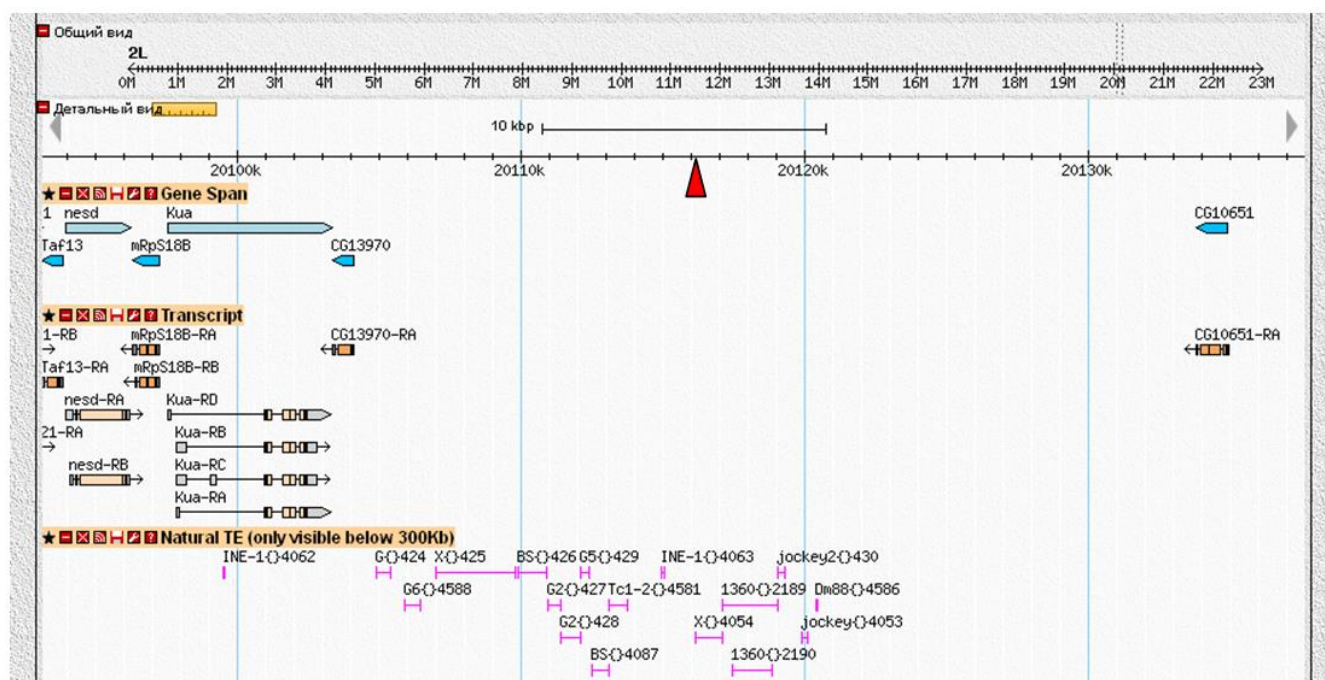


Рисунок 27. Описание области инсерции в линии 6225a (FlyBase, flybase.org). В нижней части рисунка лиловыми отрезками обозначено положение натуральных транспозонов. Красным треугольником обозначена точка инсерции *PdL*-транспозона.

клеточной адгезии, а сам ген *CG33543* демонстрирует нейроспецифичную экспрессию, однако и он практически не изучен (InterPro, ebi.ac.uk/interpro, accession number Q59E14; Chintapalli et al., 2007, FlyAtlas, flyatlas.org). Ортологами *CG15630* и *CG33543* у других видов, в том числе у человека, по данным проекта Ensembl (ensembl.org) являются гены *NCAM1* и *NCAM2*, которые, в свою очередь, являются паралогами (Kulahin, Walmod, 2010). Семейство белков NCAM имеют общую эктодоменную организацию, включающую пять N-терминальных иммуноглобулиновых модуля, за которыми следуют 2 фибронектиновых модуля третьего типа. Эктодомены прикрепляются к плазматической мембране либо гликозилфосфатидилинозитоловым якорем, либо трансмембранным доменом, за которым следует цитоплазматический домен (Owczarek et al., 2009). NCAM1 опосредует гомофильные взаимодействия между клетками и гетерофильные между клетками и компонентами внеклеточного матрикса (Ditlevsen et al. 2008). NCAM1 играет важную роль в клеточной адгезии, клеточной

пролиферации и миграции, нейритогенезе, росте аксонов и образовании проводящих путей, синаптической пластичности и регенерации (Walmod et al. 2004; Seidenfaden et al., 2006; Burgess et al. 2008; Rutishauser, 2008). NCAM2 идентифицирован позже, чем NCAM1 (Kulahin, Walmod, 2010), и роль последнего в развитии и функционировании нервной системы изучена в гораздо меньшей степени.

Основываясь на функциональных характеристиках консервативных доменов *CG15630* и роли продуктов гомологичных ему генов, можно предположить, что *CG15630* кодирует белок, локализующийся на клеточной поверхности нейрональных клеток. Он осуществляет рецепцию сигналов в дифференцирующихся тканях и/или в соответствии с полученными сигналами осуществляет ремоделирование цитоскелета клетки, управляя формой клеток, их взаимодействием и миграцией. Этот вывод согласуется с данными Рона с соавт. (Rohn et al., 2009), представленными на ресурсе FLIGHT (flight.icr.ac.uk), по которым добавление в культуру клеток *Drosophila* S2R+ интерферирующей РНК к гену *CG15630* приводит к уменьшению размеров клетки и уровня актина в них, а также к образованию микротубулиновых скоплений.

Интересны также данные о подавлении экспрессии *CG15630* при активации сигнального пути, запускаемого рецептором эпидермального фактора роста (EGFR, epidermal growth factor receptor), в клетках, участвующих во второй митотической волне (SMW, second mitotic wave) в имгинальном диске развивающегося глаза. Сверхэкспрессия гена *Spitz*, кодирующего лиганд EGFR, под контролем драйвера *GMR-GAL4* приводит к подавлению SMW. Транскрипт гена *CG15630* в отсутствие сверхэкспрессии гена *Spitz* обнаруживается в группах из двух-трех делящихся клеток на заднем краю морфогенетической бороздки, соответствующей SMW (Firth, Baker, 2007).

Отсутствие изменений скорости у мутантов линии 3404a, но существенное отклонение значений МИИ (увеличен на 10%) и несущей частоты (снижена на 16%), предполагают вовлеченность гена в работу и регуляцию, прежде всего, песенного генератора. Вместе с тем, нарушения в звукопродукции могут хотя бы

отчасти быть связанными с ненервными нарушениями. Так, например, нокдаун *CG15630*, в клетках нотума (спинка груди) под контролем *pnr-GAL4* и мышцах насекомого под контролем *Mef2-GAL4* приводит к дефектам развития в указанных органах и в некоторых вариантах нокдауна к летальности на стадии куколки (Mummery-Widmer et al., 2009, данные представлены на ресурсе Bristle Screen Database, bristlescreen.imba.oeaw.ac.at; Schnorrer et al., 2010, данные представлены на ресурсе GenomeRNAi, genomernai.dkfz.de).

Линия 3328b

Инсерция произошла в точке 3R:20639718[-] в некодирующей части первого экзона гена *CG5807* на расстоянии 32 п.н. от 5-конца гена. Аннотировано 2 транскрипта (FlyBase, flybase.org). Предполагаемый продукт *CG5807* имеет консервативные С-терминальные домены, обнаруженные у млекопитающих в белке LMBR1 и рецепторе липокалина-1. Ресурс Ensembl (ensembl.org) обнаруживает гомологию *CG5807* с геном человека *LMBR1*.

LMBR1 кодирует интегральный мембранный белок, которому ранее приписывалось участие в развитии конечностей у млекопитающих, однако в настоящее время это мнение пересматривается с учетом новых данных (Lettice et al., 2002). Липокалин-1 синтезируется в клетках бактерий, растений и животных. Наиболее вероятная функция – связывание гидрофобных, потенциально вредных молекул, а также возможно транспорт физиологически активных веществ (витамин А, стероидный гормон). Рецептор липокалина-1 может участвовать в детоксикации связанного с липокалином вредного агента, в его модификации, интернализации (Wojnar et al., 2001). По данным Чинтапали с соавт. (Chintapalli et al., 2007; FlyAtlas, flyatlas.org) экспрессия *CG5807* у дрозофилы имеет высокий уровень в яичниках и семенниках, слюнных железах, задней кишке, в головном и торако-абдоминальном ганглиях (сходная картина у личинок за исключением половых желез).

Таким образом, наблюдаемое в линии 3328b подавление почти по всем параметрам локомоторной и песенной активности может быть связано с нарушением рецепции гидрофобных агентов в составе липокалина (гормоны,

токсины), посредством которой регулируются сигнальные каскады в клетке, связанные с развитием гамет и процессами секреции.

Линия 3724

Инсерция произошла в точке 2L:4882790[+] в гене *Cf2* на расстоянии 551 п.н. от 5-конца. Аннотировано 5 транскриптов (FlyBase, flybase.org). Кодированный продукт CF2 является одним из активаторов гена актина *Act57B* (два сайта связывания в промоторной области), тропонина I *TnI* и тяжелой цепи миозина *Mhc* на эмбриональных и личиночных стадиях. Совместное действие CF2 с другим важным активатором экспрессии гена актина MEF2 приводит к синергичному эффекту. Кроме того, CF2 подвергается регуляции со стороны MEF2 (Tanaka et al., 2008). Гомологов *Cf2* у других видов не описано. Потеря функционального CF2 у дрозофилы приводит к уменьшению или прекращению экспрессии структурных генов мышц и летальности в гомозиготе на личиночной стадии (Bagni et al., 2002). Гаевский и Шульц (Gajewski, Schulz et al., 2010) отмечают, что у исследованных ими Р-инсерционных мутантов дрозофилы не прямые крыловые мышцы имеют нормальную общую анатомию, однако ультраструктура мышц нарушена: миофибриллы менее организованы и имеют больший размер (+50%). Подавление локомоторной активности в линии 3724 может быть вызвано отклонениями в развитии мышечных органов мухи, как скелетных, так и висцеральных органов. Нарушения в работе и регуляции ЦГМП менее вероятны, учитывая сохранение паттерна импульсной песни.

Линия 5433-t3

Инсерция произошла в точке 3R:17122251[+] на 5-конце гена *Hsr ω* на расстоянии 94 п.н. от 4 из 5 описанных во FlyBase транскриптов (flybase.org). По результатам нозерн-блоттинга аннотировано 3 транскрипта, которые являются некодирующими белок РНК (Novemann et al., 1986). Короткий транскрипт А или omega-с локализуется в цитоплазме, транскрипт В или omega-n локализуется в ядре. Цитоплазматический транскрипт подвергается сплайсингу и транспортируется в цитоплазму, где он связывается с рибосомами и возможно участвует в регуляции синтеза белка. Ядерный транскрипт также регулирует

синтез белка, контролируя сплайсинг и транспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Уровень транскрипта А положительно регулируется стрессорными воздействиями среды (охлаждение, перегрев), однако характер регуляции их уровня иной нежели у белков теплового шока, не проявляющих выраженной конститутивной экспрессии. Уровень транскрипта omega-n не меняется при стрессе (Collinge et al., 2008). При тепловом шоке ядерное распределение omega-n быстро меняется, при этом транскрипт связывается с гетерогенными ядерными рибонуклеопротеидами (hnRNPs, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins), тем самым затормаживая созревание пре-мРНК (сплайсинг и транспорт). Связывание происходит с мотивом AUAGGUAGG, который дважды повторяется в повторе на 3-конце транскрипта (Lakhotia et al., 1999).

Мисэкспрессия гена *Hsrw* в нервной системе посредством *scrt¹¹⁻⁶-Gal4/UAS* приводит к дефектам развития аксональных пучков ЦНС и моторных нервов в эмбрионе (Minidorff et al., 2007). Р-инсерционные аллели *Hsrw* (инсерция перед транскриптом на расстоянии 130 п.н. от 5-конца основных четырех транскриптов), демонстрирующие сверхэкспрессию *Hsrw*, усиливают нейродегенерацию в глазах мухи, вызываемой экспрессией генов, белки которых содержат полиглутаминовые повторы. Тот же эффект имеет нуль-мутация гена *Hrb87F*, кодирующего hnRNPA1. Наоборот, локальная репрессия гена *Hsrw* (*GMR-GAL4/UAS-RNAi*) приводила к ослаблению токсичного эффекта полиQ-белка и препятствовала формированию телец включения (Mallik, Lakhotia, 2009).

В линии 5433-t3 снижение частоты инициаций побегов (почти в 8 раз) и уменьшение длительности импульсной посылки (на 34%) вероятно связаны со сверхэкспрессией гена, что приводит к дефектам развития нервной системы, вызванной нарушениями в регуляции созревания пре-мРНК и белкового синтеза.

Линия 5769

Инсерция произошла в точке 2L:10342643[+] в гене *Sps2* на расстоянии 49 п.н. от 5-конца. Аннотировано 4 транскрипта (FlyBase, flybase.org). Ортологами *Sps2* у млекопитающих, в том числе у человека, по данным проекта Ensembl

(ensembl.org) являются гены *SEPHS1* и *SEPHS2*, которые, в свою очередь, являются паралогами.

SEPHS2 млекопитающих кодирует синтетазу моноселенофосфата, dSPS2 (Xu et al., 2007a). Моноселенофосфат необходим для синтеза аминокислоты селеноцистеина. Нокдаун *SEPHS2* в клеточной культуре NIH3T3 (из фибробластов мыши) вызывает прекращение синтеза селенопротеинов, белков, содержащих селеноцистеин (Xu et al., 2007b). Большинство селенопротеинов с известным типом каталитической активности действуют как оксидоредуктазы, используя селеноцистеин непосредственно для катализа и поддержания клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза.

У *Drosophila melanogaster* обнаружено 3 селенопротеина: прежде всего, сам dSPS2, а также dSelH и dSelK (Castellano et al., 2001). Видимо, именно dSelH и dSelK определяют биологические эффекты селена у дрозофилы. Отсутствие селена в питательной среде значительно сокращает продолжительность жизни дрозофилы, а также сокращает вдвое количество откладываемых яиц (Martin-Romero, et al., 2001). Гомолог dSelH у млекопитающих, SelH, является ядерным белком, который имеет тиоредоксин-подобную структуру и обладает глутатионпероксидазной активностью *in vitro* (Novoselov et al., 2007). SelH усиливает транскрипцию генов, вовлеченных в синтез глутатиона, а также генов, работающих на второй фазе детоксикации (Panee et al., 2007). У дрозофилы нокдаун *dSelH* при помощи РНК-интерференции значительно сокращает выживание эмбрионов, а в культуре клеток дрозофилы S2 существенно снижается общий антиоксидантный статус (Morozova et al., 2003). Селенопротеин dSelK является резидентным белком в мембранах аппарата Гольджи и эндоплазматической сети и играет важную роль в защите клеток от апоптоза, индуцированного стрессом, а также в иммунном ответе (Chen et al., 2006; Du et al., 2010; Verma et al., 2011). В исследовании Щедриной с соавт. (Shchedrina et al., 2011) прекращение синтеза селенопротеинов у дрозофилы не вызывало изменений в длительности жизни мух и их устойчивости к оксидативному стрессу, однако усиливало их восприимчивость к голоданию. Эти данные

согласуются с фактом усиления экспрессии *Sps2* в условиях голодания (Harbison et al., 2005).

Снижение всех локомоторных параметров в линии 5769 вероятно связано с нарушениями в синтезе селенопротеинов, однако роль последних в реализации локомоторных функций не ясна. Очень интересно избирательное сокращение МИИ при сохранении остальных песенных параметров в норме, что может быть связано именно с нарушением функционирования элементов песенного ЦГМП, а не с отклонениями в регуляции генератора (von Philipsborn et al., 2011).

Линия 2169

Инсерция произошла в точке 2R:13435745[+] в гене *MESR4* на расстоянии 471 п.н. от 5'-конца. Аннотировано 4 транскрипта (FlyBase, flybase.org). Ортологи *MESR4* у млекопитающих не описано. В различных исследованиях на дрозофиле отмечается (Huang, Rubin, 2000; Rebay et al., 2000), что *MESR4* возможно действует в качестве антагониста сигнального пути белка Ras и митоген-активируемой киназы MAPK (mitogen-activated protein kinase). Продукт гена обнаруживается в ядерном экстракте из задержанной на S-стадии клеточной культуры S2 среди MPM-2-реактивных белков тельца гистонового локуса (HLB, histone locus body) (White et al., 2011).

В линии 2169 в 6 раз снижен индекс двигательной активности вследствие 6-кратного снижения частоты побежки, при этом длительность и скорость побежки сохраняются в норме. В 2 раза увеличен индекс импульсной песни преимущественно за счет увеличения частоты инициаций пения. На 18% увеличен межимпульсный интервал, на 15% снижена несущая частота импульса. Эффекты мутации этого гена, вероятно, обусловлены нарушением негативной регуляции Ras/MAPK сигнальных каскадов, задействованных в процессах развития дрозофилы (Sung et al., 2010).

Линия 3389

Инсерция произошла в точке 2L:12002261[-] в некодирующей части первого экзона гена *CG6746* на расстоянии 5 п.н. от 5'-конца. Аннотирован 1 транскрипт (FlyBase, flybase.org). Ортологами *CG6746* у млекопитающих, в том числе у

человека, по данным проекта Ensembl (ensembl.org) являются гены *PTPLa* и *PTPLb*, которые, в свою очередь, являются паралогами.

PTPLa является тирозиновой фосфатазой, которой приписывается участие в кардио- и миогенезе (Uwanogho et al., 1999). Миобласты при отсутствии PTPLa остаются незрелыми и не могут дифференцироваться в волокна (Lin et al., 2012). Мутации *PTPLa* обнаруживаются у пациентов, страдающих аритмогенной вентрикулярной дисплазией и врожденной миопатией (Pele et al., 2005; Konishi et al., 2010). У дрозофилы экспрессия *CG6746* максимальна в тканях зоба и задней кишки, жирового тела, хитинового скелета, сердца и сперматеки (Chintapalli et al., 2007, FlyAtlas, flyatlas.org).

Локомоторная депрессия в линии 3389 вероятно связана, как и в линии 2169, с нарушениями в сигнальных путях, регулирующих развитие и дифференциацию тканей (Ras/MAPK сигнальный путь). При этом нарушения довольно специфичны, так 3 из 4 параметров песенной активности остаются в норме (увеличена длительность посылки импульсной песни).

Линия 7081

Инсерция произошла в точке 3L:12118218[-] в некодирующей части первого экзона гена *ups* на расстоянии 32 п.н. от 5-конца. Аннотировано 2 транскрипта (FlyBase, flybase.org). Гомологами *ups* у человека являются *YBX1* и *YBX2* (Ensembl, ensembl.org).

ups – белок группы Y-box – в яичнике является компонентом рибонуклеопротеинового комплекса, который также содержит белок eхi, играющий важную роль в локализации мРНК (Thieringer et al., 1997; Wilhelm et al., 2000). Y-box – это семейство белков, связывающих нуклеиновые кислоты, представители которого встречаются как у позвоночных, так у беспозвоночных (Matsumoto, Wolffe, 1998). Все белки семейства Y-box содержат домен, связывающий нуклеиновую кислоту и домен холодового шока, который был идентифицирован в ряде бактериальных белков, индуцируемых низкой температурой (Phadtare et al., 1999). У *E. coli* главный белок холодового шока CspA связывает РНК, действует как шаперон, чтобы изменить вторичную

структуру РНК и усиливает трансляцию РНК-мишени (Jiang et al., 1997). У позвоночных, белки Y-box играют регуляторную роль в транскрипции и трансляции. Несколько генов Y-box экспрессируются в значительной мере в зародышевых клетках, где они выполняют функцию трансляционных репрессоров аккумулярованной материнской мРНК (Matsumoto et al., 1996; Davies et al., 2000).

ups функционально противодействует белку *orb*, который физически связан с самим белком *ups* и белком *exi* через РНК. Взаимодействия этих 3х белков опосредуются РНК. Показано, что *ups* и *orb* конкурентно связываются с мРНК гена *osk*, вызывая противоположные эффекты на трансляцию и локализацию РНК (Mansfield et al., 2002). Однако *ups* не противодействует трансляционной активации мРНК *osk* фактором *orb*, а действует антагонистически фактору *orb* в организации микротрубочкового цитоскелета. *orb* вероятно контролирует организацию микротрубочек, регулируя трансляцию каких-то других мРНК, и принципиальная функция его взаимодействия с мРНК *osk* заключается в регуляции трансляции фактора путем образования длинного полиА-хвоста (Castagnetti, Ephrussi, 2003). Таким образом, *ups* вероятно противодействует эффектам *orb* на трансляцию РНК, регулирующей микротрубочковую организацию. Это соответствует биохимическим характеристикам *ups*, как компонента мультипротеинового комплекса, содержащего *exi* и *me31b*, которые предположительно репрессируют трансляцию многих ооцитарных РНК (Martin, et al., 2003)

Изменение моторных показателей в линии 7081 преимущественно происходит в сторону уменьшения показателей. Выявленный в данной линии моторный фенотип может быть связан с нарушениями в регуляции экспрессии генов на ранних этапах развития, вызванных, в том числе, аномалиями в регуляторных перестройках микротрубочковой сети, влияющими на распределение факторов в формирующемся яйце и эмбрионе.

Линия 5493

Инсерция произошла в точке 3R:6182222 [+] в интроне между первым и вторым экзоном гена *jumi*. Аннотирован 1 транскрипт (FlyBase, flybase.org).

Гомологами *jumi* у человека являются *FOXN1* (Ensembl, ensembl.org). *jumi* кодирует транскрипционный фактор, для которого установлено участие в нейрогенезе, развитии глаз, крыльев, щетинок (Cheah et al., 2000; Sugimura et al., 2000). *jumi* необходим для ассиметричной дифференцировки клеток при делении нейробластов GMC4-2a, которая обеспечивается ассиметричной локализацией и сегрегацией белков Pon/Numb. Маловероятно, что этот ген действует на уровне постмитотических нейронов. У Р-инсерционных мутантов *jumi* наблюдается дупликация моторных нейронов RP2 в эмбрионе. Делеции, приводящие к полному выключению гена (*jumi L70*), усиливают выраженность описанных отклонений, приводя к летальности (Cheah et al., 2000).

jumi в зависимости от стадии развития и органа характеризуется как гаплосупрессор и гаплонхансер эффекта положения мозаичного типа (PEV, position-effect variegation), т.е. влияет на фенотипические проявления признака в случае транслокации гена, обуславливающего признак, в область прилежащую к гетерохроматину (Hofmann, et al., 2009). Белок *jumi* локализуется в ядре, где влияет на структуру хроматина у дрозофилы. Иммуноокрашивание показало его концентрирование в гетерохроматиновых центромерных областях (Strodicke, et al., 2000). Действие *jumi* на структуру хроматина возможно осуществляется также через регуляцию экспрессии, в частности гена, кодирующего полипептид Hrp, который взаимодействует с белками периферического гетерохроматина HP1 (Schwendemann et al., 2008).

Эффекты мутации *jumi* в линии 5493 (уменьшение локомоторных параметров, увеличение МИИ) вероятнее всего обусловлены комплексными нарушениями в развитии нервной системы, которые могут затрагивать, в том числе, и низшие уровни моторных систем, расположенные в брюшной цепочке.

Линия 5180-t3

Инсерция произошла в точке 3R:2901187[+] в интроне между первым и вторым экзоном гена *CG1943*. Аннотировано 4 транскрипта (flybase.org). Ортологи *CG1943* обнаруживаются только в пределах таксонов насекомых (Ensembl, ensembl.org). В гене отсутствуют консервативные домены и повторы

(InterPro, ebi.ac.uk/interpro, accession number Q9VI56). На стадии личинки *CG1943* мощно экспрессируется во всех тканях; на стадии имаго – в ЦНС, кишечнике, в слюнных и половых железах, яичнике (Chintapalli et al., 2007, FlyAtlas, flyatlas.org). Влияние сверхэкспрессии *CG1943* на развитие крыла в линии *Bx¹/Y; ap^{gal4}/+* позволило предположить участие данного гена в определении дорсовентрального паттерна имагинального диска крыла (Bejarano et al., 2008). Данные Хадар с соавт. (Nadar et al., 2012) в дальнейшем позволили уточнить, что *CG1943* вовлечен в сигнальные пути морфогенов Dpp и Wg, определяющих развитие крыла.

Хауссманн с соавт. (Hausmann et al., 2008) отмечают, что мутация *CG1943* приводит к снижению количества синаптических бутонов у мутантов по гену *ewg*, который вовлечён в регуляцию синаптического роста у дрозофилы. Также выявлены корреляции между уровнем экспрессии *CG1943* и поведенческими особенностями мух. В специально выведенных линиях дрозофилы с увеличенным уровнем агрессивности выявлено увеличение экспрессии *CG1943* в 1,36 раза (Dierick, Greenspan, 2006).

В линии 5180-t3 частота инициаций побегки снижена на 71%, скорость побегки – на 7%, межимпульсный интервал увеличен на 15%, а несущая частота снижена на 15%. Отклонения в паттерне песенной активности могут быть связаны с развитием крыла, однако подавление локомоторной активности указывает на системность нарушений, в том числе и в нервной системе.

Линия 2248

Инсерция произошла в точке 2L:19190341[-] перед геном на расстоянии одного нуклеотида от 5'-конца гена. Аннотировано 2 транскрипта (FlyBase, flybase.org). Ортологом гена *drl* у человека является ген *RYK*.

drl кодирует тирозинкиназный рецептор, лигандом которого является белок Wnt5 (Wnt/Ryk сигналинг), выделяемый аксонами нейронов (Dura et al., 1995; Yoshikawa et al., 2003). Для *drl* показано участие в направлении роста аксонов в брюшной нервной цепочке на стадии эмбрионального развития, развитии мозга имаго в процессе метаморфоза, в формировании нервно-мышечных синапсов

личинки и других процессах развития (Bonkowsky et al., 1999; Simon et al., 1998; Liebl et al., 2008). У имаго мутантов по *drl* обнаружены существенные структурные дефекты грибовидных тел, центрального комплекса и антеннальных долей, которые вызывают нарушения в обучении мутантных по этому гену мух (Moreau-Fauvarque et al., 1998; Yao et al., 2007).

Локомоторная активность в линии 2248 снижена по всем параметрам, увеличена длительность посылки импульсной песни (на 80%), на 13% снижена несущая частота цикла. С учетом отсутствия достоверных изменений в значениях МИИ наблюдаемые отклонения в моторной активности вероятнее всего связаны в первую очередь с нарушениями регуляторных систем в мозге мух, что соответствует морфологическим данным по мутантам гена *drl*. В то же время снижение несущей частоты импульса может быть вызвано нарушениями в нервно-мышечных контактах.

Следует отметить сходство отклонений в моторных параметрах у линии 2248 и 3389, которое может объясняться общностью физиологических нарушений у данных мутантных линий вследствие близости функциональных характеристик сигнальных каскадов MAPK и Wnt/Ryk (Katso et al., 1999).

Линия 4653

Инсерция произошла в точке 2R:4047132[+] в кодирующей части последнего экзона в гене *CG8708* на расстоянии 221 п.н. от 3-конца гена. Аннотировано 3 транскрипта (FlyBase, flybase.org). Ортологом гена *CG8708* у человека является ген *C1GALT1* (Ensembl, ensembl.org).

CG8708 кодирует фермент галактозилтрансферазу, катализирующую в цистернах аппарата Гольджи перенос галактозы на N-ацетилгалактозамин (beta-1,3-связь) в гликопротеинах слизи (Muller et al., 2005; Yamamoto-Hino et al., 2012). У дрозофилы обнаружено всего 4 таких фермента с галактозилтрансферазной активностью (Muller et al., 2005), которые кодируются генами *CG9520*, *CG8708*, *CG34056* и *CG2975*. При этом продукт кодируемый геном *CG9520* *in vitro* имеет активность приблизительно в 100 раз больше активности продуктов, кодируемых тремя остальными генами, что может быть связано с отсутствием необходимых

кофакторов и шаперонов для работы остальных трех ферментов (Ju, Cummings, 2002). *CG8708* экспрессируется в слюнных железах личинки и имаго (более длинный транскрипт), и в половой системе самцов (короткий транскрипт). На эмбриональной стадии *CG8708* экспрессируется в зачатках слюнных желез. Но при этом снижение количества транскрипта *CG8708* у Р-инсерционных мутантов на 75% не нарушает морфогенез этого органа, что однако не исключает роли этого гена в функционировании желез (Arbeitman et al., 2004; Lin et al., 2008; Yoshida et al., 2008).

Линия 4653 имеет нестандартный фенотип. Это единственная из отобранных линий демонстрирует снижение частоты побегов (почти в 3 раза) и одновременно увеличение длительности и скорости побежки (на 40% и 10% соответственно). В импульсной песне снижена частота инициаций на 53% и несущая частота импульса – на 7%. Существующих данных не достаточно для понимания связи между описанными моторными отклонениями у мутантов по гену *CG8708* с галактозилтрансферразной активностью продукта гена. Стоит только отметить, что, так как инсерция произошла в конце гена, то уровень экспрессии и паттерн должны сохраняться в норме, однако сам продукт будет обрезан и, как следствие, будет иметь измененные структурные и функциональные характеристики.

Линия 663

Инсерция произошла в точке 2R:5842843[-] в начале гена *Mef2* на расстоянии 3520 п.н. от 5-конца гена. Аннотировано 7 транскриптов (FlyBase, flybase.org). *Mef2* кодирует транскрипционный фактор (ТФ), осуществляющий положительную регуляцию экспрессии (Tanaka et al., 2008). Ортологами гена *Mef2* у млекопитающих являются группа генов *MEF2* (Black, Olson, 1998).

Семейство ТФ *Mef2* играет важную роль в развитии скелетных, гладких и сердечных мышц. Четыре фактора *Mef2* существуют у позвоночных (A-D), один идентифицирован у дрозофилы. Все эти факторы имеют гомологию по консервативным доменам MADS и домену MEF2, расположенным на N-конце. *Mef2* связывают в виде димеров консенсусную последовательность

YTAWWWWTAR (Y, C/T; W, A/T; R, A/G), обнаруженную в регуляторных областях многих генов, чья активность связана с мышцами. У позвоночных *Mef2*-с экспрессируется первым из всех четырех генов на стадии эмбриогенеза в миокардиальных предшественниках. Высокий уровень экспрессии можно детектировать в клеточных линиях развивающихся скелетных и гладких мышц, а также в развивающейся ЦНС (Black, Olson, 1998).

Экспрессия *Mef2* у дрозофилы начинает определяться в клетках-предшественниках мезодермы перед гастрულიей и продолжается далее в мезодерме. Далее экспрессия *Mef2* сохраняется в клетках-предшественниках и дифференцирующихся клетках соматической и висцеральной мускулатуры и сердечной трубки (Lilly et al. 1994; Nguyen et al. 1994). Эмбрионы дрозофилы лишенные *Mef2* погибают во время эмбриогенеза и показывают полное отсутствие дифференцированных мышечных волокон (Bour et al. 1995; Lilly et al. 1995). Тот факт, что большое количество мышечных структурных генов содержат функциональные *Mef2*-связывающие сайты в составе промоторов, или их экспрессия сильно зависит от функционирования *Mef2*, поддерживает прямую роль *Mef2* в регуляции миогенеза и объясняет выраженные мышечные дефекты у животных с нуль-мутацией в *Mef2* (Bagni et al., 2002; Kelly et al. 2002).

Если экспрессия этого гена значительна и существенна на стадии куколки, то роль *Mef2* в миогенезе на стадии личинки и взрослого насекомого является уже менее критичной. Термочувствительные мутанты показывали высокую выживаемость на стадии личинки при включении рестриктивной температуры. 10% животных развивались до стадии имаго, хотя имели сниженные показатели локомоции и не могли летать (Baker et al., 2005).

В работе Куна с соавт. (Cunha et al., 2010) отмечается, что действие *Mef2* зависит от его концентрации, и всегда проявляется на фоне взаимодействия с другими факторами. *Mef2* имеет ядерную локализацию. Экспрессия самого *Mef2* управляется ТФ *twi* и *sna*, регуляторными факторами развития мезодермы. При этом активность *twi* необходима для экспрессии *Mef2*, а *sna* – для ее поддержания на должном уровне (Lilly et al. 1995; Nguyen et al. 1994; Taylor et al. 1995).

