

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Институт физиологии им. И. П. Павлова

На правах рукописи

МЕДВЕДЕВА
Анна Владимировна

**ОСОБЕННОСТИ АРХИТЕКТУРЫ ХРОМОСОМ
У МУТАНТОВ ЛОКУСА *agnostic* ДРОЗОФИЛЫ - МОДЕЛИ
ГЕНОМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА**

03.00.13 - физиология и 03.00.15 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург -2008

Работа выполнена в лаборатории нейрогенетики Института физиологии
им. И. П. Павлова Российской академии наук

Научный руководитель:	доктор биологических наук Е. В. Саватеева-Попова
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук Кузнецова Татьяна Владимировна Институт Акушерства и Гинекологии им. Отто Рамм
	доктор биологических наук Семенов Дмитрий Германович Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН
Ведущее учреждение:	Санкт-Петербургский Государственный Университет

Защита диссертации состоится «_16_»_октября_____2008 г.
в _11_ часов на заседании Диссертационного Совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций Д 002.020.01 при Институте физиологии
им. И. П. Павлова РАН по адресу 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Института
физиологии им. И. П. Павлова РАН

Автореферат разослан