На млекопитающих показано, что MEF2 участвует в регуляции формирования синапсов в зависимости от активности нейрона (Flavell et al., 2006; Shalizi et al., 2006). Гены, вовлеченные в развитие синапсов, являются мишенями MEF2 в нейронах, среди которых также гены, связанные с развитием эпилепсии и аутизма (Flavell et al., 2008). У имаго дрозофилы *Mef2* экспрессируется в некоторых нейронах мозга (Taylor et al., 1995), в том числе в нейронах-часах. Установлено, что нарушение нормального функционирования *Mef2* в нейронах-часах вызывает поведенческую аритмию (аномальные суточные колебания двигательной активности). Сверхэкспрессия *Mef2* замедляет молекулярные часы и приводит к десинхронизации активности в пуле малых вентральных латеральных нейронов-часов, являющихся пейсмейкерными клетками, а при нокдауне *Mef2* колебания молекулярных ритмов ослабевают. Таким образом, *Mef2* поддерживает суточные ритмы активности, регулируя экспрессию основных генов-часов, или влияя на взаимодействие нейронов-часов (Blanchard et al., 2010).

Действие мутации гена *Mef2* в виде депрессии моторной активности, вероятнее всего, связано с нарушениями в развитии мускулатуры животного. Вместе с тем увеличение МИИ на фоне данных об участии гена в работе нейронов мозга имаго указывают на возможные аномалии в развитии или работе элементов ЦНС. Интересно, что мутация по гену *Cf2*, активность которого регулируется геном *Mef2* и также связана с развитием мускулатуры, приводит к сходным локомоторным отклонениям, однако межимпульсный интервал у мутанта в линии 3742 остается в норме. Данное отличие в фенотипических отклонениях двух мутантов может быть связано именно с особой ролью *Mef2* в развитии и функционировании нервной системы. Также следует отметить, что инсерция в линии 663 произошла в интроне транскриптов *Mef2-RH* и *Mef2-RF*, но не затронула основные 4 транскрипта (*Mef2-RA/B/C/D*), которые отстоят от точки инсерции на расстоянии более 22000 п.н., и, соответственно, описанный фенотип мутантов линии 663 определяется нарушениями в регуляции и синтезе именно *Mef2-RH* и *Mef2-RF*.

Линия 3494

Инсерция произошла в точке 2R:2389393[-] перед геном *jing* на расстоянии 128 п.н. от 5'-конца гена. Аннотировано 6 транскриптов (FlyBase, flybase.org). Ортологом гена *jing* у человека является ген *AEBP2* (Ensembl, ensembl.org).

Ген *jing* был идентифицирован при скрининге мутаций, вызывающих дефекты миграции краевых (пограничных) клеток в яйце дрозофилы и нарушения в развитии клеток средней линии во время эмбриогенеза. При этом было определено, что *jing* управляется геном *slbo* и локализуется в ядре. (Liu, Montell, 2001). В исследовании Седагата с соавт. (Sedaghat et al., 2002) показано, что содержащий домены «цинковые пальцы» ТФ *jing* обеспечивает дифференцировку клеток эктодермальных производных в эмбрионе. Транскрипты *jing* аккумулируются в ядрах клеток срединной линии ЦНС, прилегающей нейроэктодермы, мозга и трахейной системы. В срединной линии ЦНС *jing* необходим для формирования комиссуральных и продольных аксонов (у мутантов пучки волокон не выходят за пределы сегментов, а проецируются контралатерально, в то время как в норме их проекции ипсилатеральны), латерального позиционирования продольной глии, ее жизнеспособности (у мутантов в глиальных клетках брюшной цепочки запускается механизм апоптоза). В эмбрионах мутантов *jing* снижены показатели маркеров клеточных линий, из которых формируются мотонейроны и интернейроны брюшной нервной цепочки, что связывается с программируемой гибелью нейронов. При этом выявленные дефекты не затрагивают периферическую нервную систему. Наряду с особой ролью *jing* в развитии ЦНС данный ген также глобально влияет на формирование трахейной системы, определяет развитие крыльев и формирование проксимо-дистальной оси в развивающейся ноге (Sedaghat et al., 2002; Culi et al., 2006).

На молекулярном уровне *jing*, управляемый генами *sim* и *tracheiless*, контролирует тирозинкиназный сигнальный путь (МАРК), активируя экспрессию генов рецептора эпидермального фактора роста *Egfr* и рецептора фактора роста фибробластов *btl* (Sedaghat et al., 2002; Sonnenfeld et al., 2004). Следует также

отметить наличие в составе гена *jing* двух областей, связывающих белок Rhino. У мутантов по гену *Rhino* многократно усиливается экспрессия транспозонов, расположенных непосредственно перед *jing* и в составе крупного интрона в начале гена при неизменной экспрессии экзонов гена (Klattenhoff et al., 2009). Не исключено, что инсерция у мутантов линии 3494 может нарушать экспрессию не только *jing*, но и транспозонов в составе гена.

В линии 3494 частота побегов увеличена на 85%, длительность и скорость побежки уменьшены на 26 и 29% соответственно. В импульсной песне самца наблюдаются обратные закономерности: частота посылок снижена на 38%, а длительность посылок увеличена на 68%. Межимпульсный интервал сохраняется в норме, но несущая частота импульса снижена на 15%. Фенотипические отклонения, скорее всего, могут быть связаны с аномальным развитием ЦНС, трахейной системы, конечностей и крыльев.

Линия 843К

Инсерция произошла в точке 2R:14059049[+] в начале гена *Dgp-1* на расстоянии 1063 п.н. от 5-конца гена. Аннотировано 2 транскрипта (FlyBase, flybase.org). В составе гена обнаруживается несколько консервативных доменов, указывающих на наличие у продукта *Dgp-1* ГТФазной активности и выполнение им функций фактора элонгации (InterPro, ebi.ac.uk/interpro, accession number Q9U9K4). Ортологами гена *Dgp-1* у человека являются гены *GTPBP1* и *GTPBP2* (Ensembl, ensembl.org).

Ген *GTPBP1* положительно регулируется интерфероном гамма и кодирует белок, который является членом семейства AGP11/GTPBP1 ГТФ-связывающих белков. Иммуногистохимический анализ на тканях мыши выявил экспрессию *GTPBP1* в некоторых нейронах, клетках гладких мышц различных органов, а также в макрофагах. GTPBP1 локализован исключительно в цитоплазме и распределен в виде диффузной гранулярной сети, формирующей градиент от ядра к периферии клетки. Мутация гена, которая нарушает экспрессию гена, не приводит к отклонениям в хемотаксисе, фагоцитозе, продукции оксида азота, иммунном ответе на белковый антиген. Отсутствие фенотипических проявлений

мутации может быть связано с компенсацией *GTPBP1* геном *GTPBP2*, продукт которого сходен по структуре и распределению в ткани с продуктом *GTPBP1* (Senju et al., 2000).

У дрозофилы в условиях гипероксии показано усиление экспрессии *Dgp-1* в голове мухи в 1.6 раза. Авторами выявленный ими факт связывается с вовлеченностью данного гена в нейрональные защитные механизмы, активируемые на оксидативный стресс (Gruenewald et al., 2009). В исследовании Жирардота с соавт (Girardot et al., 2004) также наблюдалось усиление экспрессии *Dgp-1* более чем в 2 раза при оксидативном стрессе (индуктор стресса – паракват и перекись водорода). Экспрессия генов *Dgp-1* и *Map205* (см. ниже) также увеличена почти в 2 раза у мутантов по гену *parkin* (на стадии куколки), который кодирует лигазу белка убиквитина и прекращение функционирования которого приводит к развитию аутосомального рецессивного ювенильного паркинсонизма. Кроме того, у мутантов по гену *parkin* при прекращении функционирования генов *Map205* и *Dgp-1*, снижается выживаемость на 25 и 100% соответственно (Greene et al., 2005).

В линии 843К частота инициаций побегов увеличена более чем в 2 раза. Длительность и скорость побегки снижены на 26 и 19%. Частота инициаций посылок импульсной песни увеличена в 2.3 раза, длительность посылок увеличена на 42%. Несущая частота импульса снижена на 8%, межимпульсный интервал не изменен.

Выживаемость мутантов с нефункционирующим *GTPBP1* и усиление экспрессии *Dgp-1* при оксидативном стрессе и мутации убиквитинлигазы позволяют предположить особое значение продуктов этих генов в противодействии нарушениям белкового метаболизма. Роль этих генов в конститутивном синтезе белков вероятно не является существенной, иначе организм погибал бы еще в самом начале развития, хотя отключение гена *GTPBP1* может компенсироваться паралогом *GTPBP2*, имеющего сходное распределение в тканях. Следует отметить, что для гена *Dgp-1* также обнаруживается паралог *CG2017* (Ensembl, ensembl.org).

Принимая во внимание вышесказанное, можно предположить, что инсерция в *Dgp-1* приводит к нейродегенерации, связанной с неправильным фолдингом белков, их агрегацией. Интересно, что мутация по гену *Map205* (линия 5567a), задействованному в ремоделировании тубулиновых волокон (Goldstein et al., 1986) и прекращение активности которого усиливает летальность мутантов *parkin*, также приводит к снижению скорости побежки и несущей частоты импульсной песни, но не затрагивает тайминг импульсов.

Линия 3290

Инсерция произошла в точке 2R: 12716378[-] за геном *CG34460* на расстоянии 1118 п.н. от 3-конца гена. Аннотирован 1 транскрипт (FlyBase, flybase.org). Ортологов *CG34460* у млекопитающих не описано.

Р-инсерционные мутанты по гену *CG34460* (самцы) характеризуются меньшими размерами тела (Carreira et al., 2009). В исследовании Менча с соавт. (Mensch et al., 2008) отмечается увеличение сроков развития мутантов по гену *CG34460* при 17°C, в то время как при 25°C отклонений в сроках не наблюдается.

Продукт гена *CG34460* относится к недавно выделенному семейству белков SVC. В отличие от большинства генов дрозофилы гены группы SVC не экспрессируются во время развития, а мисэкспрессия не оказывает влияния на выживаемость. Вероятно, данное семейство специфично для артропод. Некоторые гены семейства регулируются наличием питательных веществ или экспрессируются в ответ на бактериальную инфекцию. Предположительно продукты генов SVC секретируются в гемолимфу в ответ на стрессорные воздействия окружающей среды (Sheldon et al., 2007).

Частота инициаций побежки увеличена на 62%, скорость побежки снижена на 14%. Длительность побежки не изменена. Длительность отдельной посылки импульсной песни увеличена на 72%, а межимпульсный интервал и несущая частота импульса снижены на 5% и 9% соответственно. Учитывая максимум экспрессии *CG34460* у самцов имаго исключительно в семенниках (Chintapalli et al., 2007, FlyAtlas, flyatlas.org), данный ген может кодировать секретируемый белок семенников, возможно с защитными, бактерицидными свойствами. Хотя

возможно, что данный ген вовлечен и в регуляцию сигнальных путей. Показано участие продукта гена *CG34460* в передаче сигнала от трансформирующего фактора роста бета-TGF и костных морфогенетических белков BMPs в ядро клетки (Xu et al., 2007в).

Линия 5567a

Инсерция произошла в точке 3R:27894136[-] в некодирующей части первого экзона гена *Map205* на расстоянии 27 п.н. от 5-конца гена. Аннотировано 3 транскрипта (FlyBase, flybase.org).

Продукт гена *Map205* – белок, связанный с микротрубочками (205кДа), – первоначально выделен из культуры клеток дрозофилы S2 (Schneider line 2 cells). Было установлено, что *Map205* колокализуется с веретеном деления и цитоплазматической сетью микротрубочек, а также обладает необычными свойствами. *Map205* остается растворим в воде при 100°C и 0.75M NaCl в течение 5 минут и может ренатурировать после подобных воздействий. Гомозиготные мутанты по гену *Map205* жизнеспособны. Время выхода из куколок, темпы развития и плодовитость не отличаются от дикого типа (Goldstein et al., 1986), сохраняется в норме дендритное ветвление сенсорных нейронов IV класса (Parrish et al., 2007). Р-инсерция в точке 27894137 приводит к снижению уровня белка *Map205* до 25% от уровня экспрессии у линии дикого типа (Pereira et al., 1992). Экспрессия *GFP*, внедренного в *Map205*, обнаруживается в аксонах грибовидных тел (Rolls et al., 2007).

Map205 можно отнести к отдельной группе MAP белков, которые специфично связываются с моноклональными AX3-антителами, полученными для MAP-белков слизевика *Dictyostelium*. Данная группа является консервативной, представители которой обнаружены в клетках птиц и млекопитающих. Вместе с тем, наряду с группами белков MAP2, MAP4 и тау, *Map205* можно отнести к общему классу термостабильных, фибриллярных MAP-белков (Irminger-Finger et al., 1998; Kimble et al., 1992).

Консервативная протеинкиназа Polo, контролирующая множественные события при митозе, связана с микротрубочками в интерфазе и на стадии

цитокинеза за счет некаталитического взаимодействия с Map205. Связывание Polo и Map205 обеспечивает контроль активности киназы на субклеточном уровне наравне с протеолизом и фосфорилированием этого фермента. Показано *in vivo*, что связывание Polo с Map205 подавляет клеточную активность киназы. Фосфорилирование Map205 по CDK-сайту приводит к высвобождению и активации Polo. В синцитиальных эмбрионах с гипоморфной аллелью гена *Polo* наблюдаются centrosomные дефекты, усиливаемые сверхэкспрессией *map205* и подавляемые его удалением. Возможно, связывание Polo с Map205 обеспечивает быструю и локальную регуляцию активности этой киназы при начале митоза (Archambault et al., 2008). На клеточной культуре S2 зафиксированы отклонения в протекании митоза и некоторая дезорганизация (фрагментирование) микротрубочек в экспериментах с подавлением экспрессии *Map205* интерферирующей РНК (Dobbelaere et al., 2008).

Интересен также факт участия Map205 в регуляции белком TDP-43 метаболизма эрдистероидного рецептора. Именно усиление нейрональной экспрессии *Map205* при изменении уровня экспрессии *TDP-43* связывают с аномальным накоплением эрдистероидного рецептора в цитоплазме и с развитием такого заболевания как амиотрофический латеральный склероз (Vanden Broeck et al., 2013).

В линии 5567а увеличен индекс локомоторной активности на 45% за счет увеличения длительности побежки на 57%, при этом скорость побежки снижена на 16%. Частота инициаций песни ухаживания и длительность отдельной посылки увеличены в 2.6 и 2.2 раза соответственно. Несущая частота импульса снижена на 19%, МИИ не показывает достоверных отклонений. С учетом косвенных фактов об экспрессии *Map205* в аксонах грибовидных тел мозга, наблюдаемые отклонения могут быть связаны с нарушением регуляторных влияний из мозга на исполнительные моторные системы, которые, в свою очередь, кардинально не затронуты, учитывая сохранение тайминга импульсов.

Линия 3979a-s2

Инсерция произошла в точке 2R:18199553[-] перед геном *wdp* на расстоянии 111 п.н. от 5-конца гена. Аннотировано 5 транскриптов (FlyBase, flybase.org). Ортологов у млекопитающих не известно.

wdp обнаруживается во фракции белков, выделенных в составе микросом (мембранные структуры) из головы дрозофилы (Khanna et al., 2010). В эмбрионе дрозофилы экспрессия *wdp* ограничена зачатками трахейной системы (Huff et al., 2002). В составе гена *wdp* 2 типа консервативных доменов: повторы богатые лейцином (LRR, Leucine-rich repeat) и богатый цистеином фланговый участок на С-конце (Cysteine-rich flanking region, C-terminal domain) (InterPro, ebi.ac.uk/interpro, accession number Q8IGN2). К группе LRR-белков относятся тирозинкиназные рецепторы, белки клеточной адгезии, факторы вирулентности, гликопротеины, связывающие экстрацеллюлярный матрикс (Rothberg et al., 1990). Сходно с другими LRR-белками при сверхэкспрессии в мышцах личинки *wdp* вызывает нарушения в иннервации отдельных мышц аксонами мотонейронов (mistargeting). Также обнаруживаются отклонения в структуре аксональных бутонов без видимых дефектов мышц (Kigusu et al., 2008). Эти данные об участии *wdp* и других LRR-белков в направлении роста аксонов к конкретным мышечным волокнам также предполагают выполнение LRR-белками рецепторных функций.

Индекс двигательной активности увеличен за счет увеличения длительности пробежки на 58%. Скорость пробежки снижена на 8%. Индекс импульсной песни увеличен в 3 раза как за счет роста инициаций посылок на 76%, так и за счет увеличения длительности посылок на 98%. МИИ без достоверных изменений, а несущая частота снижена на 11%. Снижение несущей частоты и скорости пробежки может быть объяснено нарушением мышечной иннервации, определяемой LRR-белками в мембране мышечных волокон, к которым вероятно относится и продукт гена *wdp*.

Линия 6387a-s2

Инсерция произошла в точке 2R:12036471[+] в начале гена *Ext2* на расстоянии 673 п.н. от 5-конца гена. Аннотировано 2 транскрипта (FlyBase,

flybase.org). Ген *Ext2* имеет координаты, идентичные таковым у гена *CG10731*. Последний кодирует один транскрипт, рамка считывания в котором не совпадает с рамкой считывания транскриптов гена *Ext2* (двухцистронная РНК).

Ортологом *CG10731* у человека является ген *ATP5S*, кодирующий субъединицу s митохондриального комплекса Fo, транспортирующего протон в АТФсинтазе (Ensembl,ensembl.org). Субъединица s (или иначе фактор b) обратимо связывается с Fo компонентом АТФсинтазы и тем самым регулирует (предотвращает) утечку протонов на внешнюю сторону мембраны (Belogrudov, Natefi, 2002). Экспериментальные данные по гену *CG10731* отсутствуют.

Ортологом *Ext2* у млекопитающих является ген *EXT2* (Ensembl,ensembl.org). Ген *Ext2* дрозофилы кодирует необходимый для биосинтеза гепарансульфата фермент, который участвует в последовательном присоединении глюкуроновой кислоты и ацетилглюкозамина к формирующимся цепям гепарансульфата. К гепарансульфатам относятся компоненты плазматических мембран клеток, где они могут функционировать как рецепторы и участвовать в клеточной адгезии и межклеточных взаимодействиях. Они также выступают компонентами синаптических и других пузырьков. Биологическая активность гепарансульфатов обусловлена их способностью специфически взаимодействовать с макромолекулами внеклеточного матрикса, прежде всего, с фибронектином и ламинином, ферментами и обширным классом гепарин-связывающих молекул (факторы роста). *Ext2* проявляет материнский эффект, а также экспрессируется в зиготе. Большинство мутаций гена с заменами аминокислот летально. Показано, что *Ext2*, влияя на синтез гепарансульфатпротеогликанов, играет ключевую роль в распределении морфогенов hedgehog, wingless и Decapentaplegic (Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004; Takei et al., 2004).

В линии 6387a-s2 длительность побегов увеличена в 2.3 раза, а скорость побегов – на 8%. Частота импульсных посылок увеличена в 2.2 раза, длительность - на 59%. МИИ достоверно снижен, но всего на 2.5%. Таким образом, наблюдается возрастание моторной активности практически по всем параметрам. Влияние инсерции на моторный фенотип довольно трудно связать с

функциями гена *Ext2*, учитывая универсальность и вездесущность процессов гликозилирования. В случае с геном *CG10731*, мутация может приводить к нарушению регуляции трансмембранного протонного потенциала и, как следствие, аномалиям энергетического и окислительно-восстановительного баланса митохондрий и клетки, вызывая наблюдаемое повышение моторной активности.

Линия 4262c-s2

Инсерция произошла в точке 2R:16964321[+] в начале гена *Treh* на расстоянии 2798 п.н. от 5-конца гена. Аннотировано 7 транскриптов (FlyBase, flybase.org). Ортологом *Treh* у человека является ген *TREH* (Ensembl, ensembl.org).

Продуктом гена *Treh* является фермент трегалаза, который катализирует гидролиз трегалозы с образованием двух молекул глюкозы (Eanes et al., 2006). Трегалоza является дисахаридом, в составе которого у насекомых осуществляется транспорт глюкозы в гемолимфе к различным органам и тканям, а также ее запасание (Clegg, Evans, 1961). По наличию консервативных последовательностей в составе гена *Treh* трегалоza относится к группе гликозидных гидролаз (InterPro, ebi.ac.uk/interpro, accession number Q9W2M2). Гомолог данного гена в дрожжах имеет цитозольную и вакуольную изоформы, активность которых максимальна при pH 7.0 и pH 4.5 соответственно. Активность цитозольной изоформы положительно регулируется цАМФ-зависимым фосфорилированием, вакуольная изоформа имеет постоянную активность. В дрожжах тепловой шок повышает уровень трегалозы в несколько раз, так как последняя поддерживает структурную целостность клетки в условиях стресса. При возвращении клеток в нормальные условия трегалаза обеспечивает быстрое (в течение 40 мин) понижение уровня трегалозы в цитоплазме (см. обзор Nwaka, Holzer, 1998).

У дрозофилы гомозиготы по нуль-аллелю гена *Treh* являются летальными. В гетерозиготах с аллелью дикого типа показано снижение на 50% активности трегалазы, что сопровождается незначительным снижением частоты биения крыла дрозофилы при полете (Eanes et al., 2006). Трегалаза у дрозофилы обнаруживается в белках, выделенных из мембран клеток головы (Koles et al.,

2007). Известно также, что в линиях дрозофилы, содержащихся в течение нескольких десятков поколений при 22°C, уровень экспрессии *Treh* выше уровня экспрессии этого гена у линий, содержащихся при 13°C (Laayouni et al., 2007).

В линии 4262с-s2 индекс локомоторной активности увеличен на 71% как за счет учащения инициаций побегки (+37%), так и за счет возрастания длительности побегки (+42%). Аналогичная картина со звукопродукцией. Индекс импульсной песни увеличен в 5 раз как за счет учащения инициаций посылок в 2.6 раза, так и за счет возрастания длительности посылки в 2.1 раза. Скорость побегки и МИИ остаются без изменений, что указывает на косвенность и неспецифичность влияний мутации на работу моторных систем дрозофилы. Несущая частота импульса претерпевает незначительное снижение, что сходно с действием нуль-мутации в гетерозиготе на частоту биения крыла (Eanes et al., 2006) и указывает на вероятное подавление экспрессии *Treh* в линии 4262с-s2.

Линия 5282b

Инсерция произошла в точке 2R:6429208[+] в начале гена *lola* на расстоянии 1588 п.н. от 5-конца гена. Аннотировано 25 транскриптов (FlyBase, flybase.org). Ортологи *lola* обнаруживаются только в пределах таксонов насекомых (Ensembl, ensembl.org).

Ген *lola* кодирует 19 различных ТФ, содержащих ВТВ/POZ домен и один-два мотива цинковых пальцев (Ohsako et al., 2003). Показано, что *lola* подавляет транскрипцию генов в культуре клеток, в эмбрионах, имагинальных дисках (Cavarec et al., 1997; Ferres-Marco et al., 2006), взаимодействует с факторами ремоделирования хроматина, которые способствуют формированию гетерохроматина (Ferres-Marco et al., 2006).

В процессе развития *lola* необходим для роста аксонов и их направления в нервной системе эмбриона. Мутации в гене *lola* сопровождаются развитием дефектов аксональных проекций, которые оказываются летальными уже на стадии эмбриона (Giniger et al., 1994; Madden et al., 1999). Как сверхэкспрессия *lola*, так и прекращение его работы в обонятельных рецепторных нейронах приводит к нарушениям в иннервации антеннальных долей (Zhang et al., 2006).

Установлено, что *lola* регулирует экспрессию белков, определяющих направление роста аксонов, *Robo* и *Slit* (Crowner et al., 2002). *Slit* – это репеллент, направляющий рост аксонов от средней линии, *Robo* – рецептор *Slit*. *lola* также взаимодействует с геном *cut*, участвуя в развитии крыла, (Krupp et al., 2005), а также регулирует апоптоз в яичнике (Paige Bass et al., 2007). На мутантных клетках зародышевого пути продемонстрировано, что нокаут по гену *lola* приводит к блоку апоптоза при развитии яйца на поздних стадиях. Предположительно изоформа К специфично необходима для ядерной организации, хроматиновой конденсации, фрагментации ДНК при апоптозе. При этом экспрессия данной изоформы не связана с направлением роста аксонов на эмбриональной стадии. Также показано, что *lola* регулирует определение судьбы клеток омматидия в развивающемся глазе. *lola* противодействует экспрессии генов и дифференцировке клеток, активируемой Notch-сигналингом. В зависимости от интенсивности Notch-активации и ее способности преодолеть репрессию генов (со стороны *lola*) клетка дифференцируется в тот или иной тип клетки в составе омматидия (Zheng, Carthew, 2008).

В линии 5282b увеличена частота инициаций и длительность побегов на 32 и 60% соответственно. Скорость побегов не изменена. Частота инициаций посылок увеличена в 3 раза, длительность посылок импульсной песни возрастает почти в 2 раза. МИИ не меняется, а несущая частота уменьшается на 17%. Интересно, что данный фенотип полностью повторяет изменения моторной активности, наблюдаемые в линии 4262c-s2, что может быть связано со сходными физиологическими нарушениями. *lola* – ген, кодирующий множество изоформ, которые выполняют роль регуляторов развития во множестве тканей на всех этапах жизненного цикла мухи. Многообразие транскрипционных форм и их участие в большом количестве процессов затрудняет трактовку нарушений, связанных с мутантным фенотипом. Вероятно, как и в линии 4262c-s2 влияния мутации на ЦГМП носят косвенный характер, но при этом нарушения очевидно затрагивают нервные сети дрозофилы.

В заключение описания следует отметить следующее. Наличие для большинства выявленных генов-кандидатов гомологов у млекопитающих и человека предполагает возможность переноса в дальнейшем результатов исследования молекулярных механизмов работы ЦГМП на более сложноорганизованные нервные сети. Следует, однако, иметь в виду, что действие мутаций в той или иной степени распространяется на функционирование всех систем органов, и более определенно утверждать о вовлеченности гена в нервные механизмы генерации ритмической активности можно будет лишь по результатам изучения локальной экспрессии генов-кандидатов в нервной системе и ее отделах.

3.5 Локомоторная активность линий с локальным нокдауном генов-кандидатов

В целях установления вовлеченности отобранных генов-кандидатов в нервные механизмы реализации моторных функций проведено тестирование локомоторной активности линий дрозофилы со сниженной экспрессией генов-кандидатов в нервной системе дрозофилы. Параметры локомоции оценены у мух с нейроспецифичными нокдаунами 10 генов: *Sps2*, *CG15630*, *Dgp-1*, *CG6746*, *CG8708*, *CG34460*, *Mef2*, *lola*, *jing*, *drl*. Супрессия генов осуществлялась посредством инРНК, синтезируемой через систему трансгенов GAL4/UAS. Экспериментальных мух получали путем скрещивания линий VDRC или TRiP, несущих трансген, который кодирует ген-специфичную инРНК под контролем UAS, и линий, несущих нейроспецифичные GAL4-драйверы (*elav/nrv2/appl/tsh-GAL4*). В качестве контроля брали потомков от скрещивания соответствующей GAL4-линии и линии, которая использовалась для создания RNAi-линий и была лишена трансгена инРНК. 12 из 22 ранее отобранных генов-кандидатов не были включены в анализ по причине отсутствия в коллекциях VDRC и TRiP соответствующих трансгенных линий, либо отсутствия адекватного контроля для этих линий.

Нокдаун (RNAi) каждого из анализируемых генов приводит к достоверным изменениям в локомоторной активности по одному или нескольким параметрам (Рисунки 28, 29). В контрольных и экспериментальных линиях, полученных от скрещивания GAL4- и VDRC-линий, частота инициаций побегов имела существенно более низкие значения (в диапазоне 0.456-1.835) в сравнении с линией дикого типа (5.3 для CS). Вследствие этого данный параметр был исключен из дальнейшего анализа результатов по этим линиям. RNAi генов *Mef2* и *lola* под контролем *tsh-GAL4* приводит к летальному эффекту, а гена *jing* – к морфологическим дефектам тела мухи.

Влияние нокдауна на локомоторную активность животных сильно зависело от супрессируемого гена и используемого нейроспецифичного драйвера. В большей степени варьировали длительность и частота инициаций побежки. RNAi генов-кандидатов часто вызывала противоположные изменения в этих параметрах под управлением разных драйверов. В то же время под контролем некоторых драйверов RNAi не оказывала влияния на параметры побежки. Скорость побежки в экспериментальных линиях оказалась менее варибельным параметром. Для всех генов-кандидатов RNAi либо не вызывала изменений, либо приводила к снижению скорости побежки причем под управлением только какого-либо одного из четырех драйверов. Исключением является ген *CG6746*, нокдаун которого под управлением сразу трех драйверов сопровождается снижением скорости побежки как и у мутанта по этому гену. Следует отметить, что большинство P-инсерционных мутантов также демонстрируют снижение скорости побежки (относительно CS, Рисунки 20, 25).

В целом можно заключить, что все отобранные ранее гены-кандидаты вовлечены в нервные процессы ответственные за локомоцию. Однако реализация генами-кандидатами их функций обеспечивается уникальным в каждом случае пространственно-временным паттерном генной экспрессии в различных нейронах, что может объяснять, почему действие нокдауна сильно зависит от GAL4-драйвера, определяющего локализацию, стадию и интенсивность супрессии гена.

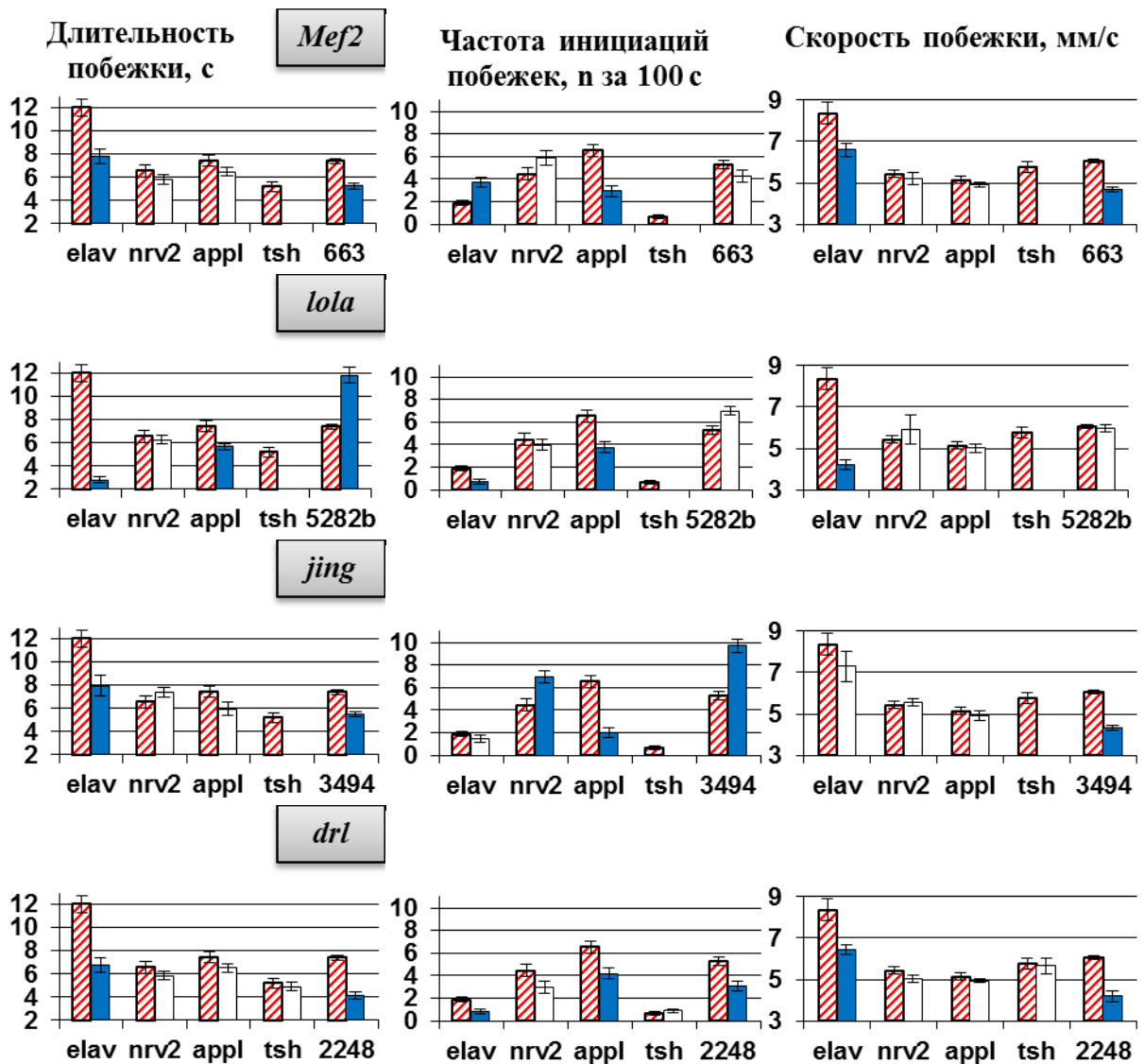


Рисунок 28. Параметры локомоторной активности линий с локальным нокдауном генов-кандидатов. Представлены данные по мухам, полученных от скрещивания драйверных линий *elav/appl/nrv2/tsh-GAL4* с интерферирующими **TRiP**-линиями. Показаны средние значения и стандартные ошибки. Контрольные значения отмечены штриховкой. Два последних столбика на каждом графике соответствуют значениям CS и мутантной линии, у которой затронут соответствующий ген. Достоверные отличия от контроля представлены синими столбиками (двусторонний тест рандомизации, $P < 0.05$). Отсутствующие значения на графиках соответствуют летальному эффекту нокдауна, либо мухам с морфологическими дефектами.

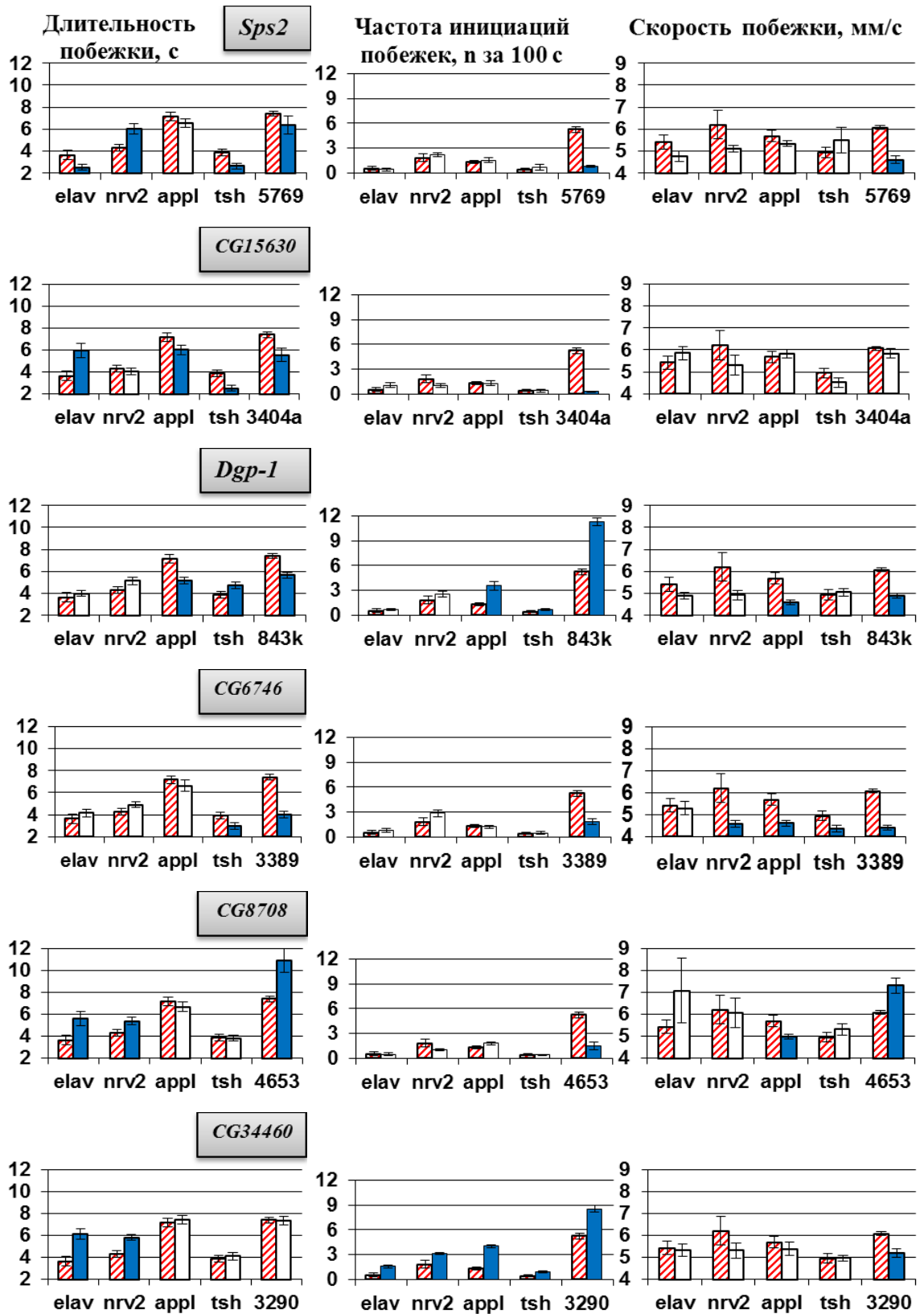


Рисунок 29. Параметры локомоторной активности линий с локальным нокаутом генов-кандидатов. Представлены данные по мухам, полученных от скрещивания драйверных линий *elav/appl/nrv2/tsh-GAL4* с интерферирующими **VDRC**-линиями. См. подпись к рисунку 28.

Характер локомоторных отклонений у мух с нейроспецифичным нокдауном наряду с функциональной характеристикой генов, затронутых мутацией, позволил определить гены, которые с наибольшей вероятностью вовлечены в работу ЦГМП. В качестве основной мишени для дальнейших исследований был взят ген *CG15630*, в качестве дополнительных перспективных вариантов были выбраны гены *Sps2* и *Mef2*.

3.6 Анализ работы систем GAL4/UAS, обеспечивающих нейроспецифичный нокдаун

Наличие противоположных отклонений в параметрах локомоторной активности при нокдауне ряда генов-кандидатов могут быть связаны с неэффективной супрессией генов под управлением отдельных драйверов, либо отсутствием нейроспецифичности драйвера в используемых линиях.

Чтобы подтвердить супрессию генов-кандидатов в тестируемых линиях мух с нейроспецифичным нокдауном была выполнена количественная оценка уровня экспрессии генов *CG15630*, *Sps2* и *Mef2* у взрослых мух. Дополнительно, уровень экспрессии тех же генов был оценен у соответствующих Р-инсерционных мутантов. RNAi под контролем всех используемых драйверов приводила к снижению уровня экспрессии каждого из трех проанализированных гена (Рисунок 30). Однако величина супрессии существенно варьировала в различных комбинациях «драйвер - целевой ген». Различия в степени супрессии, вероятнее всего, связаны с тем, насколько совпадают пространственные паттерны экспрессии генов-кандидатов и генов, управляющих локальной РНК-интерференцией. Так, RNAi гена *CG15630* под управлением драйвера *elav-GAL4* приводит к гораздо более выраженной супрессии в сравнении с двумя другими генами. Действительно, в соответствии с данными Чинтапали с соавт. (Chintapalli et al., 2007), размещенными на электронном ресурсе FlyAtlas (flyatlas.org), паттерн экспрессии гена *CG15630* в различных имагинальных тканях в большей степени сходен с паттерном гена *elav*, нежели с паттерном гена *Sps2* (Рисунок 31).

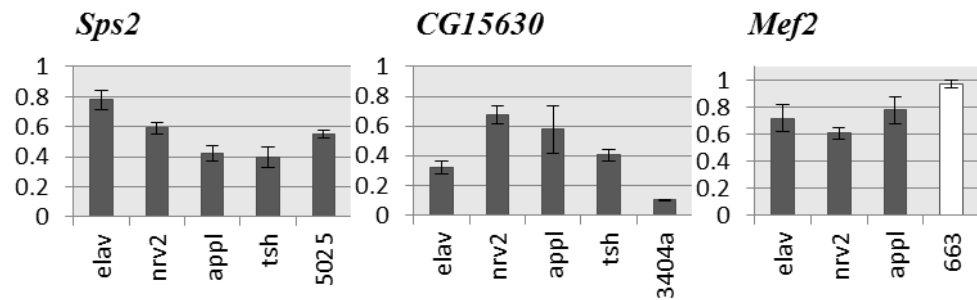


Рисунок 30. Относительный уровень экспрессии генов *CG15630*, *Sps2* и *Mef2*. Представлены средние значения и стандартные ошибки по мухам с нокдауном и с Р-инсерцией, затрагивающей соответствующий ген. Достоверные относительно контроля (равного 1) отличия представлены залитыми столбиками (двусторонний тест рандомизации, $P < 0.05$, программа REST 2009).

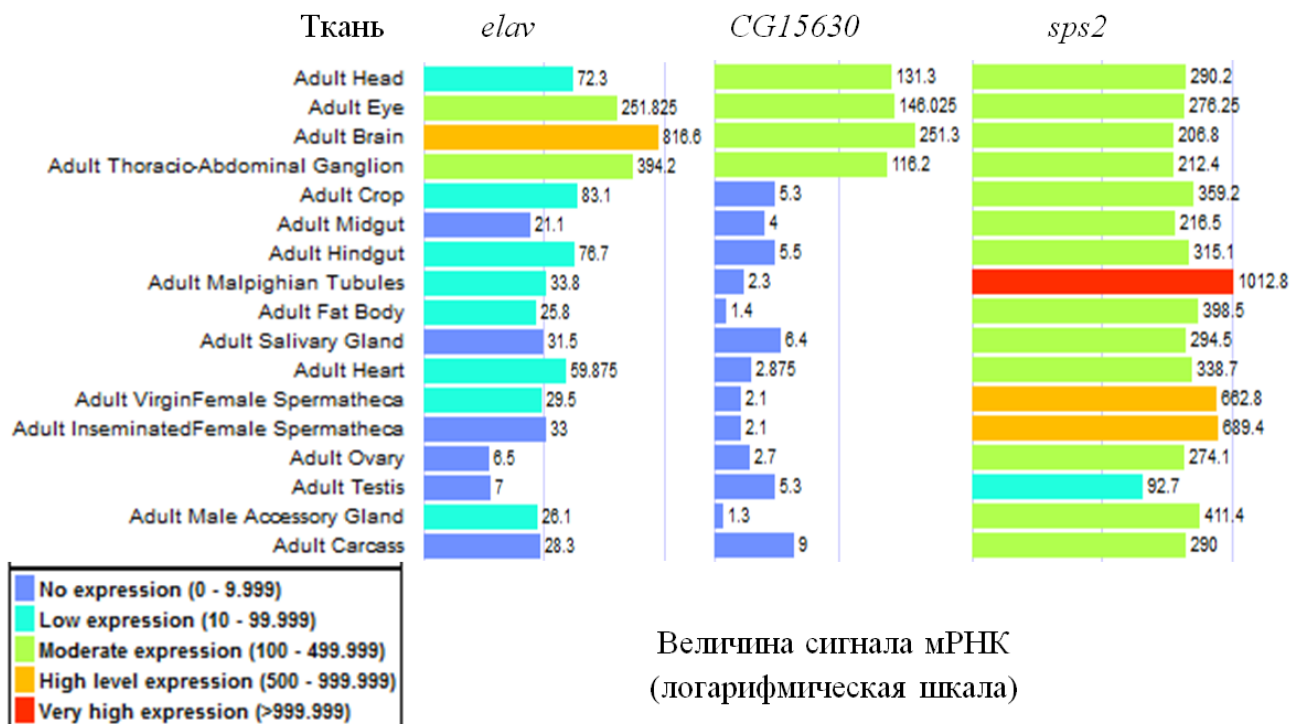


Рисунок 31. Относительный уровень экспрессии генов *elav*, *CG15630* и *Sps2* в различных тканях дрозофилы. Копии изображений, размещенных на электронном ресурсе FlyBase (flybase.org).

Кроме количественной оценки экспрессии генов-кандидатов также была проанализирована флуоресценция белка GFP, синтезируемого под контролем драйверов *elav/appl/nrv2/tsh-GAL4* в эмбрионах на стадии 13-16, с целью

подтверждения нейроспецифичности паттерна экспрессии. Все драйверы демонстрировали паттерны экспрессии, которые соответствовали ранее описанным в литературе (Luo et al., 1990; Fasano et al., 1991; Luo et al., 1994; Sun et al., 1999). Для *elav*- и *appl-GAL4* GFP-флуоресценция обнаруживалась в мозге и вентральном ганглии, в то время как для *tsh-GAL4* в основном только в вентральном ганглии (Рисунок 32, данные для *nrv2-GAL4* не показаны).

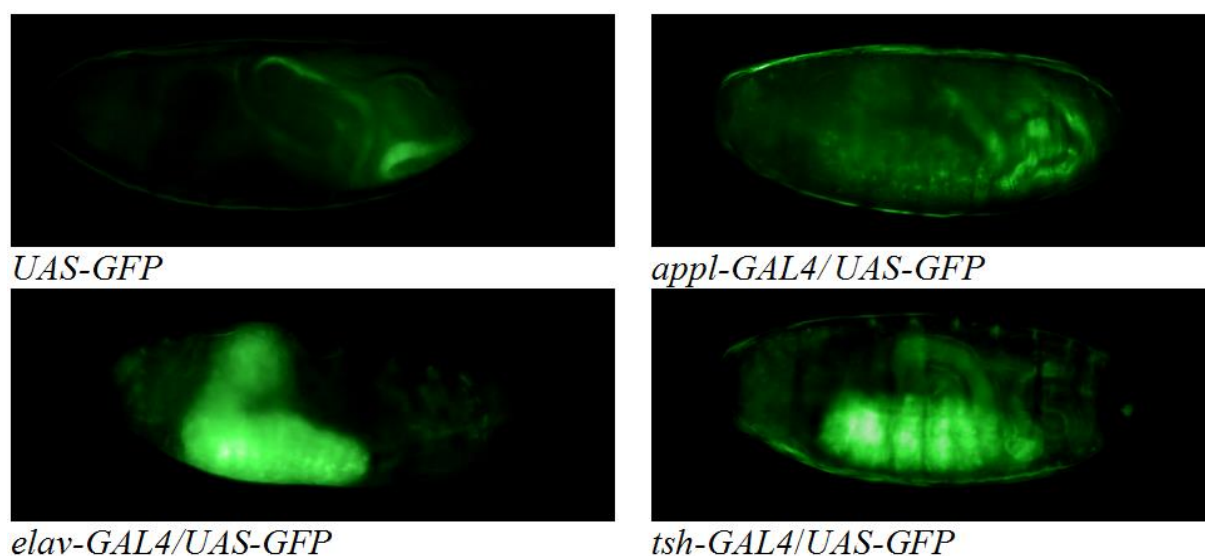


Рисунок 32. Флуоресценция GFP в нервной системе эмбрионов дрозофилы на последних стадиях развития 13-16 перед вылуплением личинки. Передняя часть эмбрионов направлена влево, брюшная часть вниз. В качестве контроля взята родительская линия *UAS-GFP* без драйвера. Структуры, демонстрирующие GFP-флуоресценцию, частично размыты сильной автофлуоресценцией кишечника. Снимки сделаны с 20-кратным увеличением.

3.7 Песенная активность линий с локальным нокдауном генов-кандидатов

Для генов-кандидатов *CG15630*, *Sps2*, *Mef2*, *CG6746* и *CG34460* выполнена оценка влияния нокдауна на параметры импульсной песни самца. Как и в случае с локомоцией, отклонения в параметрах песни ухаживания варьируют в различных комбинациях «драйвер – целевой ген» (Рисунок 33). Длительность посылки

импульсной песни и МИИ также могут демонстрировать противоположные изменения под контролем разных GAL4-драйверов. Особое внимание обращалось

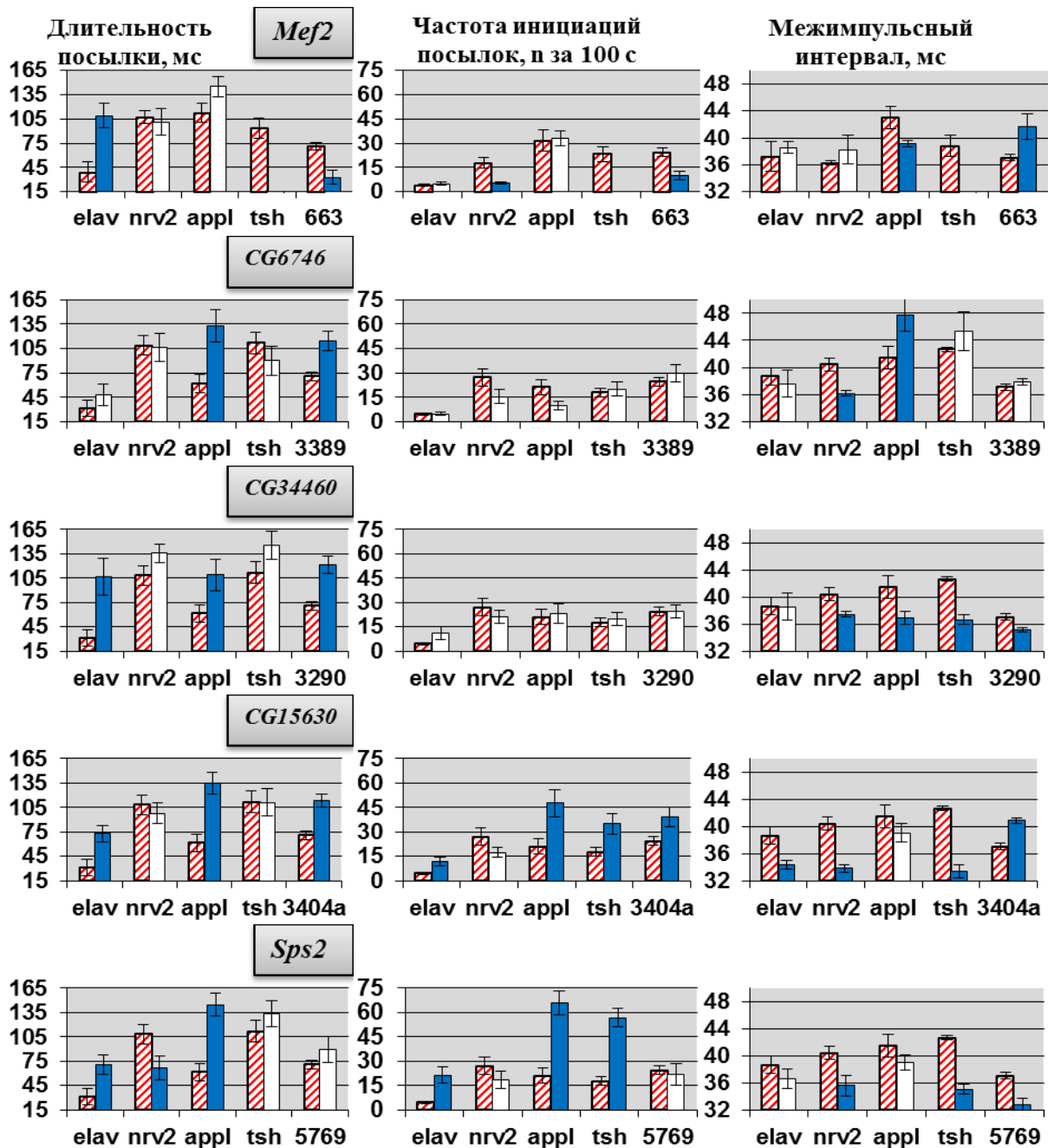


Рисунок 33. Параметры песенной активности линий с локальным нокдауном генов-кандидатов. Представлены данные по мухам, полученных от скрещивания драйверных линий *elav/appl/nrv2/tsh-GAL4* с интерферирующими VDRC/TRiP-линиями. См. подпись к рисунку 28. Отсутствующие значения на графиках соответствуют летальному эффекту нокдауна, либо мухам с морфологическими дефектами.

на МИИ, параметр, в котором напрямую отображается функционирование песенного ЦГМП (моторный паттерн вибраций крыла). Нокдаун всех протестированных генов-кандидатов приводит к отклонениям значений МИИ от нормы по одному или нескольким используемым драйверам. Самые выраженные изменения наблюдаются у мух с RNAi генов *Sps2* и *CG15630*. Супрессия обоих генов вызывает уменьшение МИИ. Следует отметить, что у Р-инсерционного мутанта по гену *CG15630*, наоборот, наблюдается увеличение МИИ, хотя уровень экспрессии этого гена у мутанта снижен еще в большей степени, нежели при нокдауне (Рисунок 30). Это несоответствие может быть объяснено эффектами экстранервной мисэкспрессии *CG15630* в мышцах и нотуме мутантов (см. выше описание линии 3404a). В линиях с нейроспецифичным нокдауном *CG15630* экспрессия данного гена в мышечной и покровной тканях мух не подавляется, вследствие чего становится возможным проявление эффектов супрессии *CG15630* в нервной системе мух. В то же время нельзя исключать у мутантов по *CG15630* специфических дефектов и в нервной системе, так как мутация в отличие от нокдауна затрагивает все клетки организма на всех стадиях развития. Выраженные отклонения МИИ при нокдауне *CG15630* и *Sps2* определили концентрирование последующих экспериментов именно на этих двух генах.

3.8 Локомоторная и песенная активность мух при локальном нокдауне генов *Sps2* и *CG15630* в глиальных клетках

Для каждого гена-кандидата эффект RNAi на моторную активность сильно зависит от используемого нейроспецифичного драйвера (например, отклонения длительности побежки и посылки импульсной песни в случае нокдауна по гену *Sps2*, Рисунки 29, 33). Кроме того, эффект нокдауна может кардинально отличаться от действия мутации на соответствующий ген, даже если этот ген экспрессируется преимущественно в нервной системе (например, МИИ у мутантов и при нокдауне по гену *CG15630*, Рисунок 33). Вариабельность эффектов может быть связана с особенностями пространственно-временных

паттернов используемых драйверов. В частности, показано, что гены *elav* и *nrv2* экспрессируются как в нейронах, так и в глиальных клетках (Sun et al., 2001; Berger et al., 2007). В то же время драйвер *appl-GAL4* используется для селективной экспрессии в нейрональных структурах, но не в глиальных клетках (Fang et al., 2013). Чтобы изучить действие избирательной супрессии генов-кандидатов в глиальных клетках на моторную активность, было выполнено тестирование мух с локальной RNAi под контролем драйвера *repo-GAL4*.

Глиальная специфичность экспрессии под контролем *repo-GAL4* была подтверждена паттерном экспрессией трансгена *UAS-GFP* в эмбрионе на стадиях 13-16 (Рисунок 34). Паттерн экспрессии драйвера *repo-GAL4* соответствовал ранее описанному в литературе (Reifegerste et al., 1999).



Рисунок 34. Флуоресценция GFP в эмбрионе дрозофилы *repo-GAL4/UAS-GFP* на стадиях развития 13-16 перед вылуплением личинки. См. подпись к рисунку 32.

Установлено, что нокдаун генов *Sps2* и *CG15630* в глиальных клетках не приводит к достоверным отклонениям параметров локомоторной и песенной активности, за исключением подавления частоты побежки при супрессии гена *CG15630* (5.812 в контроле, стандартная ошибка ± 0.521 , 3.988 в опыте, стандартная ошибка ± 0.602). Так как частота побежки не анализировалась при нейроспецифичном нокдауне *CG15630*, то мы не можем оценить влияние супрессии данного гена в глиальных клетках на характер отклонений при использовании нейроспецифичных драйверов. Отсутствие изменений во всех остальных параметрах позволяет заключить, что противоположные изменения в моторной активности при нокдауне генов *Sps2* и *CG15630* под контролем разных

нейроспецифичных драйверов не являются следствием различий в эффективности RNAi в глиальных клетках.

3.9 Локомоторная и песенная активность мух при индуцированном нокдауне гена *CG15630* на стадии имаго

RNAi гена *CG15630* в нервной системе дрозофилы сопровождается значительными отклонениями в параметрах локомоторной (Рисунок 29) и песенной активности (Рисунок 33), из которых наиболее выраженными являются изменения МИИ. Описанный моторный фенотип может быть следствием дефектов развития и/или нарушений на стадии имаго. Чтобы выяснить вовлечен ли ген *CG15630* непосредственно в функционирование моторных систем и, возможно, в работу ЦГМП, было проведено исследование моторной активности мух с индуцированным нокдауном гена *CG15630* на стадии имаго. Избирательная RNAi у взрослых мух достигалась путем использования нейроспецифичного драйвера GAL4 (*GAL4.ER*), активация которым UAS-трансгена осуществляется лишь в присутствии гормона эстрогена.

Индукцированный нокдаун *CG15630* у взрослых мух приводит к отклонениям как локомоторных, так и песенных параметров в виде увеличения длительности и уменьшения частоты инициаций побегки, а также снижения МИИ (Рисунок 35). Здесь следует отметить, что значения МИИ в эксперименте с индуцированным нокдауном как в контроле (43 мс), так и при супрессии *CG15630* существенно выше (39мс), нежели у мух дикого типа (37 мс), что связано с собственными эффектами эстрогена на физиологию мух. Интересно, что эстроген не приводил к изменениям параметров локомоции, а также длительности и частоты ИП, но его добавление в питательную среду вызывало увеличение МИИ у контрольных мух с 40 мс до 43 мс.

Сходные с влиянием супрессии *CG15630* на стадии имаго эффекты наблюдались при RNAi под контролем некоторых нейроспецифичных драйверов с конститутивной экспрессией (Рисунки 29, 33). Следует отметить, что как

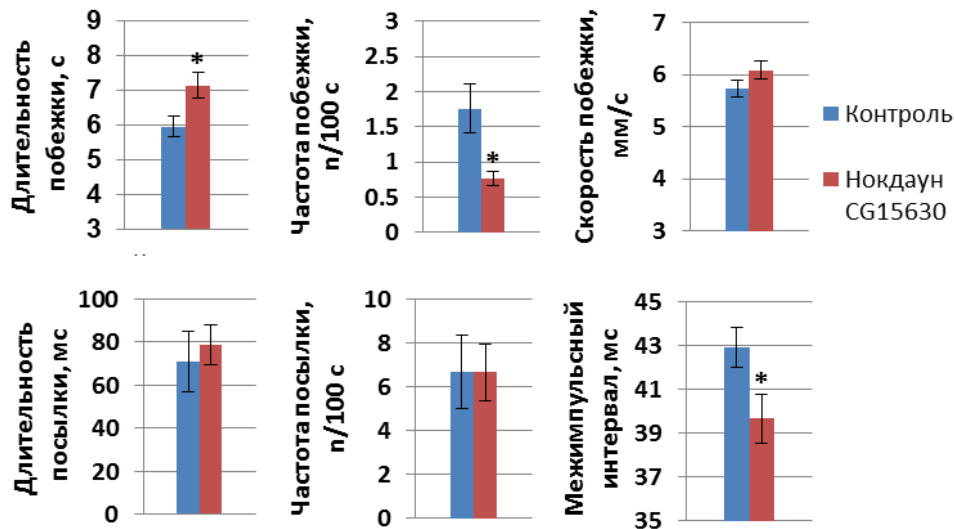


Рисунок 35. Моторная активность мух при индуцированном нокдауне гена *CG15630* на стадии имаго. Показаны средние значения и стандартные ошибки. Достоверные отличия между опытными и контрольными мухами отмечены звездочкой (двусторонний тест рандомизации, $P < 0.05$).

индуцированная, так и конститутивная RNAi гена *CG15630* не влияет на скорость побежки. Так как *CG15630* является нейроспецифичным геном (Chintapalli et al., 2007, FlyAtlas, flyatlas.org) и экспрессия *GAL4.ER* также обнаруживается в ЦНС (Han et al, 2000), можно сделать вывод, что экспрессия *CG15630* на стадии имаго необходима для реализации нейронных (не глиальных) функций, определяющих частоту и длительность работы локомоторного ЦГМП, и функций, ответственных за характеристики паттерна импульсной песни.

Учитывая, что при нокдауне *CG15630* под управлением драйвера *tsh-GAL4*, который экспрессируется преимущественно в торако-абдоминальной ганглии (Fasano et al., 1991; Chintapalli et al., 2007, FlyAtlas, flyatlas.org; Рисунок 32), также наблюдается сокращение МИИ и что именно в торако-абдоминальной ганглии располагаются песенный ЦГМП (Clyne, Miesenbock, 2008), можно довольно уверенно утверждать, что индуцированная RNAi гена *CG15630* влияет на песенный моторный паттерн путем прямого участия продукта гена в молекулярных механизмах функционирования песенного ЦГМП.

Индукцированный нокдаун *CG15630* не приводит к изменениям длительности и частоты инициаций посылок импульсной песни (Рисунок 35), как наблюдается при некоторых конститутивных нейроспецифичных нокдаунах (Рисунок 33). Одним из объяснений этого отличия могут быть дополнительные нарушения, которые возникают при нокдауне *CG15630* на стадиях развития, предшествующих имаго, и которые затрагивают регуляторные сети, влияющие на работу песенного ЦГМП, но не нарушающие генерацию самого паттерна.

Супрессия *CG15630* у мух при индуцированном нокдауне данного гена подтверждена количественной оценкой уровня экспрессии у взрослых мух. Уровень экспрессии *CG15630* относительно контрольных мух, которых также содержали на среде с эстрогеном, составлял 0.649 (стандартная ошибка ± 0.044).

3.10 Локомоторная активность самок дрозофилы при нейроспецифичном нокдауне гена *CG15630*

Ранее, на коллекции мутантных линий в данной работе было показано, что изменения скорости побегов и МИИ коррелируют с параметрами локомоторной и песенной активности, соответственно, но не зависят от параметров другой формы активности. На основании этих данных был сделан вывод, что отклонения в скорости побегов и МИИ связаны, прежде всего, со специфичными нарушениями, влияющими на работу соответствующих моторных систем. В то же время отклонения в параметрах длительности и частоты инициаций отражают неспецифичные нарушения, оказывающие влияние на моторный паттерн обеих форм активности. Анализ локомоторной и песенной активности самцов дрозофилы при локальном нокдауне *CG15630* под управлением нейроспецифичных драйверов показал, что фиксируемые отклонения не затрагивают скорость побегов, но в большинстве случаев обнаруживаются в величине МИИ. Эти результаты позволили сделать вывод о наличии специфических нарушений в нейронных сетях, обслуживающих песенную активность дрозофилы, и неспецифических, влияющих на длительность побегов

и посылок импульсной песни. При этом как неспецифические нарушения, так и специфические, могут быть связаны с полом животного и возникать только у самцов, либо их природа может не зависеть от пола. Чтобы отчасти прояснить этот вопрос, проведено тестирование локомоторной активности самок дрозофилы при локальном нокдауне *CG15630* под управлением нейроспецифичных драйверов *elav/appl/nrv2/tsh2-GAL4*. Анализ результатов тестирования показал отсутствие достоверных изменений в параметрах длительности и скорости побегов. Таким образом, выявленные у самцов при нокдауне гена *CG15630* отклонения в длительности побегов связаны с половыми особенностями в развитии и/или функционировании нервных сетей, обслуживающих локомоторную активность.

3.11 Морфологический анализ ЦНС дрозофилы при нокдауне гена *CG15630* под контролем драйвера *nrv2-GAL4*

Действие нокдауна гена *CG15630* на песенную активность под контролем *nrv2-GAL4* аналогично действию индуцируемого нокдауна на стадии имаго и заключается в снижении МИИ на фоне сохранения в норме частоты и длительности посылки ИП. В случае индуцированного нокдауна отклонения в паттерне ИП связаны либо с ненадлежащим функционированием анатомически целостных нервных сетей, обслуживающих песенную активность, либо с возможными процессами нейродегенерации, запускаемыми супрессией *CG15630* на стадии имаго. Конститутивный нокдаун под управлением *nrv2-GAL4* может влиять на песенный паттерн по тем же механизмам, что и индуцированная супрессия, либо иметь собственные эффекты как на развитие нервной системы, так и на ее функционирование. Так как драйверная линия BL#6794 (с *nrv2-GAL4*) содержит трансген *UAS-GFP*, то можно оценить возможные дефекты развития структур, в которых одновременно запускается RNAi гена *CG15630* и синтезируется флуоресцентный белок GFP.

Визуальный анализ паттерна флуоресценции дорсальных нервных структур в 6 образцах ЦНС при нокдауне гена *CG15630* не выявил грубых нарушений в мозге, однако показал наличие дефектов в торако-абдоминальном ганглии. Организация нервных структур ганглия, которые будут анализироваться ниже, описана на рисунке 36.

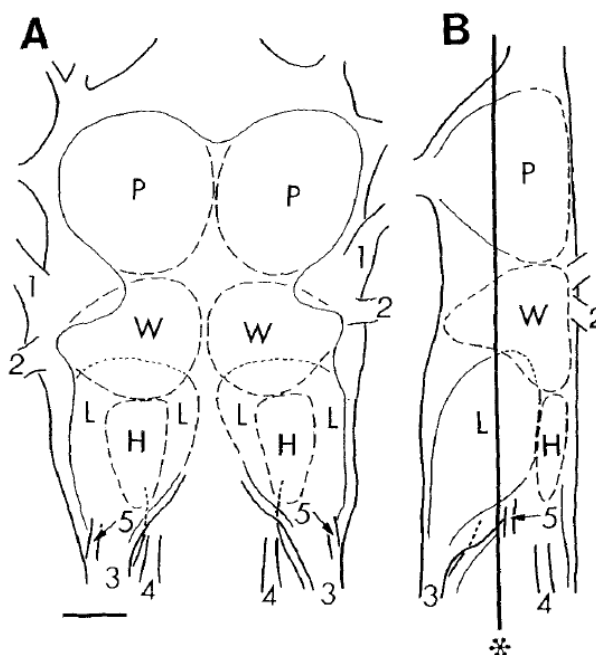


Рисунок 36. Нейропильные области и нервы торако-абдоминального ганглия (слившиеся ганглии брюшной нервной цепочки). А – вид с дорсальной стороны, передняя часть направлена вверх. В – вид сбоку, передняя часть направлена вверх, дорсальная направлена вправо. Н – корень жужжальцевого нерва (жужжальцевая хиазма); L – нейропиль, связанный со второй парой ног (мезоторакальный); Р – проторакальный нейромер; W – нейропиль, связанный с крыльями; 1 – передний дорсальный мезоторакальный нерв; 2 – задний дорсальный мезоторакальный нерв; 3 – мезоторакальный ножной нерв; 4 – жужжальцевый нерв; 5 – мезоторакальный добавочный нерв. Масштабная полоска = 30 мкм. Контуры нейропильных областей на рисунке А соответствуют уровню, обозначенному чертой со звездочкой на рисунке В. Третий торакальный нейромер и абдоминальный ганглий не изображены (Trimarchi, Schneiderman, 1994).

В двух из шести образцов было обнаружено разрушение жужжальцевого сплетения или иначе жужжальцевой хиазмы (рисунок 37), еще в двух образцах структура данной нервной сети была частично фрагментирована (Рисунок 38, образцы 3 и 4), а в оставшихся двух образцах была близка к норме (Рисунок 38, образцы 5 и 6). Подобная градуальность в степени анатомических отклонений в ЦНС при конкретной мутации отдельного гена отмечалась и в других исследованиях, как, например, в исследовании структурных нарушений грибовидных тел у мутантов по гену *dfmr1* (Michel et al., 2004).

Анализ изображений жужжальцевого сплетения на семи образцах при 20-кратном увеличении позволил установить, что в норме клеточные тела относительно упорядочены и их положение может быть описано определенными кривыми (Рисунок 39). Эти кривые в какой-то степени совпадают с расположением жужжальцевого нерва, идущего через хиазму к крыловому нейропилю (Trimarchi, Murphey, 1997). Подобное положение клеточных тел может объясняться тем, что данные флуоресцентные элементы относятся к глиальным клеткам, которые прилегают к нервам. Это предположение соответствует существующим сведениям о выраженной экспрессии *nrv2-GAL4* в глиальных клетках (Sun et al., 2001; Hartenstein, 2011). В то же время вариативность в количестве и локализации нервных клеток в определенных рамках является характерным свойством в организации ЦНС дрозофилы (Sun, Wyman, 1997; Sykes et al., 2004), что объясняет разнообразие флуоресцентных паттернов в норме. Несмотря на вариативность паттерна всегда можно выделить пару клеточных тел, находящихся в центре хиазмы (Рисунок 39). При нокдауне гена *CG15630* локализация клеточных тел теряет упорядоченность в их взаимном расположении, в результате чего во многих случаях паттерн флуоресценции не может быть описан кривыми, повторяющими ход жужжальцевого нерва (Рисунок 40). При 20-кратном увеличении во всех семи образцах с нокдауном показано сохранение целостности жужжальцевого сплетения в той или иной степени, а также постоянство его положения относительно маркерной кривой, которая соединяет два крупных клеточных тела в основании заднего дорсального

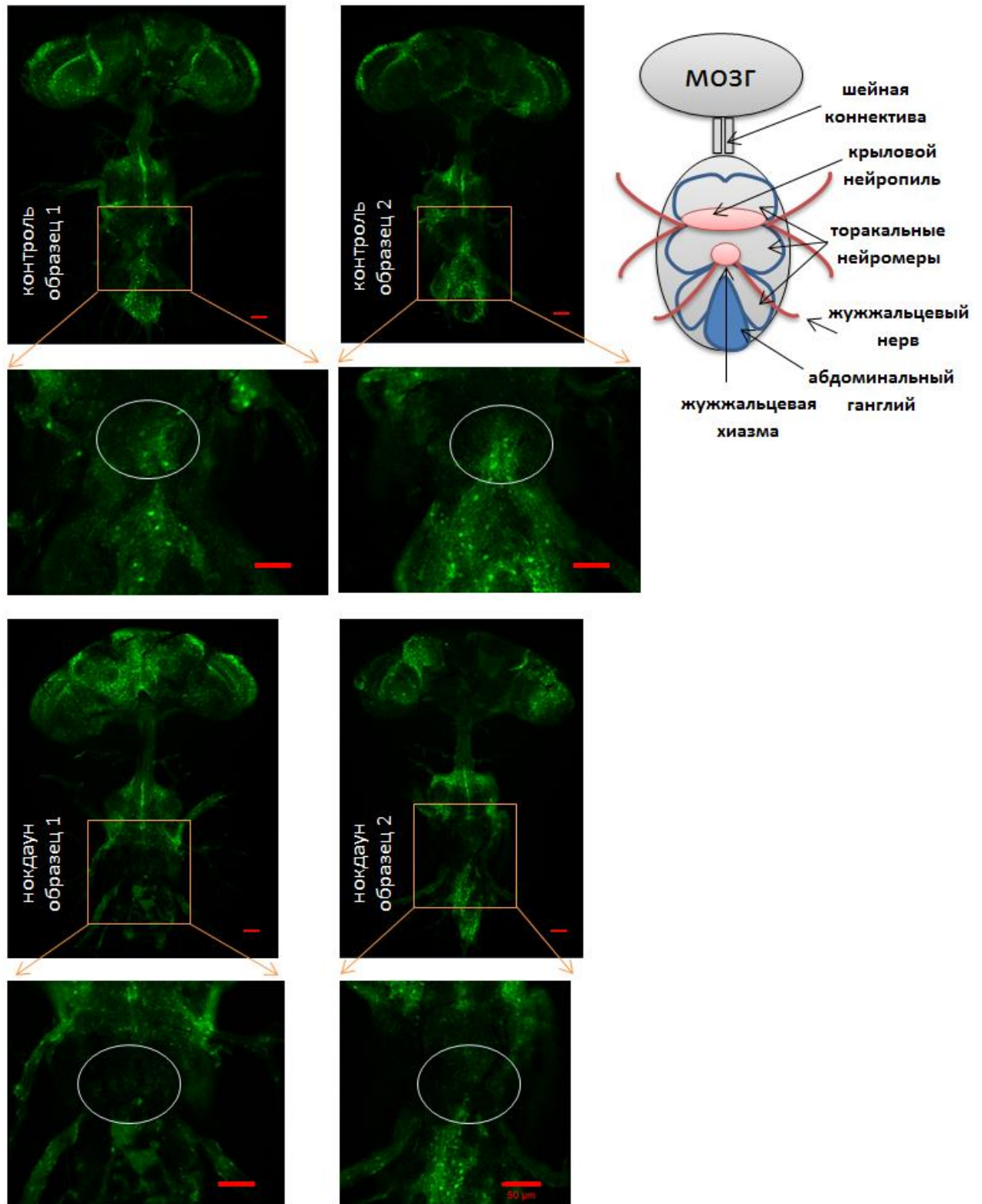


Рисунок 37. Паттерн флуоресценции в ЦНС двух контрольных образцов и двух образцов при нокдауне гена *CG15630* под управлением *nrv2-GAL4*. Даны изображения ЦНС целиком и области жужжальцевого сплетения в цифровом увеличении (5-кратное оптическое увеличение). Справа представлена общая схема строения ЦНС дрозофилы. Масштабная полоска равна 50 мкм.

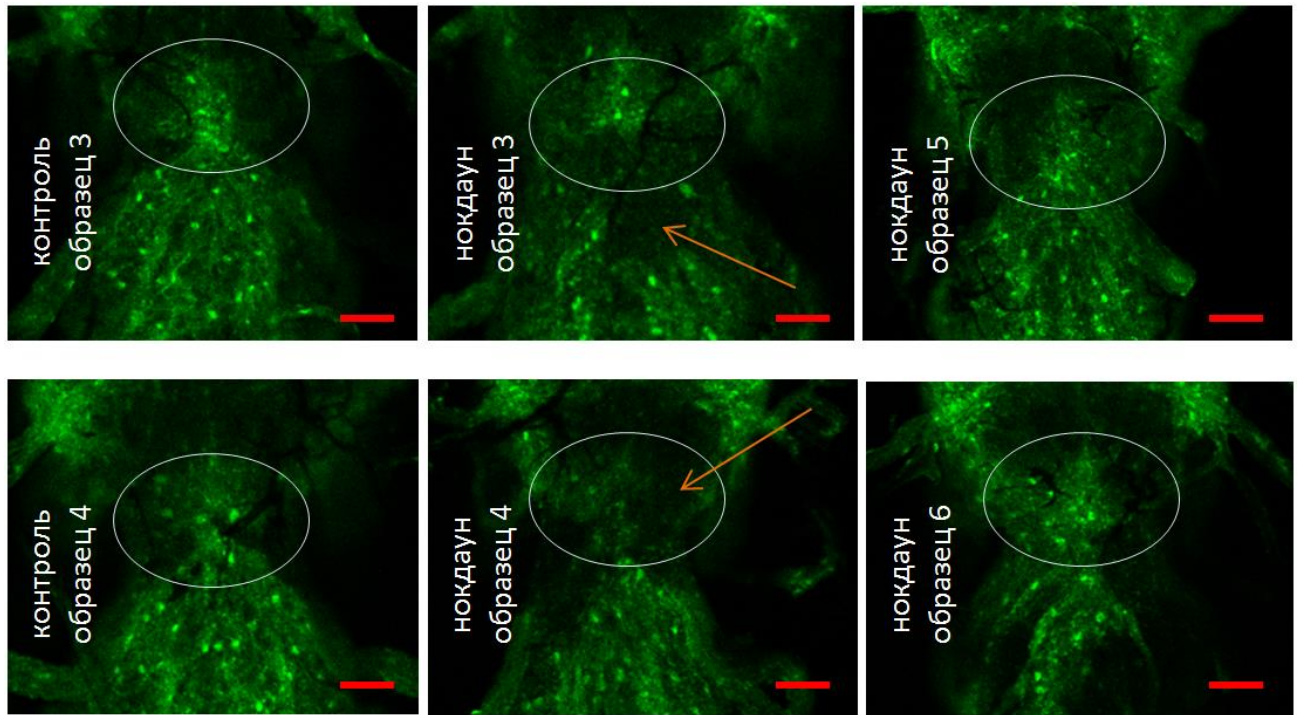


Рисунок 38. Изображения области жужжальцевого сплетения в цифровом увеличении (5-кратное оптическое увеличение). Хиазма очерчена контуром овала. Стрелками указаны фрагментированные участки хиазмы. Масштабная полоска равна 50 мкм.

мезоторакального нерва (Рисунок 40). Т.е. нокдаун приводит к внутренней дезорганизации жужжальцевого нервного сплетения в разной степени выраженности, однако положение и общие контуры этого органа в большинстве случаев не нарушаются.

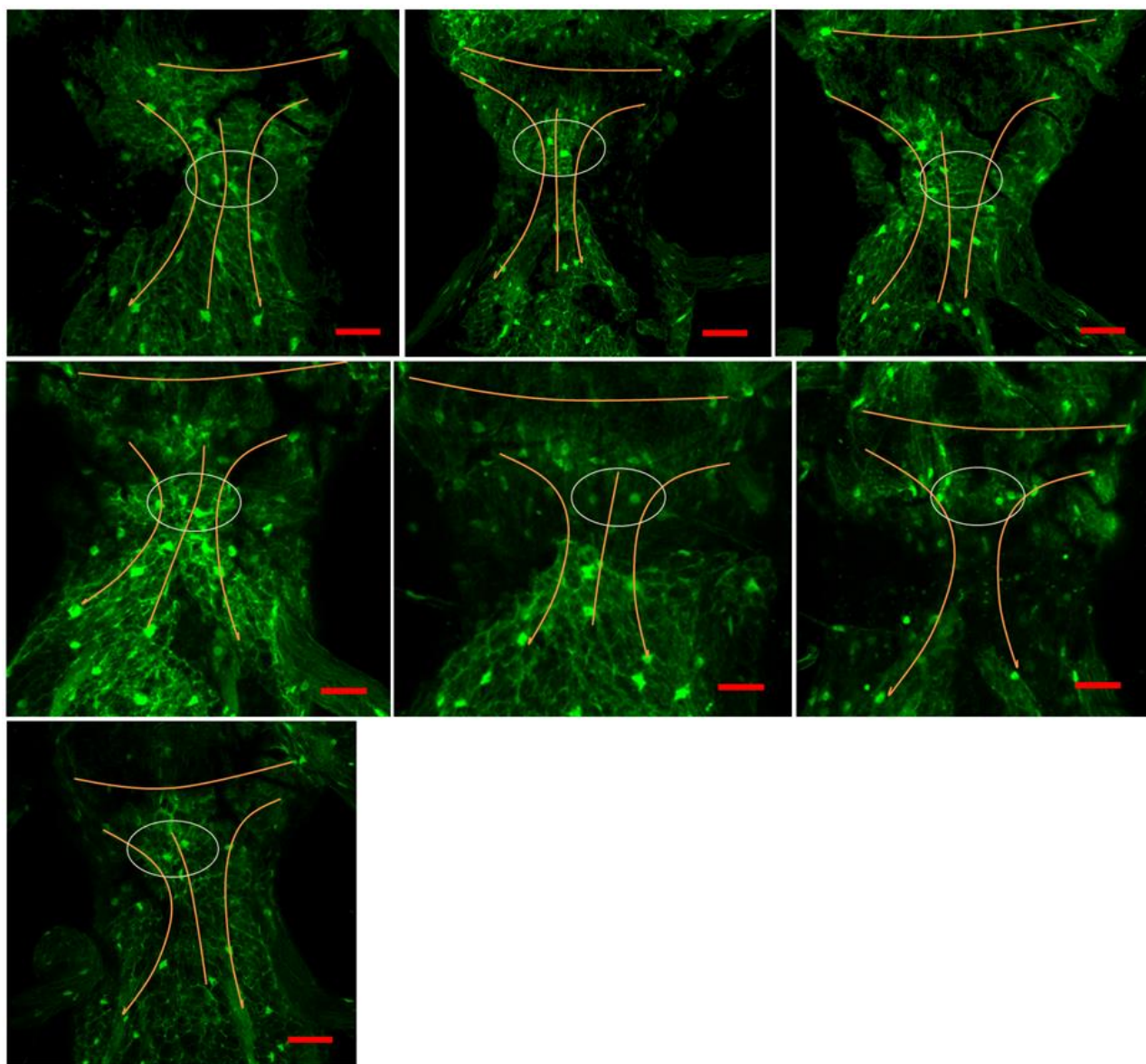


Рисунок 39. Изображения области жужжальцевого сплетения в 7 контрольных образцах при 20-кратном увеличении (трехмерная реконструкция из 25-35 срезов). Кривыми обозначено положение определенных клеточных тел на каждом образце. Овальным контуром выделены два клеточных тела в центре хиазмы. Масштабная полоска равна 50 мкм.

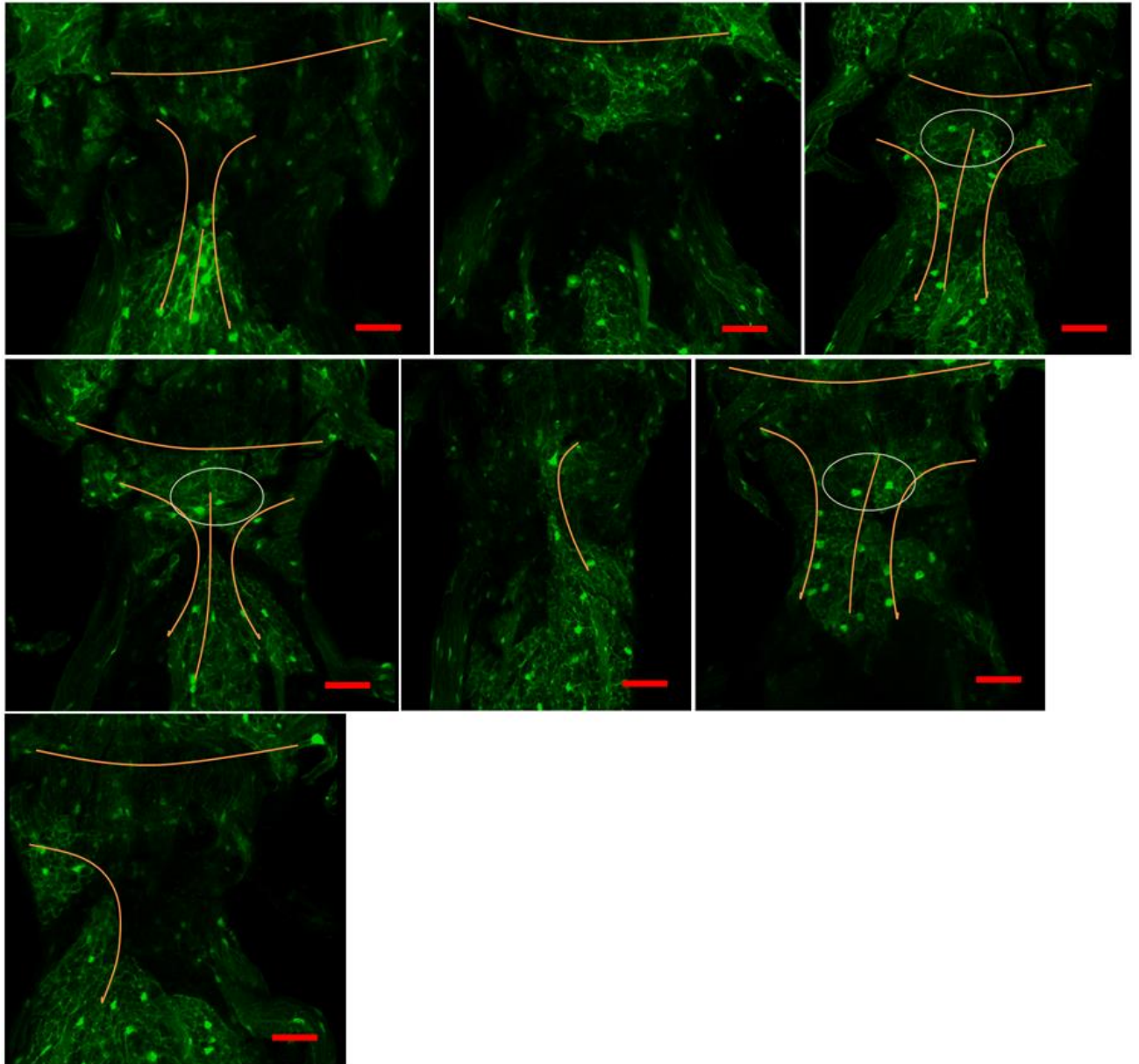


Рисунок 40. Изображения области жужжальцевого сплетения в 7 образцах, извлеченных из мух с супрессией гена *CG15630*. См. подпись к Рисунку 39.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Первые волна данных о моторной активности дрозофилы возникла в 60-70-е годы прошлого столетия (Bennet-Clark, Ewing, 1968; Gotz, Wenking, 1973; Levine, 1973). По мере расширения арсенала генетических методов и технических возможностей исследователей таких данных становилось все больше, и к настоящему моменту собрано большое количество сведений о биофизике и физиологии различных форм движений у дрозофилы. Во многих современных работах анализ моторных функций используется с целью выявления генов, участвующих в физиологических процессах, и установления их роли на молекулярно-клеточном уровне (Banerjee et al., 2004; Fox et al., 2006; Poesck et al., 2008; Ping et al., 2010). В то же время часто применяется и подход обратной генетики, когда определение молекулярных механизмов моторной деятельности начинается с тестирования генетически модифицированных организмов (Moran, Kyriacou, 2009). И тот, и другой подход были применены в настоящей работе с целью создания отправных точек в исследовании нейрональных механизмов генерации моторного паттерна ритмических движений.

Первоначально по результатам тестирования свыше 1000 линий P-инсерционных мутантов была отобрана группа из 82 линий, демонстрирующих воспроизводимые отклонения в параметрах локомоторной активности от значений параметров у линии мух дикого типа (CS). Выявленные отклонения в длительности, частоте инициаций и скорости побегов отражают аномальное функционирование моторных систем у мутантов, одной из причин которых могут быть изменения в работе локомоторного генератора. Тестирование песенной активности мутантных мух позволило определить линии, у которых изменены не только общие характеристики моторной деятельности (длительность и частота инициаций посылок), но и структурные показатели непосредственно моторного паттерна вибрирующего крыла (МИИ, несущая частота). Описательный и статистический анализ характера отклонений моторных параметров в группе отобранных мутантов позволил выявить ряд закономерностей.

В большинстве мутантных линий наблюдается изменение скорости побежки в сторону уменьшения значений. Снижение скорости побежки может быть следствием анатомических дефектов центрального комплекса мозга, когда уменьшается длина шага (Strauss, Heisenberg, 1993), либо происходит в связи с нарушениями в работе сенсорных органов, при которых увеличивается длительность фаз опоры и переноса ног (Mendes et al., 2013). В обоих случаях сохраняется типичный паттерн трехногой походки, генератор которого располагается в торакальных ганглиях (Strauss, Heisenberg, 1993; Yellman et al., 1997). Однако, известно, что в норме при снижении скорости побежки мухи начинают чаще использовать четырехногие и неканонические комбинации (Mendes et al., 2013). Можно предположить, что в отдельных мутантных линиях снижение скорости связано с нарушением трехного паттерна шагания, в связи с чем в походке мухи начинают преобладать более медленные неканонические сочетания движений ног. Такими мутантами могут быть мухи в линии 3389, у которых затронут ген *CG6746*, предположительно кодирующий тирозиновую фосфатазу (Рисунок 41). Нейроспецифичный нокдаун гена *CG6746* под контролем драйверов *appl/nrv2/tsh-GAL4* сопровождается снижением скорости побежки, но не имеет эффекта в случае драйвера *elav-GAL4*. Отличие последнего от трех остальных драйверов заключается в том, что экспрессия с этого драйвера преимущественно идет в мозге взрослых мух и в меньшей степени в торакальных ганглиях (Chintapalli et al., 2007, FlyAtlas, flyatlas.org). Следовательно, нарушения центрального комплекса маловероятны. В то же время нарушения сенсорных органов также можно вычеркнуть, так как снижение скорости при нокдауне *CG6746* наблюдается и под контролем драйвера *nrv2-GAL4*, который в отличие от того же *elav-GAL4* не запускает экспрессию в сенсорных органах (Sun et al., 1999).

Другим интересным фактом, выявленном в результате статистического анализа моторных отклонений у мутантов, является наличие положительной корреляции между длительностью и скоростью побегов (Таблица 3), что предполагает наличие физиологической зависимости систем, определяющих эти параметры. Так как скорость побежки в большинстве мутантных линий

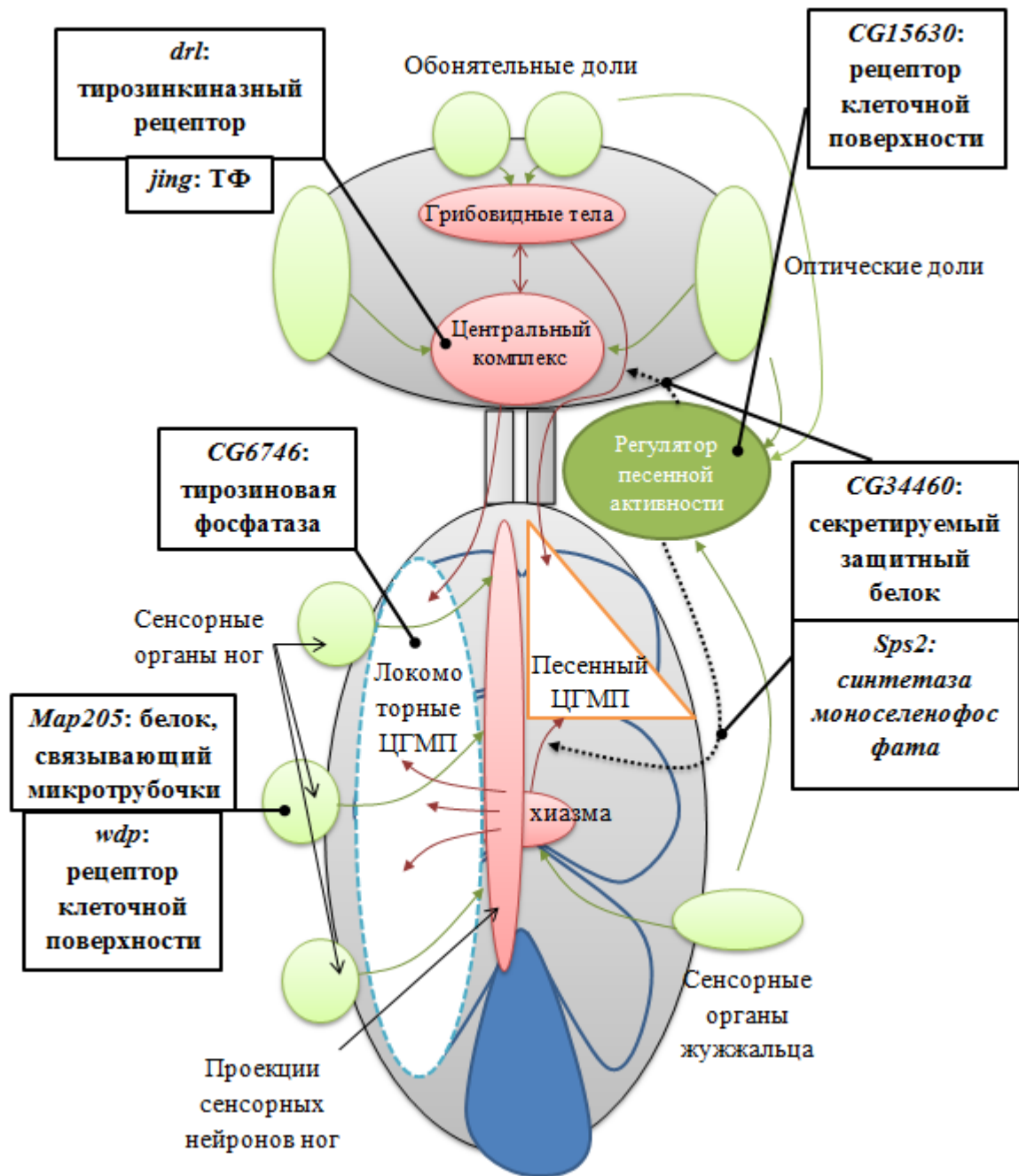


Рисунок 41. Схематичное изображение нервных структур дрозофилы, определяющих параметры моторных паттернов локомоции (слева) и песни ухаживания (справа). На рисунке указаны гены-кандидаты, мутация которых приводит к дефектам развития и работы структурных элементов сетей, обслуживающих данные формы моторной активности. См. пояснения в тексте.

снижается (Рисунок 20), то данная корреляция указывает на одновременное снижение длительности побегов у большинства линий. Действительно у 36 из 40 линий со сниженной длительностью побегки также снижалась и скорость, в то

время как у 22 линий с увеличенной длительностью побежки достоверные изменения в скорости обнаруживались только у 11 линий, хотя при этом в 8 из этих 11 случаев скорость побежки снижалась (Рисунок 20). Одновременное снижение скорости и длительности побежки наблюдается у мух с дефектами центрального комплекса мозга (Strauss, Heisenberg, 1993). В настоящем исследовании мутации в двух линиях с наиболее выраженным одновременным снижением анализируемых параметров (линия 2248, ЧИ 34 и линия 3494, ЧИ59) затрагивают гены *drl* и *jing* (Таблица 6). Установлено, что нарушение работы этих генов приводит к структурным дефектам нервной системы, в том числе и центрального комплекса мозга (Moreau-Fauvarque et al., 1998; Sedaghat et al., 2002). Учитывая, что нокдаун *drl* и *jing* под контролем *elav-GAL4* сопровождается теми же закономерностями, что и мутантов (рисунок 28), структурные нарушения в мозге мух являются более вероятной причиной локомоторной депрессии, в то время как работа ЦГМП не затронута (Рисунок 41). Отчасти данный вывод подтверждается и сохранением у этих мутантов в норме МИИ в песенной активности самцов.

Одновременное увеличение скорости и длительности побежки в отличие от снижения этих параметров довольно редкое сочетание и наблюдается только в трех линиях – 4653, 6387a-s2 и 995a-t3 (Рисунок 20). При этом линии 4653 и 6387a-s2 характеризуются также снижением частоты побегов. В линии 4653 инсерция произошла в гене галактозилтрансферазы (*CG8708*), причем на 3-конце гена (Таблица 6), что является редким событием, так как большая часть инсерций локализуется в регуляторных последовательностях перед геном либо в его начале (Bellen et al., 2004). Инсерция в кодирующей части на 3-конце гена сокращает синтезируемый транскрипт и продукт кодируемый этим геном, а также лишает транскрипт регуляторных областей расположенных в некодирующих областях на его 3-конце, которые необходимы для полиаденилирования, эффективной трансляции, локализации и стабильности мРНК (Barrett et al., 2012). Возможно, именно с этим связано необычное сочетание отклонений у мутантов данной линии. При нейроспецифичном нокдауне гена *CG8708* одновременное изменение

длительности и скорости побежки не обнаруживается, а под контролем *tsh-GAL4* изменения отсутствуют в обоих параметрах (Рисунок 29). Результаты нокдауна позволяют предполагать нарушения регуляторных влияний на работу локомоторного ЦГМП при супрессии *CG8708*, однако характер этих нарушений не представляется возможным предсказать. Инсерция в линии 6387a-s2 также является необычной, так как произошла в начале гена, который кодирует двухцистронную РНК, т.е. транскрипт с двумя несовпадающими рамками считывания (Таблица 7). Соответственно, эффекты мутации в линии 6387a-s2 обусловлены нарушением в синтезе сразу двух различных факторов (см. описание в п. 3.4), которые видимо и вызывают сложный фенотип с нестандартным сочетанием отклонений.

В противоположность положительной корреляции между длительностью и скоростью побегов в целом для всех линий, в фенотипе 8 мутантных линий (рисунок 20) происходит увеличение длительности побегов на фоне снижения скорости и, как правило, отсутствуют изменения в частоте побегов (в 6 из 8 линий). В данную группу входят линии 5567a и 3979a-s2, в которых затронуты гены *Map205* и *wdr*, соответственно (Рисунок 25). Отклонения в песенной активности у данных линий также сходны: увеличивается длительность посылки импульсной песни, снижается несущая частота импульса, но остается без изменений МИИ (Рисунок 26). Одновременное подавление скорости побежки и «скорости» импульса при увеличении общего уровня двигательной активности вероятно связано с нарушениями иннервации сенсорных органов и мышц, при которых увеличивается длительность фаз шага (Mendes et al., 2013) и нарушается структура импульса (Wheeler, et al., 1989; Chung, et al., 2001). Это предположение подкрепляется и функциональными характеристиками продуктов, кодируемых генами *Map205* и *wdr*. *wdr* относится к группе LRR-белков в мембране мышечных волокон, где данные белки вероятно выполняют рецепторные функции, определяя характер иннервации мышц (Kurusu et al., 2008). *Map205* участвует в ремоделировании микротрубочковой сети клетки, а усиление

нейрональной экспрессии *Map205* связывают с развитием такого заболевания как амиотрофический латеральный склероз (Vanden Broeck et al., 2013).

Увеличение индекса двигательной активности в 12 из 19 линий связано с увеличением длительности побежки, в 5 линиях оно вызвано ростом частоты инициаций, а в трех линиях наблюдается одновременное увеличение длительности и частоты инициаций побежки (Рисунок 20). Увеличение длительности побегов без отклонений в частоте инициаций показано при структурных нарушениях грибовидных тел, которые в этом отношении отчасти являются антагонистом центрального комплекса (Martin, 1998). Однако в литературе не описаны случаи увеличения уровня двигательной активности, связанные с возрастанием частоты побегов. Вместе с тем описанный Krishnan и Nash (1990) фенотип мутантов по гену *na* («неуверенной» походки мутанта с постоянными остановками), который кодирует важный мембранный компонент пейсмейкерных клеток (Nash et al., 2002), позволяет предположить, что увеличение параметра частоты инициаций побежки на фоне снижения ее длительности может отражать нестабильную работу локомоторного генератора. Среди линий с увеличенной частотой инициации побегов были идентифицированы, в частности, мутации в линиях 4262c-s2, 5282b и 843K (Рисунок 25). Мутация в линии 5282b затрагивает ген *lola*, который кодирует ТФ, необходимый для роста аксонов и их направления в нервной системе эмбриона (Giniger et al., 1994; Madden et al., 1999). Однако нейроспецифичный нокдаун гена вызывает противоположный действию мутации эффект (Рисунок 28), а под контролем *tsh-GAL4* и вовсе оказывается летальным, что в целом затрудняет оценку роли *lola* в реализации ритмических движений. Трудная для анализа ситуация обстоит и с локомоторными отклонениями при нокдауне гена *Dgp-1*, затронутого инсерцией в линии 843K. Изменения длительности побегов носят разнонаправленный характер, а скорость побежки снижается только под контролем *appl-GAL* (Рисунок 29). Однако у мутантов по этому гену обнаруживается редкий фенотип «нестабильного генератора», который проявляется в частом запуске побежки и сокращении ее длительности. Несмотря

на отсутствие информации о вовлеченности *Dgp-1* в какие-либо нервные процессы, связанные с моторной деятельностью, характер выявленных отклонений у мутантов и мух при нейроспецифичном нокадауне указывает на высокую вероятность вовлеченности гена в работу моторных систем в ЦНС. В целом, неоднозначность роли рассмотренных двух генов в инициации побегов указывает на то, что данный параметр определяется множеством факторов, влияние которых распространяется не только на локомоторный ЦГМП, но и другие элементы моторных систем. Интересно, что все три линии 4262с-s2, 5282b и 843K демонстрируют одинаковые отклонения в параметрах песенной активности (увеличение длительности и частоты посылок, сокращение несущей частоты), несмотря на различия в величине длительности побегов (Рисунок 25, 26). Не исключено, что рост частоты побежки может быть связан с определенными физиологическими сдвигами, направленно влияющими на половое поведение самцов.

Статистический анализ песенной активности выявил наличие корреляций между параметрами, в соответствии с которыми во многих линиях инсерция должна вызывать одновременное увеличение времени звукопродукции, частоты импульсов в посылке и их длительности, либо, наоборот, приводить к подавлению звукопродукции, урежению импульсов и уменьшению их длительности (Таблица 4). Вместе с тем, во многих мутантных линиях эта закономерность не соблюдается (Рисунок 22). Сильная зависимость между параметрами говорит о малом количестве степеней свободы в моторной системе звукопродукции, работа отдельных элементов которой регулируется совместно и не требует тонкой подстройки по определенным параметрам, как, например, в случае со скоростью и частотой побегов. Причиной подобной связанности параметров звукопродукции вероятно является роль ИП в изоляции видов. Песня ухаживания является врожденной стандартизированной формой поведения, которая не требует сложных схем управления отдельными ее элементами, а отклонения параметров импульсной песни существенно снижают эффективность спаривания внутри вида (Villella et al., 1997; Ritchie et al., 1999). Тем не менее, параметры песенной

активности проявляют крайнюю вариабельность при действии различных внешних факторов. В частности, при ухаживании за самкой сразу двух самцов и длительность, и частота посылок существенно снижены относительно варианта с ухаживанием только одним самцом (Tauber, Eberl et al., 2002). Предварительное содержание самцов в темноте в течение 36 часов после вылупления либо в группе из 10 самцов при 12-часовом световом дне также вызывает снижение этих параметров и одновременно увеличение МИИ и несущей частоты (Панова и др., 2009; Федотов, Брагина, 2010). Интересно, что обнаружены мутанты, у которых эффект предварительного содержания в темноте на поведение ухаживания отсутствует (Molotova-Besedina et al., 2009). Пейксото и Холл (Peixoto, Hall, 1997) показали, что МИИ может изменяться в диапазоне значений от 30 до 63 мс при понижении температуры с 30 до 15°C. Более того, данная вариабельность МИИ может быть использована для получения в результате селекции в ряду поколений линий с увеличенным до 52 или сниженным до 27 мс МИИ (Turner, Miller, 2012). Вследствие указанных особенностей песни ухаживания, в дальнейшем поиске генов, нарушающих моторный паттерн песенной активности, особое внимание обращалось не только на изменения МИИ, но и на соответствие конкретных отклонений выявленной корреляции параметров.

В группе мутантов, демонстрирующих выраженные отклонения параметров звукопродукции, соответствующие выявленным корреляциям песенных параметров (Таблица 4, Рисунок 23), было идентифицировано 3 гена (*Mef2*, *ups*, *CG34460*), нарушение работы которых предположительно определяет мутантный фенотип. Инсерция в гены *Mef2* и *ups* сопровождается снижением длительности или частоты посылок ИП и увеличением МИИ и несущей частоты (Рисунки 26). Нейроспецифичный нокдаун гена *Mef2*, который кодирует фактор регуляции развития мышц (Bour et al. 1995; Lilly et al. 1995), наоборот, под управлением отдельных драйверов приводит к увеличению длительности посылок и уменьшению МИИ (Рисунок 33). Т.е. можно заключить, что нарушение экспрессии *Mef2* в нейронах мозга влияет на параметры ИП, однако оценить роль данного гена в работе торакального песенного генератора затруднительно,

учитывая летальное действие нокдауна *Mef2* под контролем драйвера *tsh-GAL4*. Инсерция рядом с геном *CG34460* имеет эффект обратный действию мутации *Mef2*: длительность посылок увеличена, МИИ и несущая частота сокращены (Рисунки 26). Данный фенотип полностью воспроизводится при нокдауне под контролем драйвера *appl-GAL4* и не противоречит изменениям при нокдауне под контролем *nrv2/tsh-GAL4*. Однако нокдаун *CG34460* под контролем *elav-GAL4*, увеличивая длительность посылок, не снижает МИИ (Рисунок 33). Выше уже отмечалось, что общим отличием *elav-GAL4* от остальных драйверов является его преимущественная экспрессия в мозге мух и в меньшей степени в торакальных ганглиях на стадии имаго (Chintapalli et al., 2007, FlyAtlas, flyatlas.org). Можно заключить, что *CG34460* является геном, уровень экспрессии которого обуславливает взаимосвязанные изменения параметров в ответ на внешние условия, причем в мозге его экспрессия регулирует длительность посылок ИП, а в торакальных ганглиях величину МИИ. Данное предположение соответствует фактам, что запуск работы песенного ЦГМП выполняется из мозга, а величина МИИ связана с активностью торакальных нейронов (von Philipsborn et al., 2011) и вероятно мало зависит от активности командных нейронов, так как стабильная структура моторного паттерна ИП необходима для эффективного спаривания (Ritchie et al., 1999). Возможно, что нервные сети, обслуживающие звукопродукцию, организованы по схеме, в которой регуляторные стимулы из одного источника (например, эндокринной железы) оказывают по разным каналам синхронное влияние и на командные, и на генераторные нейроны, обуславливая корреляцию отклонений в ИП. Соответственно, нарушения по одному из параметров будут вызываться либо нарушением одного из каналов, либо структур, управляемых им (Рисунок 41). Продукт гена *CG34460* относится к семейству белков SVC, гены которых не экспрессируются во время развития. Белки SVC секретируются в гемолимфу в ответ на стрессорные воздействия окружающей среды (Sheldon et al., 2007). На молекулярном уровне показано участие продукта гена *CG34460* в передаче сигнала от факторов роста в ядро клетки (Xu et al., 2007в). Эти данные подтверждают возможную роль *CG34460* в

модификации клеточной активности в нейронных сетях ИП в соответствии с изменениями факторов внешней среды (Рисунок 41).

В группу мутантных линий, у которых отклонение параметров ИП не соответствует выявленным корреляциям (Таблица 4), среди прочих входят линии 5769 и 3404a. Мутация в линии 5769 приводит к избирательному и крайне выраженному снижению МИИ на фоне сохранения остальных параметров ИП в норме, а в линии 3404a к одновременному увеличению длительности, частоты инициаций посылок и МИИ (Рисунок 26). В линии 5769 инсерцией затронут ген *Sps2*, кодирующий синтетазу моноселенофосфата, фермента, необходимого для синтеза селеноцистеина, входящего в состав селенобелков (Таблица 6). Отклонения параметров ИП при нокдауне *Sps2* по сути повторяют эффекты RNAi гена *CG34460* (Рисунок 33), а функциональная характеристика продукта *Sps2*, как и в случае с продуктом гена *CG34460*, указывает на особую роль *Sps2* в адаптации к изменяющимся условиям среды (Harbison et al., 2005). Логично, что и роли этих двух генов в работе песенного ЦГМП близки. Однако при нокдауне *Sps2* обнаруживаются противоположные изменения длительности посылки под контролем различных драйверов, что сразу усложняет интерпретацию таких данных и требует дополнительных экспериментов.

Наличие противонаправленных изменений при нокдауне с использованием различных нейроспецифичных драйверов обнаруживается в параметрах как локомоторной, так и песенной активности у разных генов (Рисунок 28, 29, 33). Ранее другими авторами уже сообщалось о получении противоположных эффектов при использовании *elav-GAL4* и *apple-GAL4*. Симонсен с соавт. (Simonsen et al., 2008) в своем исследовании влияния автофагии в нервной системе на старение мухи установили, что усиленная экспрессия гена *Atg8a* (*autophagy-related gene*) под контролем *apple-GAL4* приводит к кардинальному увеличению длительности жизни. Однако в случае сверхэкспрессии гена под контролем *elav-GAL4* длительность жизни мухи, наоборот сокращается. По мнению авторов, различие в эффектах экспрессии *Atg8a* под управлением *elav-GAL4* и *apple-GAL4* может быть связано с особенностями тайминга экспрессии

Atg8a под контролем используемых драйверов в процессе созревания и старения ЦНС. Кроме различий в интенсивности экспрессии в процессе развития каждый драйвер имеет свои специфические особенности в преобладании экспрессии в тех или иных нервных структурах. Так, например, дизайнеры драйвера *nrv2-GAL4* (Sun et al., 1999) выявили несколько видимых отличий в паттернах экспрессии флуоресцентного белка GFP под контролем *nrv2-GAL4* и *elav-GAL4* в нервной системе дрозофилы, которые могут быть причиной противоположных эффектов этих драйверов. У мух *nrv2-GAL4/GFP* в отличие от мух *elav-GAL4/GFP* флуоресценция GFP отсутствовала во многих периферических сенсорных нейронах на поздней эмбриональной и личиночных стадиях, в развивающихся нейронах фоторецепторных клеток и глазных дисках.

Дамстрей с соавт. (Dumstreï et al., 2003) использовал *nrv2-GAL4* для экспрессии гена *DE-cad^{ex}* избирательно в кортексной глии, а *elav-GAL4* – для его направленной экспрессии в кортексных нейронах в личиночном мозге дрозофилы. Однако специфичный эффект нокдауна гена *Sps2* под контролем *nrv2-GAL4* (Рисунок 18) не связан с выраженной экспрессией данного драйвера в глии, так как нокдаун под контролем драйвера *repo-GAL4* не приводит к отклонениям в моторной активности мух (данные не показаны). Сходная ситуация с отклонениями песенной активности при нокдауне гена *CG15630* (Рисунок 18), при котором длительность посылки не изменяется в случае использования *nrv2-* и *repo-GAL4* (данные не показаны). Т. е. расхождение эффектов нокдауна генов *Sps2* и *CG15630* под контролем различных драйверов не связано с возможными нарушениями в функционировании глиальных клеток.

Супрессия гена *CG15630*, как и в случае с генами *Sps2* и *CG34460*, вызывает увеличение длительности побежки при использовании драйверов *appl-* и *elav-GAL4* (Рисунок 29), а также еще более выраженное сокращение МИИ (менее 35 мс, Рисунок 33). *CG15630* кодирует белок, который связывает другие белки. В составе гена выявлены консервативные последовательности, соответствующие доменам иммуноглобулина и фибронектина типа III (InterPro, ebi.ac.uk/interpro, accession number Q9VR25). Данные домены обнаруживаются в различных

рецепторах на поверхности клетки и молекулах клеточной адгезии (Vogel et al., 2003). Выше анализ эффектов нокдауна *CG34460* на песенную активность мух позволил предположить наличие двух каналов, через которые влияния внешней среды приводят к одновременному модулированию активности структур в мозге, отвечающих за длительность пения, и в торакальных ганглиях, определяющих величину МИИ. В случае нокдауна *CG15630* под контролем *elav-GAL4* происходят отклонения в обоих песенных параметрах, что может быть связано с нарушениями регуляторных структур, которые получают информацию от сенсорных органов и модулируют через предполагаемые каналы активность исполнительных моторных сетей (Рисунок 41). При этом данные регуляторные структуры должны быть непосредственно связаны с сенсорными и исполнительными системами, модулирующими движения крыла, так как скорость полета при нокдауне *CG15630* сохраняется в норме и, следовательно, модуляция локомоторных систем сенсорными стимулами не нарушена. Предложенная схема вероятных нарушений подтверждается выявленными морфологическими отклонениями в нервных структурах, экспрессирующих *nr12-GAL4*, при нокдауне *CG15630* в тех же структурах. У мух со сниженным уровнем транскрипта *CG15630* наблюдается дезорганизация жужжальцевого нервного сплетения (Рисунки 37, 38, 40), которое образовано коллатеральными интернейронами, передающими сенсорную информацию от сенсорных органов жужжалец к прямым крыловым мышцам, и нейритными ветвлениями мотонейронов этих мышц (Trimarchi, Schneiderman, 1994; Trimarchi, Murphey, 1997). Показано, что механическая стимуляция жужжалец с разной частотой сопровождается изменениями в частоте крыловых махов при полете в диапазоне 200-220 Гц. Удаление же концевых головок у жужжалец приводит к снижению их чувствительности на 90% и сопровождается увеличением частоты биения крыла до 225 Гц, значения, которое, по-видимому, является физиологическим пределом частоты крыловых махов у дрозофилы (Bartussek et al., 2013). Соответственно, учащение импульсов в послышке песни ухаживания при нейроспецифичном нокдауне *CG15630* (Рисунок 33) практически до своего верхнего

физиологического предела (около 35 Гц) также может определяться нарушениями в передаче сенсорной информации от жужжалец к прямым крыловым мышцам, чья активность отражается в параметрах ИП (Ewing, 1979a). Однако в литературе отсутствуют данные о работе жужжалец во время звукопродукции и о влиянии сенсорной информации от этого органа на исполнение песни ухаживания. Изучение данного вопроса позволит подтвердить или опровергнуть роль *CG15630* в развитии нервных сетей, опосредующих сенсорный контроль моторного паттерна ИП.

Как и конститутивный нокдаун, индуцированный нокдаун *CG15630* на стадии имаго также вызывает сокращение МИИ (Рисунок 35). Наличие эффектов от супрессии нейроспецифичного гена *CG15630* у взрослых мух предполагает непосредственное вовлечение продукта этого гена в функционирование сетей, обслуживающих работу песенного ЦГМП, а не только в их развитие. Конкретный механизм вовлеченности *CG15630* в работу песенного ЦГМП трудно предположить, так как отсутствует описание экспрессии драйвера *GALA.ER* в организме взрослой мухи. Однако сам факт однонаправленных отклонений в ИП самца при супрессии *CG15630* как на всех стадиях развития, так и только на стадии взрослого животного указывает на то, что данный ген кодирует продукт, который необходим для установления значений МИИ в диапазоне специфичном для *Drosophila melanogaster*. То, что *CG15630* участвует непосредственно в физиологических процессах, связанных с социальным и половым поведением дрозофилы на стадии имаго, в частности, подтверждается подавлением экспрессии этого гена в 1.7 раза в голове самцов, имевших контакт с самцами, относительно уровня экспрессии у мух, которые ухаживали за самкой или не имели контактов (Ellis, Carney, 2010). Вместе с тем известно, что содержание самца в группе с другими самцами катастрофически снижает индекс песенной активности в сравнении с самцами, которых содержали по одному (Панова и др., 2009). Т. е. снижение экспрессии *CG15630* вероятно является одним из факторов, определяющих подавление импульсной активности самца после контакта с

другими самцами, что еще раз подтверждает специфичную роль этого гена в определении величины МИИ.

Отсутствие изменений в частоте инициаций и длительности посылок ИП под контролем *GAL4.ER* (Рисунок 35) указывает на то, что отклонения данных параметров у мух с нокдауном *CG15630* под контролем конститутивных драйверов *elav*- и *appl-GAL4* вероятно связаны с дефектами развития. Вместе с тем, изменения длительности посылок при супрессии *CG15630* отсутствуют и при использовании конститутивных драйверов *nrv2*- и *tsh-GAL4* (Рисунок 33). *tsh* преимущественно экспрессируется в торако-абдоминальном ганглии (Fasano et al., 1991; Chintapalli et al., 2007, FlyAtlas, flyatlas.org; Рисунок 32), так что направляемая *tsh-GAL4* интерференция может напрямую воздействовать на функционирование ЦГМП, сенсорные влияния от механорецепторов и работу исполнительных систем, но не на регуляторные влияния из мозга на песенный генератор. При нокдауне под контролем *nrv2-GAL4* также обнаруживаются нарушения именно в торако-абдоминальном ганглии (Рисунки 37, 38, 40). Отсюда можно заключить, что изменения длительности и частоты инициаций посылок ИП при супрессии *CG15630* являются результатом дефектов развития в мозге мух. С учетом выше предложенной схемы вовлеченности *CG15630* в работу песенного ЦГМП предполагаемые нарушения должны затрагивать нервные структуры в мозгу, которые, как и жужжальцевое сплетение в торако-абдоминальном ганглии, могут опосредовать передачу сенсорной информации из мозга в исполнительные системы звукопродукции. Конечным акцептором этих влияний может быть группа нейронов vPR6 в мезоторакальном нейромере (von Philipsborn, et al., 2011), экспрессирующих ген *fru*, который определяет половые особенности поведения самцов дрозофилы, в том числе способность производить песню ухаживания (Demir, Dickson, 2005; Clyne, Miesenböck, 2008). Активность vPR6 необходима и достаточна для звукопродукции, а уровень активности этих нейронов показывает обратную зависимость с величиной МИИ (von Philipsborn, et al., 2011).

Снижение МИИ у мух с супрессией *CG15630* под контролем *GAL4.ER* может быть также связано с повышенной активностью нейронов vPR6. Было бы

интересно оценить в будущих исследованиях роль продукта гена *CG15630* в функционировании vPR6 и других нейронов, в которых экспрессируется ген *fru* и с активностью которых связана звукопродукция у самцов дрозофилы (Clyne, Miesenböck, 2008). Кроме того, было бы интересно оценить роль гена *CG33543*, который является паралогом гена *CG15630*, в реализации ритмической моторной деятельности. *CG33543* также предположительно является белком клеточной адгезии, а сам ген демонстрирует нейроспецифичную экспрессию, однако и он практически не изучен (InterPro, ebi.ac.uk/interpro, accession number Q59E14; Chintapalli et al., 2007, FlyAtlas, flyatlas.org).

ВЫВОДЫ

1. Изменения параметров локомоторного поведения и звукопродукции в группе проанализированных 82-х Р-инсерционных мутантов дрозофилы происходят взаимосвязано. В длительности и частоте инициаций побегов и посылок импульсной песни ухаживания отражаются неспецифические нарушения, которые затрагивают регуляцию или базовые механизмы функционирования различных моторных систем. Скорость побегов, межимпульсный интервал и несущая частота импульса являются специфическими показателями работы отдельных форм моторной активности.

2. Выявленные в результате скрининга 22 гена-кандидата кодируют мембранные белки, ферменты, регуляторные факторы и РНК, для 20 из которых участие в реализации ритмических движений показано впервые. Обнаружение у 14 генов-кандидатов ортологов у млекопитающих и человека предполагает возможность переноса результатов исследования молекулярных механизмов реализации моторных функций на более сложноорганизованные нервные сети.

3. Нейроспецифичный нокдаун для 10 генов-кандидатов подтвердил вовлеченность данных генетических детерминант в нервные механизмы, определяющие параметры ритмической моторной активности. Эффекты нейроспецифичного нокдауна могут повторять эффект мутации (*drl*), быть противоположными мутантному фенотипу (*lola*), либо иметь специфический набор отклонений (*Sps2*).

4. Установлено, что ген *CG15630* является специфической детерминантой, которая определяет надлежащее функционирование нервных сетей, формирующих моторный паттерн песенной активности самцов дрозофилы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камышев Н.Г. Дрозофила как модельный объект для вскрытия молекулярных механизмов моторных и когнитивных дисфункций и поиска фармакологических способов их коррекции: количественный подход к оценке изменений локомоторного поведения // Международная научная конференция «Измерительные и информационные технологии в охране здоровья (МЕТРОМЕД-2011)». – Сборник научных трудов, Санкт-Петербург. – 2011. – С. 152–160.
2. Панова А.А., Федотов С.А., Брагина Ю.В. Влияние социального опыта на локомоторную активность и поведение ухаживания самцов *Drosophila melanogaster* // Первая Всероссийская молодежная научная конференция, посвященная 125-летию биологических исследований в Томском государственной университете ", Томск. – 2010. – С. 101.
3. Плотникова С. И. Структурная организация центральной нервной системы насекомых. – Л.: Наука, 1979. – 120 с.
4. Попов А.В., Савватеева-Попова Е.В., Камышев Н.Г. Особенности акустической коммуникации у плодовых мушек *Drosophila melanogaster* // Сенсорные системы. – 2000. – Т. 14. – № 1. – С. 60-74.
5. Свидерский В. Л. Активность одиночных нейронов грудного ганглия азиатской саранчи (*Locusta migratoria*) // ДАН СССР. – 1965. – Т. 164. – С. 1204–1207.
6. Свидерский В. Л. Нейрофизиология полета насекомых. – Л.: Наука, 1973. – 216 с.
7. СибЭнзим [Электронный ресурс]. – russia.sibenzyme.com/service/protocols.
8. Федотов С.А., Брагина Ю.В. Влияние индивидуального опыта на характеристики песни ухаживания самцов *Drosophila melanogaster* // Конференция молодых ученых «Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды", посвященная 85-летию со дня основания Института физиологии им. И. П. Павлова РАН, СПб. – 2010. – С. 114.

9. Akay T., Bässler U.J., Gerharz P., Büschges A. The role of sensory signals from the insect coxa-trochanteral joint in controlling motor activity of the femur-tibia joint // *Journal of neurophysiology*. – 2001. – Vol. 85. – № 2. – P. 594–604.
10. Akay T., Haehn S., Schmitz J., Büschges A. Signals from load sensors underlie interjoint coordination during stepping movements of the stick insect leg // *Journal of neurophysiology*. – 2004. – Vol. 92. – № 1. – P. 42–51.
11. Alford S., Christenson J., Grillner S. Presynaptic GABA_A and GABAB receptor-mediated phasic modulation in axons of spinal motor interneurons // *European journal of neuroscience*. – 1991. – Vol. 3. – № 2. – P. 107–117.
12. Alzheimer C., Schwindt P.C., Crill W.E. Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex // *The Journal of neuroscience*. – 1993. – Vol. 13. – № 2. – P. 660–673.
13. Aman T.K., Grieco-Calub T.M., Chen C., Rusconi R., Slat E.A., Isom L.L., Raman I.M. Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels // *The Journal of neuroscience*. – 2009. – Vol. 29. – № 7. – P. 2027–2042.
14. Anderson T.M., Abbinanti M.D., Peck J.H., Gilmour M., Brownstone R.M., Masino M.A. Low-threshold calcium currents contribute to locomotor-like activity in neonatal mice // *Journal of neurophysiology*. – 2012. – Vol. 107. – № 1. – P. 103–113.
15. Andersson L.S., Larhammar M., Memic F., Wootz H., Schwochow D., Rubin C.J., Patra K., Arnason T., Wellbring L., Hjalm G., Imsland F., Petersen J.L., McCue M.E., Mickelson J.R., Cothran G., Ahituv N., Roepstorff L., Mikko S., Vallstedt A., Lindgren G., Andersson L., Kullander K. Mutations in *DMRT3* affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice // *Nature*. – 2012. – Vol. 488. – № 7413. – P. 642–646.
16. Angstadt J. D., Grassmann J.L., Theriault K.M., Levasseur S.M. Mechanisms of postinhibitory rebound and its modulation by serotonin in excitatory

swim motor neurons of the medicinal leech // Journal of comparative physiology A. – 2005. – Vol. 191. – № 8. – P. 715–732.

17. Arbeitman M.N., Fleming A.A., Siegal M.L., Null B.H., Baker B.S. A genomic analysis of *Drosophila* somatic sexual differentiation and its regulation // Development. – 2004. – Vol. 131. – № 9. – P. 2007–2021.

18. Archambault V., D'Avino P.P., Deery M.J., Lilley K.S., Glover D.M. Sequestration of Polo kinase to microtubules by phosphoprimer-independent binding to Map205 is relieved by phosphorylation at a CDK site in mitosis // Genes and development. – 2008. – Vol. 22. – № 19. – P. 2707–2720.

19. Arshavsky Y.I., Deliagina T. G., Orlovsky G. N., Panchin Y. V., Popova L. B., Sadreyev R. I. Analysis of the central pattern generator for swimming in the mollusk *Clionea* // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1998. – Vol. 860. – № 1. – P. 51–69.

20. Arshavsky Y.I., Deliagina T.G., Gelfand I.M., Orlovsky G.N., Panchin Y.V., Pavlova G.A., Popova L.B. Non-synaptic interaction between neurons in molluscs // Comparative biochemistry and physiology, part C: Comparative pharmacology. – 1988. – Vol. 91. – № 1. – P. 199–203.

21. Arshavsky Y.I., Grillner S., Orlovsky G.N., Panchin Y.V. Central generators and the spatio-temporal pattern of movements // The Development of timing control and temporal organization in coordinated action, edited by Fagard J., Wolff P.H. – Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1991. – P. 93–115.

22. Arshavsky Y.I., Orlovsky G.N., Panchin Y.V., Roberts A., Soffe S.R. Neuronal control of swimming locomotion: analysis of the pteropod mollusc *Clione* and embryos of the amphibian *Xenopus* // Trends in neurosciences. – 1993. – Vol. 16. – № 6. – P. 227–233.

23. Arshavsky Y.I., Deliagina T.G., Orlovsky G.N. Pattern generation // Current opinion in neurobiology. – 1997. – Vol. 7. – № 6. – P. 781–789.

24. Ayali A., Harris-Warrick R.M. Monoamine control of the pacemaker kernel and cycle frequency in the lobster pyloric network, // The Journal of neuroscience. – 1999. – Vol. 19. – № 15. – P. 6712–6722.

25. Baek M., Mann R.S. Lineage and birth date specify motor neuron targeting and dendritic architecture in adult *Drosophila* // Journal of neuroscience. – 2009. – Vol. 29. – № 21. – P. 6904–6916.
26. Bagni C., Bray S., Gogos J.A., Kafatos F.C., Hsu T. The *Drosophila* zinc finger transcription factor CF2 is a myogenic marker downstream of MEF2 during muscle development // Mechanisms of development. – 2002. – Vol. 117. – № 1. – P. 265–268.
27. Baker P.W., Klitgord N., Cripps R.M. Adult myogenesis in *Drosophila melanogaster* can proceed independently of Myocyte enhancer factor-2 // Genetics. – 2005. – Vol. 170. – № 4. – P. 1747–1759.
28. Bal T., McCormick D.A. Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current I_h // Journal of neurophysiology. – 1997. – Vol. 77. – № 6. P. 3145–3156.
29. Banerjee S., Lee J., Venkatesh K., Wu C.-F., Hasan G. Loss of flight and associated neuronal rhythmicity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mutants of *Drosophila* // Journal of neuroscience. – 2004. – Vol. 24. – № 36. – P. 7869–7878.
30. Bant J.S., Raman I.M. Control of transient, resurgent, and persistent current by open-channel block by Na channel 4 in cultured cerebellar granule neurons // Proceedings of the national academy of sciences. – 2010. – Vol. 107. – № 27. – P. 12357–12362.
31. Baro D.J., Coniglio L.M., Cole C.L., Rodriguez H.E., Lubell J.K., Kim M.T., Harris-Warrick R.M. Lobster *shal*: comparison with *Drosophila shal* and native potassium currents in identified neurons // The Journal of neuroscience. – 1996. – Vol. 16. – № 5. – P. 1689–1701.
32. Barrett L.W., Fletcher S., Wilton S.D. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements // Cellular and molecular life sciences. – 2012. – Vol. 69. – № 21. – P. 3613–3634.
33. Bartussek J., Mutlu A.K., Zapotocky M., Fry S.N. Limit-cycle-based control of the myogenic wingbeat rhythm in the fruit fly *Drosophila* [Электронный

pecypc] // Journal of the royal society interface. – 2013. – Vol. 10. – № 80. – 20121013. – doi: 10.1098/rsif.2012.1013.

34. Bässler U., Wegener U. Motor output of the denervated thoracic ventral nerve cord in the stick insect *Carausius morosus* // Journal of experimental biology. – 1983. – Vol.105. – P.127–145.

35. Bässler U., Büschges A. Pattern generation for stick insect walking movements—multisensory control of a locomotor program // Brain research reviews. – 1998. – Vol. 27. – № 1. – P. 65–88.

36. Bejarano F., Luque C.M., Herranz H., Sorrosal G., Rafel N., Pham T.T., Milan M. A gain-of-function suppressor screen for genes involved in dorsal-ventral boundary formation in the *Drosophila* wing // Genetics. – 2008. – Vol. 178. – № 1. – P. 307–323.

37. Bellen H.J., Levis R.W., Liao G., He Y., Carlson J.W., Tsang G., Evans-Holm M., Hiesinger P.R., Schulze K.L., Rubin G.M., Hoskins R.A., Spradling A.C. The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes // Genetics. – 2004. – Vol. 167. – № 2. – P. 761–781.

38. Bellen H.J., Wilson C., Gehring W.J. Dissecting the complexity of the nervous system by enhancer detection // BioEssays. – 1990. – Vol. 12. – № 5. – P. 199–204.

39. Belogradov G.I. Factor B and the mitochondrial ATP synthase complex // Journal of biological chemistry. – 2001. – Vol. 277. – № 8. – P. 6097–6103.

40. Bennet-Clark H.C., Ewing A.W. The wing mechanism involved in the courtship of *Drosophila* // Journal of experimental biology. – 1968. – Vol. 49. – № 1. – P. 117–128.

41. Bennett M.V., Zukin R.S. Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain // Neuron. – 2004. – Vol. 41. – № 4. – P. 495–511.

42. Berger C., Renner S., Luer K., Technau G.M. The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the *Drosophila* embryonic CNS // Developmental dynamics. – 2007. – Vol. 236. – № 12. – P. 3562–3568.

43. Black B.L., Olson E.N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins // *Annual review of cell and developmental biology*. – 1998. – Vol. 14. – P. 167-196.
44. Blanchard F.J., Collins B., Cyran S.A., Hancock D.H., Taylor M.V., Blau J. The transcription factor Mef2 is required for normal circadian behavior in *Drosophila* // *Journal of neuroscience*. – 2010. – Vol. 30. № 17. – P. 5855–5865.
45. Bonkowsky J.L., Yoshikawa S., O'Keefe D.D., Scully A.L., Thomas J.B. Axon routing across the midline controlled by the *Drosophila* Derailed receptor // *Nature*. – 1999. – Vol. 402. – № 6761 – P. 540–544.
46. Bornemann D.J., Duncan J.E., Staatz W., Selleck S., Warrior R. Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wiggless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways // *Development*. – 2004. – Vol. 131. – № 9. – P. 1927–1938.
47. Bour B.A., O'Brien M.A., Lockwood W.L., Goldstein E.S., Bodmer R., Taghert P.H., Abmayr S.M., Nguyen H.T. *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis // *Genes and development*. – 1995. – Vol. 9. – № 6. – P. 730–741.
48. Brand A.H., Dormand E.L. The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the *Drosophila* nervous system // *Current opinion in neurobiology*. – 1995 – Vol. 5. – № 5. – P. 572–578.
49. Brand A.H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // *Development*. – 1993. – Vol. 118. – № 2. – P. 401–415.
50. Branson K., Robie A.A., Bender J., Perona P., Dickinson M.H. High-throughput ethomics in large groups of *Drosophila* // *Nature methods*. – 2009. – Vol. 6. – № 6. – P. 451–457.
51. Brennecke J., Aravin A.A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R., Hannon G.J. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila* // *Cell*. – 2007. – Vol. 128. – № 6. – P. 1089– 103.

52. Briggman K.L., Kristan W.B. Imaging dedicated and multifunctional neural circuits generating distinct behaviors // *Journal of neuroscience*. – 2006. – Vol. 26. – № 42. – P. 10925-10933.
53. Briggman K.L., Kristan W.B. Multifunctional pattern-generating circuits // *Annual review of neuroscience*. – 2008. – Vol. 31. – № 1. – P. 271–294.
54. Bristle Screen Database [Электронный ресурс]. – bristlescreen.imba.oeaw.ac.at.
55. Brown T.G. The intrinsic factors in the act of progression in the mammal // *Proceedings of the royal society b: biological sciences*. – 1911. – Vol. 84. – № 572. – P. 308–319.
56. Buchanan J.T., Grillner S. Newly identified 'glutamate interneurons' and their role in locomotion in the lamprey spinal cord // *Science*. – 1987. – Vol. 236 – № 4799 – P. 312-314.
57. Bucher D. Interjoint coordination in the stick insect leg-control system: the role of positional signaling // *Journal of neurophysiology*. – 2002. – Vol. 89. – № 3. – P. 1245–1255.
58. Burgess A., Wainwright S.R., Shihabuddin L.S., Rutishauser U., Seki T., Aubert I. Polysialic acid regulates the clustering, migration, and neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus // *Developmental neurobiology*. – 2008. – Vol. 68. – № 14. – P. 1580–1590.
59. Büschges A., Akay T., Gabriel J.P., Schmidt J. Organizing network action for locomotion: insights from studying insect walking // *Brain research reviews*. – 2008 – Vol. 57. – № 1 – P. 162–171.
60. Büschges A., Ludwar B.C., Bucher D., Schmidt J., DiCaprio R.A. Synaptic drive contributing to rhythmic activation of motoneurons in the deafferented stick insect walking system // *The European journal of neuroscience*. – 2004. – Vol.19. – № 7. – P. 1856–1862.
61. Büschges A., Ludwar B.Ch., Bucher D., Schmidt J., DiCaprio R.A. Synaptic drive contributing to rhythmic activation of motoneurons in the deafferented

stick insect walking system // European journal of neuroscience. 2004. – Vol. 19. – № 7– P. 1856–1862.

62. Büschges A., Schmidt, Bässler U.J. Rhythmic patterns in the thoracic nerve cord of the stick insect induced by pilocarpine // Journal of experimental biology. – 1995. – Vol. 198. – Pt. 2. – P. 435–456.

63. Cang J., Friesen W.O. Model for intersegmental coordination of leech swimming: central and sensory mechanisms // Journal of neurophysiology. – 2002. – Vol. 87. – № 6. – P. 2760–2769.

64. Carreira V.P., Mensch J., Fanara J.J. Body size in *Drosophila*: genetic architecture, allometries and sexual dimorphism // Heredity. – 2008. – Vol. 102. – № 3. – P. 246–256.

65. Casasnovas B., Meyrand P. Functional differentiation of adult neural circuits from a single embryonic network // The Journal of neuroscience. – 1995. – Vol. 15. – № 8. – P. 5703–5718.

66. Castagnetti S. Orb and a long poly(A) tail are required for efficient oskar translation at the posterior pole of the *Drosophila* oocyte // Development. – 2003. – Vol. 130. – № 5. – P. 835–843.

67. Castellano S., Morozova N., Morey M., Berry M.J., Serras F., Corominas M., Guigo R. *In silico* identification of novel selenoproteins in the *Drosophila melanogaster* genome // EMBO reports. – 2001. – Vol. 2. – № 8. – P. 697-702.

68. Catterall W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels // Neuron. – 2000. – Vol. 26. – № 1. – P. 13–25.

69. Cavarec L., Jensen S., Casella J.F., Cristescu S.A., Heidmann T. Molecular cloning and characterization of a transcription factor for the copia retrotransposon with homology to the BTB-containing lola neurogenic factor // Molecular and cellular biology. – 1997. – Vol. 17. – № 1. – P. 482–494.

70. Cazalets J.-R., Nagy F., Moulins M. Suppressive control of the crustacean pyloric network by a pair of identified interneurons. I. Modulation of the motor pattern // The Journal of neuroscience. – 1990. – Vol. 10. – № 2. – P. 448–457.

71. Cepeda C., Chandler S.H., Shumate L.W., Levine M.S. Persistent Na⁺ conductance in medium-sized neostriatal neurons: characterization using infrared videomicroscopy and whole cell patch-clamp recordings // *Journal of neurophysiology*. – 1995. – Vol. 74. – № 3. – P. 1343–1348.
72. Champagnat J., Fortin G. Primordial respiratory-like rhythm generation in the vertebrate embryo // *Trends in neurosciences*. – 1997. – Vol. 20. – № 3. – P. 119–124.
73. Cheah P.Y., Chia W., Yang X. Jumeaux, a novel *Drosophila* winged-helix family protein, is required for generating asymmetric sibling neuronal cell fates // *Development*. – 2000. – Vol. 127. – № 15. – P. 3325–3335.
74. Chen C.L., Shim M.S., Chung J., Yoo H.S., Ha J.M., Kim J.Y., Choi J., Zang S.L., Hou X., Carlson B.A., Hatfield D.L., Lee B.J. G-rich, a *Drosophila* selenoprotein, is a Golgi-resident type III membrane protein // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2006. – Vol. 348. – № 4. – P. 1296–1301.
75. Chen Y.H., Dale T.J., Romanos M.A., Whitaker W.R.J., Xie X.M., Clare J.J. Cloning, distribution and functional analysis of the type III sodium channel from human brain // *European journal of neuroscience*. – 2000. – Vol. 12. – № 12. – P. 4281–4289.
76. Chintapalli V.R., Wang J., Dow J.A. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease // *Nature genetics*. – 2007. – Vol. 39. – № 6. – P. 715–720.
77. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1. – № 2. – P. 581–585.
78. Chrachri A., Clarac F. Fictive locomotion in the fourth thoracic ganglion of the crayfish, *Procambarus clarkii* // *The journal of neuroscience*. – 1990. – Vol. 10. – № 3. – P. 707–719.
79. Chung Y.D., Zhu J., Han Y., Kernan M.J. *nompA* encodes a PNS-specific, ZP domain protein required to connect mechanosensory dendrites to sensory structures // *Neuron*. – 2001. – Vol. 29. – № 2. – P. 415–428.

80. Clegg J.S., Evans D.R. The physiology of blood trehalose and its function during flight in the blowfly // *Journal of experimental biology*. – 1961. – Vol. 38. – № 4. – P. 771–792.
81. Clyne J.D., Miesenböck G. Sex-specific control and tuning of the pattern generator for courtship song in *Drosophila* // *Cell*. – 2008. – Vol. 133. – № 2. – P. 354–363.
82. Collinge J.E., Anderson A.R., Weeks A.R., Johnson T.K., McKechnie S.W. Latitudinal and cold-tolerance variation associate with DNA repeat-number variation in the hsr-omega RNA gene of *Drosophila melanogaster* // *Heredity*. – 2008. – Vol. 101. – № 3. – P. 260–270.
83. Cooley L., Kelley R., Spradling A. Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements // *Science*. – 1988. – Vol. 239. – № 4844. – P. 1121–1128.
84. Cowley K.C., Schmidt B.J. Effects of inhibitory amino acid antagonists on reciprocal inhibitory interactions during rhythmic motor activity in the in vitro neonatal rat spinal cord // *Journal of neurophysiology*. – 1995. – Vol. 74. – № 3. – P. 1109–1117.
85. Crill W.E. Persistent sodium current in mammalian central neurons // *Annual Review of Physiology*. – 1996. – Vol. 58. – № 1. – P. 349–362.
86. Crowner D., Madden K., Goeke S., Giniger E. Lola regulates midline crossing of CNS axons in *Drosophila* // *Development*. – 2002. – Vol. 129. – № 6. – P. 1317–1325.
87. Cruse H. What mechanisms coordinate leg movement in walking arthropods? // *Trends in neurosciences*. – 1990. – Vol. 13. – № 1. – P. 15–21.
88. Culi J., Aroca P., Modolell J., Mann R.S. *jing* is required for wing development and to establish the proximo-distal axis of the leg in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 2006. – Vol. 173. – № 1. – P. 255–266.
89. Cunha P.M., Sandmann T., Gustafson E.H., Ciglar L., Eichenlaub M.P., Furlong E.E. Combinatorial binding leads to diverse regulatory responses: Lmd is a tissue-specific modulator of Mef2 activity [Электронный ресурс] // *PLoS Genetics*. – 2010. – Vol. 6. – № 7. – e1001014. – doi:10.1371/journal.pgen.1001014.

90. Cymbalyuk G.S., Gaudry Q., Masino M.A., Calabrese R.L. Bursting in leech heart interneurons: cell-autonomous and network-based mechanisms // *The Journal of neuroscience*. – 2002. – Vol. 22. – № 24. – P. 10580–10592.
91. Dal Santo P., Logan M.A., Chisholm A.D., Jorgensen E.M. The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans* // *Cell*. – 1999. – Vol. 98. – № 6. – P. 757–767.
92. Dale N., Gilday D. Regulation of rhythmic movements by purinergic neurotransmitters in frog embryos // *Nature*. – 1996. – Vol. 383. – № 6597. – P. 259–263.
93. Dale N., Kuenzi F.M. Ion channels and the control of swimming in the *Xenopus* embryo // *Progress in neurobiology*. – 1997. – Vol. 53. – № 6. – P. 729–756.
94. Davies H.G., Giorgini F., Fajardo M.A., Braun R.E. A sequence-specific RNA binding complex expressed in murine germ cells contains MSY2 and MSY4 // *Developmental biology*. – 2000. – Vol. 221. – № 1. – P. 87–100.
95. Del Negro C.A., Koshiya N., Butera R.J., Smith Jr., Smith Jr.C., Smith J.C. Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-Botzinger complex inspiratory neurons *in vitro* // *Journal of neurophysiology*. – 2002. – Vol. 88. – № 5. – P. 2242–2250.
96. Demir E., Dickson B.J. *fruitless* splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila* // *Cell*. – 2005. – Vol. 121. – № 5. – P. 785–794.
97. Dickinson P.S., Mecsas C., Marder E. Neuropeptide fusion of two motor-pattern generator circuits // *Nature*. – 1990. – Vol. 344. – № 6262. – P. 155–158.
98. Dierick H.A., Greenspan R.J. Molecular analysis of flies selected for aggressive behavior // *Nature genetics*. – 2006. – Vol. 38. – № 9. – P. 1023–1031.
99. Dietzl G., Chen D., Schnorrer F., Su K.C., Barinova Y., Fellner M., Gasser B., Kinsey K., Oppel S., Scheiblaue S., Couto A., Marra V., Keleman K., Dickson B.J. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila* // *Nature*. – 2007. – Vol. 448. – № 7150. – P. 151–156.
100. DiFrancesco D., Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP // *Nature*. – 1991. – Vol. 351. – № 6322. – P. 145–147.

101. Ditlevsen D.K., Povlsen G.K., Berezin V., Bock E. NCAM-induced intracellular signaling revisited // *Journal of neuroscience research*. – 2008. – Vol. 86. – № 4. – P. 727-743.
102. Do M.T.H., Bean B.P. Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: modulation by slow inactivation // *Neuron*. – 2003. – Vol. 39. – № 1. – P. 109–120.
103. Dobbelaere J., Josue F., Suijkerbuijk S., Baum B., Tapon N., Raff J. A genome-wide RNAi screen to dissect centriole duplication and centrosome maturation in *Drosophila* [Электронный ресурс] // *PLoS Biology*. – 2008. – Vol. 6. – № 9. – e224. – doi: 10.1371/journal.pbio.0060224.
104. Du S., Zhou J., Jia Y., Huang K. SelK is a novel ER stress-regulated protein and protects HepG2 cells from ER stress agent-induced apoptosis // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2010. – Vol. 502. – № 2. – P. 137-143.
105. Duffy J.B. GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife // *genesis*. – 2002. – Vol. 34. – № 1-2. – P. 1–15.
106. Dumstrei K., Wang F., Hartenstein V. Role of DE-cadherin in neuroblast proliferation, neural morphogenesis, and axon tract formation in *Drosophila* larval brain development // *The Journal of neuroscience*. – 2003. – Vol. 23. – № 8. – P. 3325–3335.
107. Dura J.-M. Taillebourg E., Preat T. The *Drosophila* learning and memory gene *linotte* encodes a putative receptor tyrosine kinase homologous to the human RYK gene product // *FEBS letters*. – 1995. – Vol. 370. – № 3. – P. 250–254.
108. Eanes W.F., Merritt T.J., Flowers J.M., Kumagai S., Sezgin E., Zhu C.T. Flux control and excess capacity in the enzymes of glycolysis and their relationship to flight metabolism in *Drosophila melanogaster* // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2006. – Vol. 103. – № 51. – P. 19413–19418.
109. Ellis L.L., Carney G.E. Socially-responsive gene expression in male *Drosophila melanogaster* is influenced by the sex of the interacting partner // *Genetics*. – 2010. – Vol. 187. – № 1. – P. 157–169.
110. Elson R.C., Selverston A.I. Mechanisms of gastric rhythm generation in the isolated stomatogastric ganglion of spiny lobsters: bursting pacemaker potentials,

synaptic interactions, and muscarinic modulation // Journal of Neurophysiology. – 1992. – Vol. 68. – № 3. – P. 890–907.

111. Enomoto A., Han J.M., Hsiao C.-F., Wu N., Chandler S.H. Participation of sodium currents in burst generation and control of membrane excitability in mesencephalic trigeminal neurons // Journal of neuroscience. – 2006. – Vol. 26. – № 13. – P. 3412–3422.

112. Ensembl [Электронный ресурс]. – ensembl.org.

113. Ewing A.W. The neuromuscular basis of courtship song in *Drosophila*: The role of the indirect flight muscles // Journal of comparative physiology. – 1977. – Vol. 119. – № 3. – P. 249–265.

114. Ewing A.W. The neuromuscular basis of courtship song in *Drosophila*: The role of the direct and axillary wing muscles // Journal of comparative physiology. – 1979a. – Vol. 130. – № 1. – P. 87–93.

115. Ewing A.W. The role of feedback during singing and flight in *Drosophila melanogaster* // Physiological entomology. – 1979b. – Vol. 4. – № 4. – P. 329–337.

116. Ewing A.W., Bennet-Clark H.C. The courtship songs of *Drosophila* // Behaviour. – 1968. – Vol. 31. – № 3/4. – P. 288–301.

117. Fan Y.-P., Horn E.M., Waldrop T.G. Biophysical characterization of rat caudal hypothalamic neurons: calcium channel contribution to excitability // Journal of neurophysiology. – 2000. – Vol. 84. – № 6. – P. 2896–2903.

118. Fang Y., Soares L., Bonini N.M. Design and implementation of *in vivo* imaging of neural injury responses in the adult *Drosophila* wing // Nature Protocols. – 2013. – Vol. 8. – № 4. – P. 810–819.

119. Fasano L., Roder L., Core N., Alexandre E., Vola C., Jacq B., Kerridge S. The gene teashirt is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs // Cell. – 1991. – Vol. 64. – № 1. – P. 63–79.

120. Feldman J.L., Del Negro C.A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm // Nature reviews neuroscience. – 2006. – Vol. 7. – № 3. – P. 232–241.

121. Fenelon V. S., Feuvre Y.L., Bem T., Meyrand P. Maturation of rhythmic neural network: role of central modulatory inputs // *Journal of physiology*. – 2003. – Vol. 97. – № 1. – P. 59-68.
122. Ferres-Marco D., Gutierrez-Garcia I., Vallejo D.M., Bolivar J., Gutierrez-Avino F.J., Dominguez M. Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by *Rb* silencing // *Nature*. – 2006. – Vol. 439. – № 7075. – P. 430–436.
123. Ferveur J.F., Störtkuhl K.F., Stocker R.F., Greenspan R.J. Genetic feminization of brain structures and changed sexual orientation in male *Drosophila* // *Science*. – 1995. – Vol. 267. – № 5199. – P. 902-905.
124. Feuvre Y.L., Fenelon V.S., Meyrand P. Central inputs mask multiple adult neural networks within a single embryonic network // *Nature*. – 1999. – Vol. 402. – № 6762. – P. 660-664.
125. Firth L.C., Baker N.E. Spitz from the retina regulates genes transcribed in the second mitotic wave, peripodial epithelium, glia and plasmatocytes of the *Drosophila* eye imaginal disc // *Developmental biology*. – 2007. – Vol. 307. – № 2. – P. 521– 538.
126. Flavell S.W., Cowan C.W., Kim T.K., Greer P.L., Lin Y., Paradis S., Griffith E.C., Hu L.S., Chen C., Greenberg M.E. Activity-dependent regulation of MEF2 transcription factors suppresses excitatory synapse number // *Science*. – 2006. – Vol. 311. – № 5763. – P. 1008-1012.
127. FLIGHT [Электронный ресурс]. – flight.icr.ac.uk.
128. FlyAtlas: the *Drosophila* gene expression atlas [Электронный ресурс]. – flyatlas.org.
129. FlyBase: A Database of *Drosophila* Genes and Genomes [Электронный ресурс]. – flybase.org.
130. Fore T.R., Ojwang A.A., Warner M.L., Peng X., Bohm R.A., Welch W.P., Goodnight L.K., Bao H., Zhang B. Mapping and application of enhancer-trap flippase expression in larval and adult *Drosophila* CNS [Электронный ресурс] // *Journal of visualized experiments*. – 2011. – № 52. – e2649. – doi: 10.3791/2649.

131. Fox L.E., Soll D.R., Wu C.-F. Coordination and modulation of locomotion pattern generators in *Drosophila* larvae: effects of altered biogenic amine levels by the tyramine beta hydroxlyase mutation // Journal of neuroscience. – 2006. – Vol. 26. – № 5. – P. 1486–1498.
132. Fradkin L.G., Dura J.-M., Noordermeer J.N. Ryks: new partners for Wnts in the developing and regenerating nervous system // Trends in neurosciences. – 2010. – Vol. 33. – № 2. – P. 84-92.
133. Gajewski K.M., Schulz R.A. CF2 represses actin 88F gene expression and maintains filament balance during indirect flight muscle development in *Drosophila* [Электронный ресурс] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. – № 5. – e10713. – doi:10.1371/journal.pone.0010713.
134. GenomeRNAi [Электронный ресурс]. – genomernai.dkfz.de.
135. Giniger E., Tietje K., Jan L.Y., Jan Y.N. *lola* encodes a putative transcription factor required for axon growth and guidance in *Drosophila* // Development. – 1994. – Vol. 120. – № 6. – P. 1385–1398.
136. Girardot F., Monnier V., Tricoire H. Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster* [Электронный ресурс] // BMC genomics. – 2004. – Vol. 5. – № 1. – 74. – doi:10.1186/1471-2164-5-74.
137. Goldin A.L., Barchi R.L., Caldwell J.H., Hofmann F., Howe J.R., Hunter J.C., Kallen R.G., Mandel G., Meisler M.H., Netter Y.B., Noda M., Tamkun M.M., Waxman S.G., Wood J.N., Catterall W.A. Nomenclature of voltage-gated sodium channels // Neuron. – 2000. – Vol. 28. – № 2. – P. 365–368.
138. Goldstein L.S., Laymon R.A., McIntosh J.R. A microtubule-associated protein in *Drosophila melanogaster*: identification, characterization, and isolation of coding sequences // The Journal of cell biology. – 1986. – Vol. 102. – № 6. – P. 2076–2087.
139. Gordon I.T., Whelan P.J. Deciphering the organization and modulation of spinal locomotor central pattern generators // Journal of experimental biology. – 2006. – Vol. 209. – № 11. – P. 2007–2014.

140. Gotz, K.G., Wenking H. Visual control of locomotion in the walking fruitfly *Drosophila* // Journal of comparative physiology. – 1973. – Vol. 85. – № 3. – P. 235–266.
141. Goulding M., Pfaff S.L. Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates // Current opinion in neurobiology. – 2005. – Vol. 15. – № 1. – P. 14–20.
142. Greene J.C., Whitworth A.J., Andrews L.A., Parker T.J., Pallanck L.J. Genetic and genomic studies of *Drosophila parkin* mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis // Human molecular genetics. – 2005. – Vol. 14. – № 6. – P. 799–811.
143. Grillner S., Deliagina T., Ekeberg O., ElManira A., Hill R.H., Lansner A., Orlovsky G.N., Wallen P. Neural networks that coordinate locomotion and body orientation in lamprey // Trends in neurosciences. – 1995. – Vol. 18. – № 6. – P. 270–279.
144. Grillner S., Wallén P., Hill R., Cangiano L., El Manira A. Ion channels of importance for the locomotor pattern generation in the lamprey brainstem-spinal cord // The Journal of physiology. – 2001. – Vol. 533. – № 1. – P. 23–30.
145. Grillner S. The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks // Nature reviews neuroscience. – 2003. – Vol. 4. – № 7. – P. 573–586.
146. Gruenewald C., Botella J.A., Bayersdorfer F., Navarro J.A., Schneuwly S. Hyperoxia-induced neurodegeneration as a tool to identify neuroprotective genes in *Drosophila melanogaster* // Free radical biology and medicine. – 2009. – Vol. 46. – № 12. – P. 1668–1676.
147. Hadar N., Yaron S., Oren Z., Elly O., Itamar W., Johnathan G., Tama D., Offer G. A screen identifying genes responsive to Dpp and Wg signaling in the *Drosophila* developing wing // Gene. – 2012. – Vol. 494. – № 1. – P. 65–72.
148. Hall J.C. Portions of the central nervous system controlling reproductive behavior in *Drosophila melanogaster* // Behavior genetics. – 1977. – Vol. 7. – № 4. – P. 291–312.

149. Han C., Belenkaya T.Y., Khodoun M., Tauchi M., Lin X., Lin X. Distinct and collaborative roles of *Drosophila* EXT family proteins in morphogen signalling and gradient formation // *Development*. – 2004. – Vol. 131. – № 7. – P. 1563–1575.
150. Han D.D., Stein D., Stevens L.M. Investigating the function of follicular subpopulations during *Drosophila* oogenesis through hormone-dependent enhancer-targeted cell ablation // *Development*. – 2000. – Vol. 127. – № 3. – P. 573–583.
151. Harbison S.T., Chang S., Kamdar K.P., Mackay T.F. Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila* [Электронный ресурс] // *Genome biology*. – 2005. – Vol. 6. – № 4. – R36. – doi:10.1186/gb-2005-6-4-r36.
152. Harris-Warrick R.M., Coniglio L.M., Levini R.M., Gueron S., Guckenheimer J. Dopamine modulation of two subthreshold currents produces phase shifts in activity of an identified motoneuron // *Journal of neurophysiology*. – 1995. – Vol. 74. – № 4. – P. 1404–1420.
153. Harris-Warrick R.M. General principles of rhythmogenesis in central pattern generator networks // *Progress in brain research*. – 2010. – Vol. 187. – P. 213–222.
154. Harris-Warrick R.M., Cohen A.H. Serotonin modulates the central pattern generator for locomotion in the isolated lamprey spinal cord // *Journal of experimental biology*. – 1985. – Vol. 116. – № 1. – P. 27–46.
155. Hartenstein V. Morphological diversity and development of glia in *Drosophila* // *Glia*. – 2011. – Vol. 59. – № 9. – P. 1237–1252.
156. Haussmann I.U., White K., Soller M. Erect wing regulates synaptic growth in *Drosophila* by integration of multiple signaling pathways [Электронный ресурс] // *Genome Biology*. – 2008. – Vol. 9. – № 4. – R73. – doi:10.1186/gb-2008-9-4-r73.
157. Hess D., Büschges A. Role of proprioceptive signals from an insect femur-tibia joint in patterning motoneuronal activity of an adjacent leg joint // *Journal of neurophysiology*. – 1999. – Vol. 81. – № 4. – P. 1856–1865.
158. Hinckley C.A. Electrical coupling between locomotor-related excitatory interneurons in the mammalian spinal cord // *Journal of neuroscience*. – 2006. – Vol. 26. – № 33. – P. 8477–8483.

159. Hochman S., Jordan L.M., MacDonald J.F. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated voltage oscillations in neurons surrounding the central canal in slices of rat spinal cord // *Journal of neurophysiology*. – 1994. – Vol. 72. – № 2. – P. 565–577.
160. Hofmann A., Br  nner M., Korge G. The winged-helix transcription factor JUMU is a haplo-suppressor/triplo-enhancer of PEV in various tissues but exhibits reverse PEV effects in the brain of *Drosophila melanogaster* // *Chromosome research*. – 2009. – Vol. 17. – № 3. – P. 347–358.2.
161. Honore E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1 // *Nature reviews. Neuroscience*. – 2007. – Vol. 8. – № 4. – P. 251–261.
162. Hooper S.L., Marder E. Modulation of the lobster pyloric rhythm by the peptide proctolin // *The Journal of neuroscience*. – 1987. – Vol. 7. – № 7. – P. 2097–2112.
163. Hooper S.L., Weaver A.L. Motor neuron activity is often insufficient to predict motor response // *Current opinion in neurobiology*. – 2000. – Vol. 10. – № 6. – P. 676–682.
164. Hovemann B., Walldorf U., Ryseck R.-P. Heat-shock locus 93D of *Drosophila melanogaster*: An RNA with limited coding capacity accumulates precursor transcripts after heat shock // *Molecular and general genetics MGG*. – 1986. – Vol. 204. – № 2. – P. 334–340.
165. Hoyt D.F., Taylor C.R. Gait and the energetics of locomotion in horses // *Nature*. – 1981. – Vol. 292. – P. 239–240.
166. Huang A.M., Rubin G.M. A misexpression screen identifies genes that can modulate RAS1 pathway signaling in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 2000. – Vol. 156. – № 3. – P. 1219–1230.
167. Huff J.L., Kingsley K.L., Miller J.M., Hoshizaki D.K. *Drosophila windpipe* codes for a leucine-rich repeat protein expressed in the developing trachea // *Mechanisms of development*. – 2002. – Vol. 111. – № 1. – P. 173–176.
168. Hurwitz I. Fast synaptic connections from CBIs to pattern-generating neurons in aplysia: initiation and modification of motor programs // *Journal of neurophysiology*. – 2002. – Vol. 89. – № 4. – P. 2120–2136.

169. Iijima-Ando K., Hearn S.A., Shenton C., Gatt A., Zhao L., Iijima K. Mitochondrial mislocalization underlies A β 42-induced neuronal dysfunction in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease [Электронный ресурс] // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4. – № 12. – e8310. – doi: 10.1371/journal.pone.0008310.
170. InterPro: protein sequence analysis and classification [Электронный ресурс]. – ebi.ac.uk/interpro.
171. Irminger-Finger I., Laymon R.A., L.S. Goldstein. Analysis of the primary sequence and microtubule-binding region of the *Drosophila* 205K MAP // The journal of cell biology. – 1990. – Vol. 111. – № 6. – P. 2563–2572.
172. Jackson A.C., Yao G.L., Bean B.P. Mechanism of spontaneous firing in dorsomedial suprachiasmatic nucleus neurons // Journal of neuroscience. – 2004. – Vol. 24. – № 37. – P. 7985–7998.
173. Jain A.K., Murty M.N., Flynn P.J. Data clustering: a review // ACM computing surveys (CSUR). – 1999. – Vol. 31. – № 3. – P. 264–323.
174. Jiang W., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone // Journal of biological chemistry. – 1997. – Vol. 272. – № 1. – P. 196–202.
175. Jinno S., Ishizuka S., Kosaka T. Ionic currents underlying rhythmic bursting of ventral mossy cells in the developing mouse dentate gyrus // European journal of neuroscience. – 2003. – Vol. 17. – № 7. – P. 1338–1354.
176. Johnson B.R., Peck J.H., Harris-Warrick R.M. Distributed amine modulation of graded chemical transmission in the pyloric network of the lobster stomatogastric ganglion // Journal of neurophysiology. – 1995. – Vol. 74. – № 1. – P. 437–452.
177. Johnson B.R. Dopamine Modulation of calcium currents in pyloric neurons of the lobster stomatogastric ganglion // Journal of neurophysiology. – 2003. – Vol. 90. – № 2. – P. 631–643.
178. Ju T., Cummings R.D. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 β 3-galactosyltransferase // Proceedings of the national academy of sciences. – 2002. – Vol. 99. – № 26. – P. 16613–16618.

179. Kadiri L.R., Kwan A.C., Webb W.W., Harris-Warrick R.M. Dopamine-induced oscillations of the pyloric pacemaker neuron rely on release of calcium from intracellular stores // *Journal of neurophysiology*. – 2011. – Vol. 106. – № 3. – P. 1288–1298.
180. Katso R.M., Russell R.B., Ganesan T.S. Functional analysis of H-Ryk, an atypical member of the receptor tyrosine kinase family // *Molecular and cellular biology*. – 1999. – Vol. 19. – № 9. – P. 6427–6440.
181. Katz P.S. *Tritonia* swim network [Электронный ресурс] // *Scholarpedia*. – 2009. – Vol. 4. – № 5. – 3638. – doi:10.4249/scholarpedia.3638.
182. Kelly K.K., Meadows S.M., Cripps R.M. *Drosophila* MEF2 is a direct regulator of *Actin57B* transcription in cardiac, skeletal, and visceral muscle lineages // *Mechanisms of development*. – 2002. – Vol. 110. – № 1. – P. 39–50.
183. Khaliq Z.M., Bean B.P. Pacemaking in dopaminergic ventral tegmental area neurons: depolarizing drive from background and voltage-dependent sodium conductances // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30. – № 21. – P. 7401–7413.
184. Khaliq Z.M., Gouwens N.W., Raman I.M. The contribution of resurgent sodium current to high-frequency firing in Purkinje neurons: an experimental and modeling study // *The Journal of neuroscience*. – 2003. – Vol. 23. – № 12. – P. 4899–4912.
185. Khanna M.R., Stanley B.A., Thomas G.H. Towards a membrane proteome in *Drosophila*: a method for the isolation of plasma membrane [Электронный ресурс] // *BMC genomics*. – 2010. – Vol. 11. – № 1. – 302. – doi: 10.1186/1471-2164-11-302.
186. Kiehn O. Development and functional organization of spinal locomotor circuits // *Current opinion in neurobiology*. – 2011. – Vol. 21. – № 1. – P. 100–109.
187. Kiehn O. Plateau potentials and active integration in the “final common pathway” for motor behavior // *Trends in neurosciences*. – 1991. – Vol. 14. – № 2. – P. 68–73.
188. Kiehn O., Butt S.J.B. Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord // *Progress in neurobiology*. – 2003. – Vol. 70. – № 4. – P. 347–361.

189. Kim Y.I., Chandler S.H. NMDA-induced burst discharge in guinea pig trigeminal motoneurons *in vitro* // Journal of neurophysiology. – 1995. – Vol.74. – № 1. – P. 334-346.
190. Kimble M., Khodjakov A.L., Kuriyama R. Identification of ubiquitous high-molecular-mass, heat-stable microtubule-associated proteins (MAPs) that are related to the *Drosophila* 205-kDa MAP but are not related to the mammalian MAP-4 // Proceedings of the national academy of sciences. – 1992. – Vol. 89. – № 16. – P. 7693–7697.
191. Kjaerulff O., Kiehn O. Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord *in vitro*: a lesion study // The Journal of neuroscience. – 1996. – Vol. 16. – № 18. – P. 5777–5794.
192. Klattenhoff C., Xi H., Li C., Lee S., Xu J., Khurana J.S., Zhang F., Schultz N., Koppetsch B.S., Nowosielska A., Seitz H., Zamore P.D., Weng Z., Theurkauf W.E. The *Drosophila* HP1 homolog rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters // Cell. – 2009. – Vol. 138. – № 6. – P. 1137–1149.
193. Koizumi H., Smith J.C. Persistent Na⁺ and K⁺-dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex *in vitro* // Journal of neuroscience. – 2008. – Vol. 28. – № 7. – P. 1773–1785.
194. Koles K., Lim J.M., Aoki K., Porterfield M., Tiemeyer M., Wells L., Panin V. Identification of N-glycosylated proteins from the central nervous system of *Drosophila melanogaster* // Glycobiology. – 2007. – Vol. 17. – № 12. – P. 1388–1403.
195. Konishi H., Okuda A., Ohno Y., Kihara A. Characterization of HACD1 K64Q mutant found in arrhythmogenic right ventricular dysplasia patients // Journal of biochemistry. – 2010. – Vol. 148. – № 5. – P. 617–622.
196. Kramer J.M., Staveley B.E. GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster* // Genetics and Molecular Research. – 2003. – Vol. 2. – № 1. – P. 43–47.
197. Kremer E., Lev-Tov A. Localization of the spinal network associated with generation of hindlimb locomotion in the neonatal rat and organization of its transverse

coupling system // Journal of neurophysiology. – 1997. – Vol. 77. – № 3. – P. 1155–1170.

198. Krieger P., Hellgren-Kotaleski J., Kettunen P., El Manira A.J. Interaction between metabotropic and ionotropic glutamate receptors regulates neuronal network activity // The Journal of neuroscience. – 2000. – Vol. 20. – № 14. – P. 5382–5391.

199. Krishnan K.S., Nash H.A. A genetic study of the anesthetic response: mutants of *Drosophila melanogaster* altered in sensitivity to halothane // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1990. – Vol. 87. – № 21. – P. 8632–8636.

200. Krupp J.J., Yaich L.E., Wessells R.J., Bodmer R. Identification of genetic loci that interact with *cut* during *Drosophila* wing-margin development // Genetics. – 2005. – Vol. 170. – № 4. – P. 1775–1795.

201. Kulahin N., Walmod P.S. The neural cell adhesion molecule NCAM2/OCAM/RNCAM, a close relative to NCAM // Structure and function of the neural cell adhesion molecule NCAM, edited by V. Berezin. – New York: Springer New York, 2010. – Vol. 663. – P. 403–420.

202. Kurusu M., Cording A., Taniguchi M., Menon K., Suzuki E., Zinn K. A screen of cell-surface molecules identifies leucine-rich repeat proteins as key mediators of synaptic target selection // Neuron. – 2008. – Vol. 59. – № 6. – P. 972–985.

203. Laayouni H., Garcia-Franco F., Chavez-Sandoval B.E., Trotta V., Beltran S., Corominas M., Santos M. Thermal evolution of gene expression profiles in *Drosophila subobscura* [Электронный ресурс] // BMC evolutionary biology. – 2007. – Vol. 7. – № 1. – P. 42. – doi:10.1186/1471-2148-7-42.

204. Lakhotia S.C., Ray P., Rajendra T.K., Prasanth K.V. The non-coding transcripts of hsr-omega gene in *Drosophila*: Do they regulate trafficking and availability of nuclear RNA-processing factors? // Current science. – 1999. – Vol. 77. – P. 553–563.

205. Landis G., Bhole D., Lu L., Tower J. High-frequency generation of conditional mutations affecting *Drosophila melanogaster* development and life span // Genetics. – 2001. – Vol. 158. – № 3. – P. 1167–1176.

206. Lear B.C., Lin J.-M., Keath J.R., McGill J.J., Raman I.M., Allada R. The ion channel narrow abdomen is critical for neural output of the *Drosophila* circadian pacemaker // *Neuron*. – 2005. – Vol. 48. – № 6. – P. 965–976.
207. Lee G., Foss M., Goodwin S.F., Carlo T., Taylor B.J., Hall J.C. Spatial, temporal, and sexually dimorphic expression patterns of the *fruitless* gene in the *Drosophila* central nervous system // *Journal of neurobiology*. – 2000. – Vol. 43. – № 4. – P. 404–426.
208. Lehmann F.-O. Aerial locomotion in flies and robots: kinematic control and aerodynamics of oscillating wings // *Arthropod structure and development*. – 2004. – Vol. 33. – № 3. – P. 331–345.
209. Lehmann F.O., Gotz K.G. Activation phase ensures kinematic efficacy in flight-steering muscles of *Drosophila melanogaster* // *Journal of comparative physiology A*. – 1996. – Vol. 179. – № 3. – P. 311–322.
210. LeMasson G., Marder E., Abbott L.F. Activity-dependent regulation of conductances in model neurons // *Science*. 1993. – Vol. 259. – № 5103. P. 1915–1917.
211. Lettice L.A., Horikoshi T., Heaney S.J., van Baren M.J., van der Linde H.C., Breedveld G.J., Joosse M., Akarsu N., Oostra B.A., Endo N., Shibata M., Suzuki M., Takahashi E., Shinka T., Nakahori Y., Ayusawa D., Nakabayashi K., Scherer S.W., Heutink P., Hill R.E., Noji S. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2002. – Vol. 99. – № 11. – P. 7548–7553.
212. Levine J. Properties of the nervous system controlling flight in *Drosophila melanogaster* // *Journal of comparative physiology*. – 1973. – Vol. 84. – № 2. – P. 129–166.
213. Liebl F.L., Wu Y., Featherstone D.E., Noordermeer J.N., Fradkin L., Hing H. Derailed regulates development of the *Drosophila* neuromuscular junction // *Developmental neurobiology*. – 2008. – Vol. 68. – № 2. – P. 152–165.
214. Lilly B., Galewsky S., Firulli A.B., Schulz R.A., Olson E.N. D-MEF2: a MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell

lineages during *Drosophila* embryogenesis // Proceedings of the national academy of sciences. – 1994. – Vol. 91. – № 12. – P. 5662–5666.

215. Lin X., Yang X., Li Q., Ma Y., Cui S., He D., Lin X., Schwartz R.J., Chang J. Protein tyrosine phosphatase-like a regulates myoblast proliferation and differentiation through MyoG and the cell cycling signaling pathway // Molecular and cellular biology. – 2012. – Vol. 32. – № 2. – P. 297–308.

216. Lin Y.-R., Reddy B.V.V.G., Irvine K.D. Requirement for a core 1 galactosyltransferase in the *Drosophila* nervous system // Developmental dynamics. – 2008. – Vol. 237. – № 12. – P. 3703–3714.

217. Littleton J.T., Ganetzky B. Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome // Neuron. – 2000. – Vol. 26. – № 1. – P. 35–43.

218. Liu Z., Golowasch J., Marder E., Abbott L.F. A model neuron with activity-dependent conductances regulated by multiple calcium sensors // The Journal of neuroscience. – 1998. – Vol. 18. – № 7. – P. 2309–2320.

219. Liu Y., Lehmann M. A genomic response to the yeast transcription factor GAL4 in *Drosophila* // Fly. – 2008. – Vol. 2. – № 2. – P. 92–98.

220. Liu Y., Montell D.J. *Jing*: a downstream target of *slbo* required for developmental control of border cell migration // Development. – 2001. – Vol. 128. – № 3. – P. 321–330.

221. Lu T.Z., Feng Z.-P. A Sodium leak current regulates pacemaker activity of adult central pattern generator neurons in *lymnaea stagnalis* [Электронный ресурс] // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – № 4. – e18745. – doi:10.1371/journal.pone.0018745.

222. Lu T.Z., Feng Z.-P. NALCN: A regulator of pacemaker activity // Molecular neurobiology. – 2012. – Vol. 45. – № 3. – P. 415–423.

223. Luo L., Liao Y.J., Jan L.Y., Jan Y.N. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion // Genes and Development. – 1994. – Vol. 8. – № 15. – P. 1787–1802.

224. Luo L.Q., Martin-Morris L.E., White K. Identification, secretion, and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor // The Journal of neuroscience. – 1990. – Vol. 10. – № 12. – P. 3849–3861.

225. Luther J.A., Robie A.A., Yarotsky J., Reina C., Marder E., Golowasch J. Episodic bouts of activity accompany recovery of rhythmic output by a neuromodulator- and activity-deprived adult neural network // Journal of neurophysiology. – 2003. – Vol. 90. – № 4. – P. 2720-2730.
226. MacLean J.N., Zhang Y., Goeritz M.L., Casey R., Oliva R., Guckenheimer J., Harris-Warrick R.M. Activity-independent coregulation of I_A and I_h in rhythmically active neurons // Journal of neurophysiology. – 2005. – Vol. 94. – № 5. – P. 3601–3617.
227. MacLean J.N., Zhang Y., Johnson B.R., Harris-Warrick R.M. Activity-independent homeostasis in rhythmically active neurons // Neuron. – 2003. – Vol. 37. – № 1. – P. 109–120.
228. Madden K., Crowner D., Giniger E. LOLA has the properties of a master regulator of axon-target interaction for SNb motor axons of *Drosophila*. Developmental biology. – 1999. – Vol. 213. – № 2. – P. 301–313.
229. Maimon G., Straw A.D., Dickinson M.H. Active flight increases the gain of visual motion processing in *Drosophila* // Nature neuroscience. – 2010. – Vol. 13. – № 3. – P. 393–399.
230. Mallik M., Lakhotia S.C. RNAi for the large non-coding hsromega transcripts suppresses polyglutamine pathogenesis in *Drosophila* models // RNA Biology. – 2009. – Vol. 6. – № 4. – P. 464-478.
231. Mallik M., Lakhotia S.C. Improved activities of CREB binding protein, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and proteasome following downregulation of noncoding hsr transcripts help suppress poly(Q) pathogenesis in fly models // Genetics. – 2010. – Vol. 184. – № 4. – P. 927–945.
232. Mangoni M.E., Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity // Physiological reviews. – 2008. – Vol. 88. – № 3. – P. 919–982.
233. Manoli D.S., Foss M., Villella A., Taylor B.J., Hall J.C., Baker B.S. Male-specific *fruitless* specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour // Nature. – 2005. – Vol. 436. – № 7049. – P. 395–400.

234. Mansfield J.H., Wilhelm J.E., Hazelrigg T. Ypsilon Schachtel, a *Drosophila* Y-box protein, acts antagonistically to Orb in the oskar mRNA localization and translation pathway // *Development*. – 2002. – Vol. 129. – № 1. – P. 197–209.
235. Mantegazza M., Yu F.H., Powell A.J., Clare J.J., Catterall W.A., Scheuer T. Molecular determinants for modulation of persistent sodium current by G-protein subunits // *Journal of neuroscience*. – 2005. – Vol. 25. – № 13. – P. 3341–3349.
236. Maranto A.R., Calabrese R.L. Neural control of the hearts in the leech, *Hirudo medicinalis* // *Journal of comparative physiology A*. – 1984. – Vol. 154. – № 3. – P. 367–380.
237. Marder E., Bucher D. Central pattern generators and the control of rhythmic movements // *Current biology*. – 2001. – Vol. 11. – № 23. – P. R986–R996.
238. Marder E., Bucher D., Schulz D.J., Taylor A.L. Invertebrate central pattern generation moves along // *Current Biology*. – 2005. – Vol. 15. – № 17. – P. R685–R699.
239. Marder E., Calabrese R.L. Principles of rhythmic motor pattern generation // *Physiological reviews*. – 1996. – Vol. 76. – P. 687–717.
240. Marder E. Bucher D. Understanding circuit dynamics using the stomatogastric nervous system of lobsters and crabs // *Annual review of physiology*. – 2007. – Vol. 69. – № 1. – P. 291–316.
241. Marder E., Bucher D. Understanding circuit dynamics using the stomatogastric nervous system of lobsters and crabs // *Annual review of physiology*. – 2007. – Vol. 69. – № 1. – P. 291–316.
242. Martin J.-R., Ernst R., Heisenberg M. Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster* // *Learning and memory*. – 1998. – Vol. 5. – № 1. – P. 179–191.
243. Martin J.-R., Ernst R., Heisenberg M. Temporal pattern of locomotor activity in *Drosophila melanogaster* // *Journal of comparative physiology A*. – 1999. – Vol. 184. – № 1. – P. 73–84.

244. Martin S.G. The identification of novel genes required for *Drosophila* anteroposterior axis formation in a germline clone screen using GFP-Staufen // Development. – 2003. – Vol. 130. – № 17. – P. 4201–4215.
245. Martin-Romero F.J. Selenium Metabolism in *Drosophila*. Selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality // Journal of biological chemistry. – 2001. – Vol. 276. – № 32. – P. 29798–29804.
246. Matsumoto K., Meric F., Wolffe A.P. Translational repression dependent on the interaction of the *Xenopus* Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition // Journal of biological chemistry. – 1996. – Vol. 271. – № 37. – P. 22706–22712.
247. Matsumoto K., Wolffe A.P. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation // Trends in cell biology. – 1998. – Vol. 8. – № 8. – P. 318–323.
248. Matsushima T., Tegnér J., Hill R.H., Grillner S. GABA_B receptor activation causes a depression of low- and high-voltage-activated Ca²⁺ currents, postinhibitory rebound, and postspike afterhyperpolarization in lamprey neurons // Journal of neurophysiology. – 1993. – Vol. 70. – № 6. – P. 2606–2619.
249. Maurice N., Tkatch T., Meisler M., Sprunger L.K., Surmeier D.J. D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons // The Journal of neuroscience. – 2001. – Vol. 21. – № 7. – P. 2268–2277.
250. Mellert D.J., Knapp J.M., Manoli D.S., Meissner G.W., Baker B.S. Midline crossing by gustatory receptor neuron axons is regulated by *fruitless*, *doublesex* and the Roundabout receptors // Development. – 2010. – Vol. 137. – № 2. – P. 323–332.
251. Mendes C.S., Bartos I., Akay T., Marka S., Mann R.S. Quantification of gait parameters in freely walking wild type and sensory deprived *Drosophila melanogaster* [Электронный ресурс] // eLife. – 2013. – Vol. 2013. – № 2. – e00231. – doi: 10.7554/eLife.00231
252. Mensch J., Lavagnino N., Carreira V.P., Massaldi A., Hasson E., Fanara J.J. Identifying candidate genes affecting developmental time in *Drosophila*

melanogaster: pervasive pleiotropy and gene-by-environment interaction [Электронный ресурс] // BMC developmental biology. – 2008. – Vol. 8. – 78. – doi: 10.1186/1471-213X-8-78.

253. Meyrand P., Simmers J., Moulins M. Dynamic construction of a neural network from multiple pattern generators in the lobster stomatogastric nervous system // The Journal of neuroscience. – 1994. – Vol. 14. – № 2. – P. 630–644.

254. Michel C.I., Kraft R., Restifo L.L. Defective neuronal development in the mushroom bodies of *Drosophila fragile x mental retardation 1* mutants // Journal of neuroscience. – 2004. – Vol. 24. – № 25. – P. 5798–5809.

255. Mindorff E.N., O'Keefe D.D., Labbe A., Yang J.P., Ou Y., Yoshikawa S., van Meyel D.J. A Gain-of-function screen for genes that influence axon guidance identifies the NF- κ B protein dorsal and reveals a requirement for the kinase Pelle in *Drosophila* photoreceptor axon targeting // Genetics. – 2007. – Vol. 176. – № 4. – P. 2247–2263.

256. Molotova-Besedina N.G., Iliadi N.N., Bragina Iu.V., Kamysheva E.A., Soboleva S.A., Iliadi K.G., Kamyshev N.G. Novel memory mutants in *Drosophila*: behavioral characteristics of the P-insertional mutant *Ent2* P124 // Russian journal of genetics. – 2009. – Vol. 45. – № 1. – P. 41–48.

257. Monteggia L.M., Eisch A.J., Tang M.D., Kaczmarek L.K., Nestler E.J. Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain // Molecular brain research. – 2000. – Vol. 81. – № 1. – P. 129–139.

258. Moran C.N., Kyriacou C.P. Functional neurogenomics of the courtship song of male *Drosophila melanogaster* // Cortex. – 2009. – Vol. 45. – № 1. – P. 18–34.

259. Moran C.N., Kyriacou C.P. Functional neurogenomics of the courtship song of male *Drosophila melanogaster* // Cortex. – 2009. – Vol. 45. – № 1. – P. 18–34.

260. Moreau-Fauvarque C., Taillebourg E., Boissoneau E., Mesnard J., Dura J.M. The receptor tyrosine kinase gene *linotte* is required for neuronal pathway selection in the *Drosophila* mushroom bodies // Mechanisms of development. – 1998. – Vol. 78. – № 1. – P. 47–61.

261. Morgan P.T., Jing J., Vilim F.S., Weiss K.R. Interneuronal and peptidergic control of motor pattern switching in *Aplysia* // Journal of neurophysiology. – 2002. – Vol. 87. – № 1. – P. 49–61.
262. Morozova N., Forry E.P., Shahid E., Zavacki A.M., Harney J.W., Kraytsberg Y., Berry M.J. Antioxidant function of a novel selenoprotein in *Drosophila melanogaster* // Genes to Cells. – 2003. – Vol. 8. – № 12. – P. 963–971.
263. Muller R., Hulsmeier A.J., Altmann F., Hagen K.T, Tiemeyer M., Hennet T. Characterization of mucin-type core-1 beta1-3 galactosyltransferase homologous enzymes in *Drosophila melanogaster* // FEBS Journal. – 2005. – Vol. 272. – № 17. – P. 4295–4305.
264. Mummery-Widmer J.L., Yamazaki M., Stoeger T., Novatchkova M., Bhalerao S., Chen D., Dietzl G., Dickson B.J., Knoblich J.A. Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi // Nature. – 2009. – Vol. 458. – № 7241. – P. 987–992.
265. Nash H.A., Scott R.L., Lear B.C., Allada R. An Unusual cation channel mediates photic control of locomotion in *Drosophila* // Current biology. – 2002. – Vol. 12. – № 24. – P. 2152–2158.
266. Nassel D.R. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones // Progress in neurobiology. – 2002. – Vol. 68. – № 1. – P. 1–84.
267. NCBI/ BLAST Home [Электронный ресурс]. – blast.ncbi.nlm.nih.gov.
268. Newby L.M., Jackson F.R. A new biological rhythm mutant of *Drosophila melanogaster* that identifies a gene with an essential embryonic function // Genetics. – 1993. – Vol. 135. – № 4. – P. 1077–1090.
269. Nguyen H.T., Bodmer R., Abmayr S.M., McDermott J.C., Spoerel N.A. *D-mef2*: a *Drosophila* mesoderm-specific MADS box-containing gene with a biphasic expression profile during embryogenesis // Proceedings of the national academy of sciences. – 1994. – Vol. 91. – № 16. – P. 7520–7524.

270. Nishimaru H., Kudo N. Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse // Brain Research Bulletin. – 2000. – Vol. 53 – №5. – P. 661– 669.

271. Notomi T., Shigemoto R. Immunohistochemical localization of I_h channel subunits, HCN1-4, in the rat brain // The Journal of comparative neurology. – 2004. – Vol. 471. – № 3. – P. 241–276.

272. Novoselov S.V., Kryukov G.V., Xu X.M., Carlson B.A., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern // Journal of biological chemistry. – 2006. – Vol. 282. – № 16. – P. 11960–11968.

273. Nusbaum M.P., Blitz D.M., Swensen A.M., Wood D., Marder E. The roles of co-transmission in neural network modulation // Trends in neurosciences. – 2001. – Vol. 24. – № 3. – P. 146–154.

274. Nusbaum M.P., Marder E. A modulatory proctolin-containing neuron (MPN). I. Identification and characterization // The Journal of neuroscience. – 1989. – Vol. 9. – № 5. – P. 1591–1599.

275. Nwaka S., Holzer H. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Progress in nucleic acid research and molecular biology. – 1998. – Vol. 58. – P. 197-237.

276. Ohsako T., Horiuchi T., Matsuo T., Komaya S., Aigaki T. *Drosophila lola* encodes a family of BTB-transcription regulators with highly variable C-terminal domains containing zinc finger motifs // Gene. – 2003. – Vol. 311. – P. 59–69.

277. Ohta Y., Grillner S. Monosynaptic excitatory amino acid transmission from the posterior rhombencephalic reticular nucleus to spinal neurons involved in the control of locomotion in lamprey // Journal of neurophysiology. – 1989. – Vol. 62. – № 5. P. 1079– 1089.

278. Olypher A., Cymbalyuk G., Calabrese R.L. Hybrid systems analysis of the control of burst duration by low-voltage-activated calcium current in leech heart interneurons // Journal of neurophysiology. – 2006. – Vol. 96. – № 6. – P. 2857– 2867.

279. Onimaru H. Studies of the respiratory center using isolated brainstem-spinal cord preparations // *Neuroscience research*. – 1995. – Vol. 21. – № 3. – P. 183–190.

280. Onimaru H., Arata A., Homma I. Intrinsic burst generation of preinspiratory neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats // *Experimental brain research*. – 1995. – Vol. 106. – № 1. – P. 57–68.

281. Owczarek S., Kristiansen L.V., Hortsch M., Walmod P.S. Cell adhesion molecules of the NCAM family and their roles at synapses // *The Sticky synapse*, edited by V. H. Umemori, M. Hortsch. – New York: Springer New York, 2009. – P. 265–299.

282. Paige Bass B., Cullen K., McCall K. The axon guidance gene *lola* is required for programmed cell death in the *Drosophila* ovary // *Developmental biology*. – 2007. – Vol. 304. – № 2. – P. 771–785.

283. Panchin Y.V., Arshavsky Y.I., Deliagina T.G., Orlovsky G.N., Popova L.B., Selverston A.I. Control of locomotion in the marine mollusc *Clione limacina*. XI. Effects of serotonin // *Experimental brain research*. – 1996. – Vol. 109. – № 2. – P. 361–365.

284. Panchin Y.V., Sadreev R.I., Arshavsky Y.I. Control of locomotion in marine mollusc *Clione limacina*. X. Effects of acetylcholine antagonists // *Experimental brain research*. – 1995. – Vol. 106. – № 1. – P. 135–144.

285. Panee J., Stoytcheva Z.R., Liu W., Berry M.J. Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification // *Journal of biological chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 33. – P. 23759–23765.

286. Park J.H., Schroeder A.J., Helfrich-Förster C., Jackson F.R., Ewer J. Targeted ablation of CCAP neuropeptide-containing neurons of *Drosophila* causes specific defects in execution and circadian timing of ecdysis behavior // *Development*. – 2003. – Vol. 130. – № 12. – P. 2645–2656.

287. Parker D. Presynaptic and interactive peptidergic modulation of reticulospinal synaptic inputs in the lamprey // *Journal of neurophysiology*. – 2000. – Vol. 83. – № 5. – P. 2497–2507.
288. Parker D., Grillner S. Activity-dependent metaplasticity of inhibitory and excitatory synaptic transmission in the lamprey spinal cord locomotor network // *The Journal of neuroscience*. – 1999. – Vol. 19. – № 5. – P. 1647–1656.
289. Parker D., Grillner S. The activity-dependent plasticity of segmental and intersegmental synaptic connections in the lamprey spinal cord // *European journal of neuroscience*. – 2000. – Vol. 12. – № 6. – P. 2135–2146.
290. Parker D., Zhang W., Grillner S. Substance P modulates NMDA responses and causes long-term protein synthesis-dependent modulation of the lamprey locomotor network // *The Journal of neuroscience*. – 1998. – Vol. 18. – № 12. – P. 4800–4813.
291. Parrish J.Z., Emoto K., Jan L.Y., Jan Y.N. Polycomb genes interact with the tumor suppressor genes *hippo* and *warts* in the maintenance of *Drosophila* sensory neuron dendrites // *Genes and development*. – 2007. – Vol. 21. – № 8. – P. 956–972.
292. Pasquale E.D., Tell F., Monteau R., Hilaire G. Perinatal developmental changes in respiratory activity of medullary and spinal neurons: an in vitro study on fetal and newborn rats // *Developmental brain research*. – 1996. – Vol. 91 – № 1. – P. 121–130.
293. Pastink A., Heemskerk E., Nivard M.J., van Vliet C.J., Vogel E.W. Mutational specificity of ethyl methanesulfonate in excision-repair-proficient and-deficient strains of *Drosophila melanogaster* // *Molecular and general genetics: MGG*. – 1991. – Vol. 229. – № 2. – P. 213–218.
294. Pearson K.G. Neural adaptation in the generation of rhythmic behavior // *Annual review of physiology*. – 2000. – Vol. 62. – № 1. – P. 723–753.
295. Peck J.H., Gaier E., Stevens E., Repicky S., Harris-Warrick R.M. Amine modulation of the transient potassium current in identified cells of the lobster stomatogastric ganglion // *Journal of neurophysiology*. – 2001. – Vol. 86. – № 6. – P. 2957–2965.

296. Peck J.H., Nakanishi S.T., Yaple R., Harris-Warrick R.M. Amine modulation of the transient potassium current in identified cells of the lobster stomatogastric ganglion // *Journal of neurophysiology*. – 2001. – Vol. 86. – № 6. – P. 2957–2965.
297. Peck J.H., Nakanishi S.T., Yaple R., Harris-Warrick R.M. Amine modulation of I_h in a small neural network // *Journal of neurophysiology*. – 2006. – Vol. 96. – № 6. – P. 2931–2940.
298. Peixoto A.A, Hall J.C. Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of *Drosophila* // *Genetics*. – 1998. – Vol. 148. – № 2. – P. 827–838.
299. Pele M. SINE exonic insertion in the *PTPLA* gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs // *Human molecular genetics*. – 2005. – Vol. 14. – № 11. – P. 1417–1427.
300. Pena F. Ramirez J.-M. Substance P-mediated modulation of pacemaker properties in the mammalian respiratory network // *Journal of neuroscience*. – 2004. – Vol. 24. – № 34. – P. 7549–7556.
301. Peña F., Ramirez J.-M. Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation *in vitro* // *The Journal of neuroscience*. – 2002. – Vol. 22. – № 24. – P. 11055–11064.
302. Pereira A., Doshen J., Tanaka E., Goldstein L.S. Genetic analysis of a *Drosophila* microtubule-associated protein // *The journal of cell biology*. – 1992. – Vol. 116. – № 2. – P. 377–383.
303. Perez M.F., White F.J., Hu X.-T. Dopamine D₂ receptor modulation of K⁺ channel activity regulates excitability of nucleus accumbens neurons at different membrane potentials // *Journal of neurophysiology*. – 2006. – Vol. 96. – № 5. – P. 2217–2228.
304. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels // *Physiological reviews*. – 2003. – Vol. 83. – № 1. – P. 117–161.

305. Perrins R., Soffe S.R. Local effects of glycinergic inhibition in the spinal cord motor systems for swimming in amphibian embryos // *Journal of neurophysiology*. – 1996. – Vol. 76. – № 2. – P. 1025–1035.
306. Pfaffl M.W., Horgan G.W., L. Dempfle. Relative expression software tool (REST\copyright) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR [Электронный ресурс] // *Nucleic acids research*. – 2002. – Vol. 30. – № 9. – e36. – doi: 10.1093/nar/30.9.e36.
307. Phadtare S., Alsina J., Inouye M. Cold-shock response and cold-shock proteins // *Current opinion in microbiology*. – 1999. – Vol. 2. – № 2. – P. 175–180.
308. Ping Y., Waro G., Licursi A., Smith S., Vo-Ba D.A., Tsunoda S. Shal/K_v4 channels are required for maintaining excitability during repetitive firing and normal locomotion in *Drosophila* [Электронный ресурс] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 1. – e16043. – doi: 10.1371/journal.pone.0016043.
309. Poeck B., Triphan T., Neuser K., Strauss R. Locomotor control by the central complex in *Drosophila*—An analysis of the *tay bridge* mutant / // *Developmental neurobiology*. – 2008. – Vol. 68. – № 8. – P. 1046–1058.
310. Poeck B., Triphan T., Neuser K., Strauss R. Locomotor control by the central complex in *Drosophila*—An analysis of the *tay bridge* mutant / // *Developmental neurobiology*. – 2008. – Vol. 68. – № 8. – P. 1046–1058.
311. Puopolo M., Raviola E., Bean B.P. Roles of subthreshold calcium current and sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons // *Journal of neuroscience*. – 2007. – Vol. 27. – № 3. – P. 645–656.
312. Quinlan E.M., Murphy A.D. Plasticity in the multifunctional buccal central pattern generator of *Helisoma* illuminated by the identification of phase 3 interneurons // *Journal of neurophysiology*. – 1996– Vol. 75 – № 2 – P. 561–574.
313. Raman I.M., Sprunger L.K., Meisler M.H., Bean B.P. Altered subthreshold sodium currents and disrupted firing patterns in Purkinje neurons of *Scn8a* mutant mice // *Neuron*. – 1997. – Vol. 19. – № 4. – P. 881–891.

314. Raman I.M., Bean B.P. Inactivation and recovery of sodium currents in cerebellar Purkinje neurons: evidence for two mechanisms // *Biophysical journal*. – 2001. – Vol. 80. – № 2. – P. 729–737.
315. Ramirez J.-M., Richter D.W. The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation // *Current opinion in neurobiology*. – 1996. – Vol. 6. – № 6. – P. 817–825.
316. Ramirez J.-M., Tryba A.K., Peña F. Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view // *Current opinion in neurobiology*. – 2004. – Vol. 14. – № 6. – P. 665–674.
317. Read R.D., Cavenee W.K., Furnari F.B., Thomas J.B. A *Drosophila* model for EGFR-Ras and PI3K-dependent human glioma [Электронный ресурс] // *PLoS Genetics*. – 2009. – Vol. 5. – № 2. – e1000374. – doi: 10.1371/journal.pgen.1000374.
318. Rebay I., Chen F., Hsiao F., Kolodziej P.A., Kuang B.H., Lavery T., Suh C., Voas M., Williams A., Rubin G.M. A genetic screen for novel components of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway that interact with the *yan* gene of *Drosophila* identifies *split ends*, a new RNA recognition motif-containing protein // *Genetics*. – 2000. – Vol. 154. – № 2. – P. 695–712.
319. Reifegerste R., Schreiber J., Gülland S., Ludemann A., Wegner M. mGCMa is a murine transcription factor that overrides cell fate decisions in *Drosophila* // *Mechanisms of development*. – 1999. – Vol. 82. – № 1. – P. 141–150.
320. Reith C.A., Sillar K.T. Development and role of GABA_A receptor-mediated synaptic potentials during swimming in postembryonic *Xenopus laevis* tadpoles // *Journal of neurophysiology*. – 1999. – Vol. 82. – № 6. – P. 3175–3187.
321. Restrepo C.E., Margaryan G., Borgius L., Lundfald L., Sargsyan D., Kiehn O. Change in the balance of excitatory and inhibitory midline fiber crossing as an explanation for the hopping phenotype in *EphA4* knockout mice: Increased excitatory crossing in *EphA4* knockouts // *European journal of neuroscience*. – 2011. – Vol. 34. – № 7. – P. 1102–1112.

322. Rezaval C., Werbajh S., Ceriani M.F. Neuronal death in *Drosophila* triggered by GAL4 accumulation: Neuronal death by protein overload // European journal of neuroscience. – 2007. – Vol. 25. – № 3. – P. 683–694.

323. Rideout E.J., Billeter J.-C., Goodwin S.F. The sex-determination genes fruitless and doublesex specify a neural substrate required for courtship song // Current biology. – 2007. – Vol. 17. – № 17. – P. 1473–1478.

324. Rioult-Pedotti M.-S. Intrinsic NMDA-induced oscillations in motoneurons of an adult vertebrate spinal cord are masked by inhibition // Journal of neurophysiology. – 1997. – Vol. 77. – № 2. – P. 717–730.

325. Ritchie M.G., Halsey E.J., Gleason J.M. *Drosophila* song as a species-specific mating signal and the behavioural importance of Kyriacou & Hall cycles in *D. melanogaster* song // Animal behaviour. – 1999. – Vol. 58. – № 3. – P. 649–657.

326. Robie A.A., Straw A.D., Dickinson M.H. Object preference by walking fruit flies, *Drosophila melanogaster*, is mediated by vision and graviperception // Journal of experimental biology. – 2010. – Vol. 213. – № 14. – P. 2494–2506.

327. Robinson R.B., Siegelbaum S.A. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function // Annual Review of Physiology. – 2003. – Vol. 65. – № 1. – P. 453–480.

328. Rohn J.L., Sims D., Liu T., Fedorova M., Schöck F., Dopie J., Vartiainen M.K., Kiger A.A., Perrimon N., Baum B. Comparative RNAi screening identifies a conserved core metazoan actinome by phenotype // The Journal of cell biology. – 2011. – Vol. 194. – № 5. – P. 789–805.

329. Rolls M.M., Satoh D., Clyne P.J., Henner A.L., Uemura T., Doe C.Q. Polarity and intracellular compartmentalization of *Drosophila* neurons // Neural Development. – 2007. – Vol. 2. – № 1. – 7. – doi:10.1186/1749-8104-2-7.

330. Rosen S.C., Teyke T., Miller M.W., Weiss K.R., Kupfermann I. Identification and characterization of cerebral-to-buccal interneurons implicated in the control of motor programs associated with feeding in *Aplysia* // The Journal of neuroscience. – 1991. – Vol. 11. – № 11. – P. 3630–3655.

331. Rossignol S., Chau C., Brustein E., Giroux N., Bouyer L., Barbeau H., Reader T.A. Pharmacological activation and modulation of the central pattern generator for locomotion in the cat // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 860. – № 1. – P. 346–359.
332. Rossignol S. Neural control of stereotypic limb movements // *Handbook of physiology, Section 12. Exercise: Regulation and integration of multiple systems*, edited by L. B. Rowell, J. T. Sheperd. – New York: Oxford University Press, 1996. – P. 173–216.
333. Rothberg J.M., Jacobs J.R., Goodman C.S., Artavanis-Tsakonas S. slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains // *Genes and development*. – 1990. – Vol. 4. – № 12a. – P. 2169–2187.
334. Rubin G.M., Spradling A.C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors // *Science*. – 1982. – Vol. 218. – № 4570. – P. 348–353.
335. Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system // *Nature reviews neuroscience*. – 2008. – Vol. 9. – № 1. – P. 26–35.
336. Ryckebusch S., Laurent G. Rhythmic patterns evoked in locust leg motor neurons by the muscarinic agonist pilocarpine // *Journal of neurophysiology*. – 1993. – Vol. 69 – № 5. – P. 1583–1595.
337. Ryner L.C., Goodwin S.F., Castrillon D.H., Anand A., Villella A., Baker B.S., Hall J.C., Taylor B.J., Wasserman S.A. Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene // *Cell*. – 1996. – Vol. 87. – № 6. – P. 1079–1089.
338. Santoro B., Chen S., Luthi A., Pavlidis P., Shumyatsky G.P., Tibbs G.R., Siegelbaum S.A. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS // *Journal of neuroscience*. – 2000. – Vol. 20. – №14. – P. 5264–5275.

339. Saraswati S., Fox L.E., Soll D.R., Wu C.F. Tyramine and octopamine have opposite effects on the locomotion of *Drosophila* larvae // Journal of neurobiology. – 2004. – Vol. 58. – № 4. – P. 425–441.

340. Schmidt B.J., Jordan L.M. The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord // Brain research bulletin. – 2000. – Vol. 53. – № 5. – P. 689–710.

341. Schnorrer F., Schonbauer C., Langer C.C., Dietzl G., Novatchkova M., Schernhuber K., Fellner M., Azaryan A., Radolf M., Stark A., Keleman K., Dickson B.J. Systematic genetic analysis of muscle morphogenesis and function in *Drosophila* // Nature. – 2010. – Vol. 464. – № 7286. – P. 287–291.

342. Schotland J., Shupliakov O., Wikström M., Brodin L., Srinivasan M., You Z.B., Herrera-Marschitz M., Zhang W., Hökfelt T., Grillner S. Control of lamprey locomotor neurons by colocalized monoamine transmitters // Nature. – 1995. – Vol. 374. – № 6519. P. 266–268.

343. Schotland J.L., Shupliakov O., Grillner S., Brodin L. Synaptic and nonsynaptic monoaminergic neuron systems in the lamprey spinal cord // The journal of comparative neurology. – 1996. – Vol. 372. – P. 229–244.

344. Schulz D.J., Goillard J.-M., Marder E. Variable channel expression in identified single and electrically coupled neurons in different animals // Nature neuroscience. – 2006. – Vol. 9 – № 3 – P. 356–362.

345. Schwendemann A., Matkovic T., Linke C., Klebes A., Hofmann A., Korge G. Hip, an HP1-interacting protein, is a haplo- and triplo-suppressor of position effect variegation // Proceedings of the national academy of sciences. – 2008. – Vol. 105. – № 1. – P. 204–209.

346. Sedaghat Y., Miranda W.F., Sonnenfeld M.J. The jing Zn-finger transcription factor is a mediator of cellular differentiation in the *Drosophila* CNS midline and trachea // Development. – 2002. – Vol. 129. – № 11. – P. 2591–2606.

347. Seidenfaden R., Krauter A., Hildebrandt H. The neural cell adhesion molecule NCAM regulates neurite outgrowth by multiple mechanisms of interaction // Neurochemistry international. – 2006. – Vol. 49. – № 1. – P. 1–11.

348. Sekirnjak C., du Lac S. Intrinsic firing dynamics of vestibular nucleus neurons // *The Journal of neuroscience*. – 2002. – Vol. 22. – № 6. – P. 2083–2095.
349. Selverston A. Modulation of circuits underlying rhythmic behaviors // *Journal of comparative physiology A*. – 1995. – Vol. 176. – № 2. – P. 139–147.
350. Senju S., Iyama K., Kudo H., Aizawa S., Nishimura Y. Immunocytochemical analyses and targeted gene disruption of *GTPBP1* // *Molecular and cellular biology*. – 2000. – Vol. 20. – № 17. – P. 6195–6200.
351. Shalizi A., Gaudilliere B., Yuan Z., Stegmüller J., Shirogane T., Ge Q., Tan Y., Schulman B., Harper J.W., Bonni A. A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation // *Science*. – 2006. – Vol. 311. – № 5763. – P. 1012–1017.
352. Sharp A.A., Skinner F.K., Marder E. Mechanisms of oscillation in dynamic clamp constructed two-cell half-center circuits // *Journal of neurophysiology*. – 1996. – Vol. 76. – № 2. – P. 867–883.
353. Shchedrina V.A., Kabil H., Vorbruggen G., Lee B.C., Turanov A.A., Hirosawa-Takamori M., Kim H.Y., Harshman L.G., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. Analyses of fruit flies that do not express selenoproteins or express the mouse selenoprotein, methionine sulfoxide reductase B1, reveal a role of selenoproteins in stress resistance // *Journal of biological chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – № 34. – P. 29449–29461.
354. Sheldon T.J., Miguel-Aliaga I., Gould A.P., Taylor W.R., Conklin D. A novel family of single VWC-domain proteins in invertebrates // *FEBS Letters*. – 2007. – Vol. 581. – № 27. – P. 5268–5274.
355. Sillar K.T., Woolston A.M., Wedderburn J.F. Involvement of brainstem serotonergic interneurons in the development of a vertebrate spinal locomotor circuit // *Proceedings. Biological sciences*. – 1995. – Vol. 259. – № 1354. – P. 65–70.
356. Sillar K.T., Simmers A.J. 5HT induces NMDA receptor-mediated intrinsic oscillations in embryonic amphibian spinal neurons // *Proceedings: Biological Sciences*. – 1994. – Vol. 255. – № 1343. – P. 139–145.

357. Simon A.F., Boquet I., Synguelakis M., Preat T. The *Drosophila* putative kinase linotte (derailed) prevents central brain axons from converging on a newly described interhemispheric ring // *Mechanisms of development*. – 1998. – Vol. 76. – № 1. – P. 45–55.
358. Simonsen A., Cumming R.C., Brech A., Isakson P., Schubert D.R., Finley K.D. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila* // *Autophagy*. – 2008. – Vol. 4. – № 2. – P. 176–184.
359. Skydsgaard M., Hounsgaard J. Multiple actions of iontophoretically applied serotonin on motoneurons in the turtle spinal cord *in vitro* // *Acta physiologica Scandinavica*. – 1996. – Vol. 158. – P. 301–310.
360. Slawson J.B., Kuklin E.A., Ejima A., Mukherjee K., Ostrovsky L., Griffith L.C. Central regulation of locomotor behavior of *Drosophila melanogaster* depends on a CASK isoform containing CaMK-like and L27 domains // *Genetics*. – 2010. – Vol. 187. – № 1. – P. 171–184.
361. Smith R.D., Goldin A.L. Functional analysis of the rat α 1 sodium channel in *Xenopus* oocytes // *The Journal of neuroscience*. – 1998. – Vol. 18. – № 3. – P. 811–820.
362. Snow E.T., Foote R.S., Mitra S. Base-pairing properties of O⁶-methylguanine in template DNA during in vitro DNA replication // *Journal of biological chemistry*. – 1984. – Vol. 259. – № 13. – P. 8095–8100.
363. Soffe S.R. Motor patterns for two distinct rhythmic behaviors evoked by excitatory amino acid agonists in the *Xenopus* embryo spinal cord // *Journal of neurophysiology*. – 1996. – Vol. 75. – № 5. – P. 1815–1825.
364. Sonnenfeld M.J., Barazesh N., Sedaghat Y., Fan C. The *jing* and *ras1* pathways are functionally related during CNS midline and tracheal development // *Mechanisms of development*. – 2004. – Vol. 121. – № 12. – P. 1531–1547.
365. Sorensen M., DeWeerth S., Cymbalyuk G., Calabrese R.L. Using a Hybrid Neural System to Reveal Regulation of Neuronal Network Activity by an Intrinsic Current // *Journal of neuroscience*. – 2004. – Vol. 24. – № 23. – P. 5427–5438.

366. Staras K., Gyori J., Kemenes G. Voltage-gated ionic currents in an identified modulatory cell type controlling molluscan feeding // *The European journal of neuroscience*. – 2002. – Vol. 15. – № 1. – P. 109–119.

367. Stein P.S., Victor J.C., Field E.C., Currie S.N. Bilateral control of hindlimb scratching in the spinal turtle: contralateral spinal circuitry contributes to the normal ipsilateral motor pattern of fictive rostral scratching // *The Journal of neuroscience*. – 1995. – Vol. 15. – № 6. – P. 4343–4355.

368. Stockinger P., Kvitsiani D., Rotkopf S., Tirian L., Dickson B.J. Neural circuitry that governs *Drosophila* male courtship behavior // *Cell*. – 2005. – Vol. 121. – № 5. – P. 795–807.

369. Stoleru D., Peng Y., Agosto J., Rosbash M. Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila* // *Nature*. – 2004. – Vol. 431. – № 7010. – P. 862–868.

370. Strauss R., Hanesch U., Kinkelin M., Wolf R., Heisenberg M. *no-bridge* of *Drosophila melanogaster*: portrait of a structural brain mutant of the central complex // *Journal of neurogenetics*. – 1992. – Vol. 8. – № 3. – P. 125–155.

371. Strauss R. The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2002. – Vol. 12. – № 6. – P. 633–638.

372. Strauss R., Heisenberg M. A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain // *The Journal of neuroscience*. – 1993. – Vol. 13. – № 5. – P. 1852–1861.

373. Strauss R., Heisenberg M. Coordination of legs during straight walking and turning in *Drosophila melanogaster* // *Journal of comparative physiology a: neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*. – 1990. – Vol. 167. – № 3. – P. 403–412.

374. Strödicke M., Karberg S., Korge G. *Domina (Dom)*, a new *Drosophila* member of the FKH/WH gene family, affects morphogenesis and is a suppressor of position-effect variegation // *Mechanisms of development*. – 2000. – Vol. 96. – № 1. – P. 67–78.

375. Sugimura I., Adachi-Yamada T., Nishi Y., Nishida Y. A *Drosophila* Winged-helix nude (Whn)-like transcription factor with essential functions throughout development // Development, growth and differentiation. – 2000. – Vol. 42. – № 3. – P. 237–248.
376. Sun B., Xu P., Wang W., Salvaterra P.M. *In vivo* modification of Na(+),K(+)-ATPase activity in *Drosophila* // Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry and molecular biology. – 2001. – Vol. 130. – № 4. – P. 521-536.
377. Sun B., Xu P., Salvaterra P.M. Dynamic visualization of nervous system in live *Drosophila* // Proceedings of the national academy of sciences. – 1999. – Vol. 96. – № 18. – P. 10438–10443.
378. Sun Y.-A., Wyman R.J. Neurons of the *Drosophila* giant fiber system: I. Dorsal longitudinal motor neurons // Journal of comparative neurology. – 1997. – Vol. 387. – № 1. – P. 157–166.
379. Sung P.J., Rodrigues A.B., Kleinberger A., Quatela S., Bach E.A., Philips M.R. Cytosolic Ras supports eye development in *Drosophila* // Molecular and cellular biology. – 2010. – Vol. 30. – № 24. – P. 5649–5657.
380. Supatto W., McMahon A., Fraser S.E., Stathopoulos A. Quantitative imaging of collective cell migration during *Drosophila* gastrulation: multiphoton microscopy and computational analysis // Nature protocols. – 2009. – Vol. 4. – № 10. – P. 1397–1412.
381. Sweeney S.T., Broadie K., Keane J., Niemann H., O'Kane C.J. Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects // Neuron. – 1995. – Vol. 14. – № 2. – P. 341–351.
382. Swensen A.M., Marder E. Modulators with convergent cellular actions elicit distinct circuit outputs // The Journal of neuroscience. – 2001. – Vol. 21. – № 11. – P. 4050–4058.

383. Sykes P., Norman H., Condrón B. Variation in serotonergic and dopaminergic neuronal survival in the central nervous system of adult *Drosophila* // Cell and tissue research. – 2004. – Vol. 317. – № 3. – P. 327–331.
384. Taddese A., Bean B.P. Subthreshold sodium current from rapidly inactivating sodium channels drives spontaneous firing of tuberomammillary neurons // Neuron. – 2002. – Vol. 33. – № 4. – P. 587–600.
385. Takei Y., Ozawa Y., Sato M., Watanabe A., Tabata T. Three *Drosophila* EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans // Development. – 2004. – Vol. 131. – № 1. – P. 73–82.
386. Talley E.M., Sirois J.E., Lei Q., Bayliss D.A. Two-pore-Domain (KCNK) potassium channels: dynamic roles in neuronal function // Neuroscientist. – 2003. – Vol. 9. – № 1. – P. 46–56.
387. Tanaka K.K.K., Bryantsev A.L., Cripps R.M. Myocyte enhancer factor 2 and chorion factor 2 collaborate in activation of the myogenic program in *Drosophila* // Molecular and cellular biology. – 2007. – Vol. 28. – № 5. – P. 1616–1629.
388. Tanaka K.K.K., Bryantsev A.L., Cripps R.M. Myocyte enhancer factor 2 and chorion factor 2 collaborate in activation of the myogenic program in *Drosophila* // Molecular and cellular biology. – 2007. – Vol. 28. – № 5. – P. 1616–1629.
389. Tang L.S., Goeritz M.L., Caplan J.S., Taylor A.L., Fisek M., Marder E. Precise temperature compensation of phase in a rhythmic motor pattern [Электронный ресурс] // PLoS Biology. – 2010. – Vol. 8. – № 8. – e1000469 – doi:10.1371/journal.pbio.1000469.
390. Tauber E., Eberl D.F. Acoustic communication in *Drosophila* // Behavioural processes. – 2003. – Vol. 64. – № 2. – P. 197–210.
391. Tauber E., Eberl D.F. The effect of male competition on the courtship song of *Drosophila melanogaster* // Journal of insect behavior. – 2002. – Vol. 15. – № 1. – P. 109–120.
392. Taylor B.J., Villella A., Ryner L.C., Baker B.S., Hall J.C. Behavioral and neurobiological implications of sex-determining factors in *Drosophila* // Developmental genetics. – 1994. – Vol. 15. – № 3. – P. 275–296.

393. Taylor M.V., Beatty K.E., Hunter H.K., Baylies M.K. *Drosophila* MEF2 is regulated by *twist* and is expressed in both the primordia and differentiated cells of the embryonic somatic, visceral and heart musculature // Mechanisms of development. – 1995. – Vol. 50. – № 1. – P. 29–41.
394. Taylor R. Interpretation of the correlation coefficient: a basic review // Journal of diagnostic medical sonography. – 1990. – Vol. 6. – № 1. – P. 35–39.
395. Tazerart S., Vinay L., Brocard F. The Persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm // Journal of neuroscience. – 2008. – Vol. 28. – № 34. – P. 8577–8589.
396. Tazerart S., Vinay L., Brocard F. The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm // Journal of neuroscience. – 2008. – Vol. 28. – № 34. – P. 8577–8589.
397. Tegner J., Matsushima T., El Manira A., Grillner S. The spinal GABA system modulates burst frequency and intersegmental coordination in the lamprey: differential effects of GABA_A and GABA_B receptors // Journal of neurophysiology. – 1993. – Vol. 69. – № 3. – P. 647–657.
398. Tegner J., Grillner S. Interactive effects of the GABA_Bergic modulation of calcium channels and calcium-dependent potassium channels in lamprey // Journal of neurophysiology. – 1999. – Vol. 81. – № 3. – P. 1318–1329.
399. Tell F., Jean A. Ionic basis for endogenous rhythmic patterns induced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors in neurons of the rat nucleus tractus solitarii // Journal of neurophysiology. – 1993. – Vol. 70. – № 6. – P. 2379–2390.
400. Thieringer H.A., Singh K., Trivedi H., Inouye M. Identification and developmental characterization of a novel Y-box protein from *Drosophila melanogaster* // Nucleic acids research. – 1997. – Vol. 25. – № 23. – P. 4764–4770.
401. Thoby-Brisson M., Simmers J. Long-term neuromodulatory regulation of a motor pattern-generating network: maintenance of synaptic efficacy and oscillatory properties // Journal of neurophysiology. – 2002. – Vol. 88. – № 6. – P. 2942–2953.

402. Thoby-Brisson M., Simmers J. Transition to endogenous bursting after long-term decentralization requires de novo transcription in a critical time window // *Journal of neurophysiology*. – 2000. – Vol. 84. – № 1. – P. 596–599.

403. Trimarchi J.R., Murphey R.K. The *shaking-B²* mutation disrupts electrical synapses in a flight circuit in adult *Drosophila* // *The Journal of neuroscience*. – 1997. – Vol. 17. – № 12. – P. 4700–4710.

404. Trimarchi J.R., Schneiderman A.M. The motor neurons innervating the direct flight muscles of *Drosophila melanogaster* are morphologically specialized // *Journal of comparative neurology*. – 1994. – Vol. 340. – № 3. – P. 427–443.

405. Turner T.L., Miller P.M. Investigating natural variation in *Drosophila* courtship song by the evolve and resequence approach // *Genetics*. – 2012. – Vol. 191. – № 2. – P. 633–642.

406. Uwanogho D.A., Hardcastle Z., Balogh P., Mirza G., Thornburg K.L., Ragoussis J., Sharpe P.T. Molecular cloning, chromosomal mapping, and developmental expression of a novel protein tyrosine phosphatase-like gene // *Genomics*. – 1999. – Vol. 62. – № 3. – P. 406–416.

407. Van Dongen P.A., Theodorsson-Norheim E., Brodin E., Hökfelt T., Grillner S., Peters A., Cuello A.C., Forssmann W.G., Reinecke M., Singer E.A., Lazarus L.H. Immunohistochemical and chromatographic studies of peptides with tachykinin-like immunoreactivity in the central nervous system of the lamprey // *Peptides*. – 1986. – Vol. 7. – № 2. – P. 297–313.

408. Vanden Broeck L., Naval-Sanchez M., Adachi Y., Diaper D., Dourlen P., Chapuis J., Kleinberger G., Gistelink M., Van Broeckhoven C., Lambert J.C., Hirth F., Aerts S., Callaerts P., Dermaut B. TDP-43 loss-of-function causes neuronal loss due to defective steroid receptor-mediated gene program switching in *Drosophila* // *Cell reports*. – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 160–172.

409. Venken K.J.T., Bellen H.J. Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster* // *Development*. – 2007. – Vol. 134. – № 20. – P. 3571–3584.

410. Verma S., Hoffmann F.W., Kumar M., Huang Z., Roe K., Nguyen-Wu E., Hashimoto A.S., Hoffmann P.R. Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient

calcium flux in immune cells and impaired immune responses // The Journal of immunology. – 2011. – Vol. 186. – № 4. – P. 2127–2137.

411. Villella A., Gailey D.A., Berwald B., Ohshima S., Barnes P.T., Hall J.C. Extended reproductive roles of the fruitless gene in *Drosophila melanogaster* revealed by behavioral analysis of new *fru* mutants // Genetics. – 1997. – Vol. 147. – № 3. – P. 1107–1130.1.

412. Villella A., Gailey D.A., Berwald B., Ohshima S., Barnes P.T., Hall J.C. Extended reproductive roles of the *fruitless* gene in *Drosophila melanogaster* revealed by behavioral analysis of new *fru* mutants // Genetics. – 1997. – Vol. 147. – № 3. – P. 1107–1130.

413. Villella A., Hall J.C. Courtship anomalies caused by doublesex mutations in *Drosophila melanogaster* // Genetics. – 1996. – Vol. 143. – № 1. – P. 331–344.

414. Vogel C., Teichmann S.A., Chothia C. The immunoglobulin superfamily in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* and the evolution of complexity // Development. – 2003. – Vol. 130. – № 25. – P. 6317– 6328.

415. von Philipsborn A.C., Liu T., Yu J.Y., Masser C., Bidaye S.S., Dickson B.J. Neuronal control of *Drosophila* courtship song // Neuron. – 2011. – Vol. 69. – № 3. – P. 509–522.

416. von Schlicht F., Hall J.C. Neural topography of courtship song in sex mosaics of *Drosophila melanogaster* // Journal of comparative physiology. – 1979. – Vol. 129. – № 1. – P. 85–95.

417. Waldron I. Courtship sound production in two sympatric sibling *Drosophila* species // Science. New Series. –1964. – Vol. 144. – № 3615. – P. 191–193.

418. Walmod P.S., Kolkova K., Berezin V., Bock E. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction // Neurochemical research. – 2004. – Vol. 29. – № 11. – P. 2015–2035.

419. Welch W.J. Construction of permutation tests// Journal of the American statistical association. – 1990. – Vol. 85. – № 411. – P. 693–698.

420. Wheeler D.A., Kulkarni S.J., Gailey D.A., Hall J.C. Spectral analysis of courtship songs in behavioral mutants of *Drosophila melanogaster* // Behavior genetics. – 1989. – Vol. 19. – № 4. – P. 503–528.
421. Whelan P.J. Control of locomotion in the decerebrate cat // Progress in neurobiology. – 1996. – vol. 49. – p. 481–515.
422. White A.E., Burch B.D., Yang X.C., Gasdaska P.Y., Dominski Z., Marzluff W.F., Duronio R.J. *Drosophila* histone locus bodies form by hierarchical recruitment of components // The Journal of cell biology. – 2011. – Vol. 193. – № 4. – P. 677– 694.
423. Wikström M., Hill R., Hellgren J., Grillner S. The action of 5-HT on calcium-dependent potassium channels and on the spinal locomotor network in lamprey is mediated by 5-HT_{1A}-like receptors // Brain research. – 1995. – Vol. – 678. – № 1-2. – P. 191-199.
424. Wilhelm J.E., Mansfield J., Hom-Booher N., Wang S., Turck C.W., Hazelrigg T., Vale R.D. Isolation of a ribonucleoprotein complex involved in mRNA localization in *Drosophila* oocytes // The Journal of cell biology. – 2000. – Vol. 148. – № 3. – P. 427–440.
425. Wilson D.M. The central nervous control of flight in a locust // J. exp. Biol. – 1961. – Vol. 38. – № 47. – P. 471–490.
426. Wilson J.M., Cowan A.I., Brownstone R.M. Heterogeneous electrotonic coupling and synchronization of rhythmic bursting activity in mouse hb9 interneurons // Journal of neurophysiology. – 2007. – Vol. 98. – № 4. – P. 2370-2381.
427. Winther A.M.E., Acebes A., Ferrus A. Tachykinin-related peptides modulate odor perception and locomotor activity in *Drosophila* // Molecular and cellular neuroscience. – 2006. – Vol. 31. – № 3. – P. 399–406.
428. Wojnar P. Molecular cloning of a novel lipocalin-1 interacting human cell membrane receptor using phage display // Journal of biological chemistry. – 2001. – Vol. 276. – № 23. – P. 20206–20212.

429. Wosnitza A., Bockemühl T., Dübbert M., Scholz H., Büschges A. Inter-leg coordination in the control of walking speed in *Drosophila* // Journal of experimental biology. – 2012. – Vol. 216. – № 3. – P. 480–491.
430. Wu N., Enomoto A., Tanaka S., Hsiao C.-F., Nykamp D.Q., Izhikevich E., Chandler S.H. Persistent sodium currents in mesencephalic V neurons participate in burst generation and control of membrane excitability // Journal of neurophysiology. – 2005. – Vol. 93. – № 5. – P. 2710–2722.
431. Xiong X., Hao Y., Sun K., Li J., Li X., Mishra B., Soppina P., Wu C., Hume R.I., Collins C.A. The Highwire ubiquitin ligase promotes axonal degeneration by tuning levels of Nmnat protein [Электронный ресурс] // PLoS Biology. – 2012. – Vol. 10. – № 12. – e1001440. – doi: 10.1371/journal.pbio.1001440.
432. Xu L., Yao X., Chen X., Lu P., Zhang B., Ip Y.T. Msk is required for nuclear import of TGF- β /BMP-activated Smads // The Journal of cell biology. – 2007b. – Vol. 178. – № 6. – P. 981–994.
433. Xu X.M., Carlson B.A., Irons R., Mix H., Zhong N., Gladyshev V.N., Hatfield D.L. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis // Biochemical journal. – 2007c. – Vol. 404. – № 1. – P. 115–120.
434. Xu X.-M., Carlson B.A., Mix H., Zhang Y., Saira K., Richard S.G., Berry M.J., Gladyshev V.N., Hatfield D.L. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes [Электронный ресурс] // PLoS biology. – 2007a. – Vol. 5. – № 1. – e4. – doi:10.1371/journal.pbio.0050004.
435. Yamamoto A., Zwarts L., Callaerts P., Norga K., Mackay T.F.C., Anholt R.R.H. Neurogenetic networks for startle-induced locomotion in *Drosophila melanogaster* // Proceedings of the national academy of sciences. – 2008. – Vol. 105. – № 34. – P. 12393–12398.
436. Yamamoto-Hino M., Abe M., Shibano T., Setoguchi Y., Awano W., Ueda R., Okano H., Goto S. Cisterna-specific localization of glycosylation-related proteins to the Golgi apparatus // Cell structure and function. – 2012. – Vol. 37. – № 1. – P. 55–63.

437. Yang M.Y., Armstrong J.D., Vilinsky I., Strausfeld N.J., Kaiser K. Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns // *Neuron*. – 1995. – Vol. 15. – № 1. – P. 45–54.
438. Yao Y., Wu Y., Yin C., Ozawa R., Aigaki T., Wouda R.R., Noordermeer J.N., Fradkin L.G., Hing H. Antagonistic roles of Wnt5 and the Drl receptor in patterning the *Drosophila* antennal lobe // *Nature Neuroscience*. – 2007. – Vol. 10. – № 11. – P. 1423–1432.
439. Yellman C., Tao H., He B., Hirsh J. Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila* // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 1997. – Vol. 94. – № 8. – P. 4131–4136.
440. Yeoman M.S., Brierley M.J., Benjamin P.R. Central pattern generator interneurons are targets for the modulatory serotonergic cerebral giant cells in the feeding system of *Lymnaea* // *Journal of neurophysiology*. – 1996 – Vol. 75– № 1 – P. 11–25.
441. Yoshida H., Fuwa T.J., Arima M., Hamamoto H., Sasaki N., Ichimiya T., Osawa K., Ueda R., Nishihara S. Identification of the *Drosophila* core 1 beta1,3-galactosyltransferase gene that synthesizes T antigen in the embryonic central nervous system and hemocytes // *Glycobiology*. – 2008. – Vol. 18. – № 12. – P. 1094– 1104.
442. Yoshikawa S., McKinnon R.D., Kokel M., Thomas J.B. Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor // *Nature*. – 2003. – Vol. 422. – № 6932. – P. 583–588.
443. Yu J.Y., Kanai M.I., Demir E., Jefferis G.S., Dickson B.J. Cellular organization of the neural circuit that drives *Drosophila* courtship behavior // *Current biology*. – 2010. – Vol. 20. – № 18. – P. 1602–1614.
444. Zhang D., Zhou W., Yin C., Chen W., Ozawa R., Ang L.H., Anandan L., Aigaki T., Hing H. Misexpression screen for genes altering the olfactory map in *Drosophila* // *genesis*. – 2006. – Vol. 44. – № 4. – P. 189–201.
445. Zhang H., Rodgers E.W., Krenz W.-D.C., Clark M.C., Baro D.J. Cell specific dopamine modulation of the transient potassium current in the pyloric network

by the canonical D₁ receptor signal transduction cascade // Journal of neurophysiology. – 2010. – Vol. 104. – № 2. – P. 873–884.

446. Zhang Y., Oliva R., Gisselmann G., Hatt H., Guckenheimer J., Harris-Warrick R.M. Overexpression of a hyperpolarization-activated cation current (*I_h*) channel gene modifies the firing activity of identified motor neurons in a small neural network // The Journal of neuroscience. – 2003. – Vol. 23. – № 27. – P. 9059–9067.

447. Zhang W., Grillner S. The spinal 5-HT system contributes to the generation of fictive locomotion in lamprey // Brain research. – 2000. – Vol. 879. – № 1. – P. 188–192.

448. Zhang Y., Golowasch J. Recovery of rhythmic activity in a central pattern generator: analysis of the role of neuromodulator and activity-dependent mechanisms // Journal of computational neuroscience. – 2011. – Vol. 31. – № 3. – P. 685–699.

449. Zheng C.J. Therapeutic targets: Progress of their exploration and investigation of their characteristics // Pharmacological reviews. – 2006. – Vol. 58. – № 2. – P. 259–279.

450. Zheng L., Carthew R.W. Lola regulates cell fate by antagonizing Notch induction in the *Drosophila* eye // Mechanisms of development. – 2008. – Vol. 125. – № 1–2. – P. 18–29.

451. Zoungrana O.R., Amri M., Car A., Roman C. Intracellular activity of motoneurons of the rostral nucleus ambiguus during swallowing in sheep // Journal of neurophysiology. – 1997. – Vol. 77. – № 2. – P. 909–922.

452. Zupanc G.K.H., Maler L. Neuronal control of behavioral plasticity: the prepacemaker nucleus of weakly electric gymnotiform fish // Journal of comparative physiology A. – 1997. – Vol. 180. – Neuronal control of behavioral plasticity. – № 2. – P. 99–111.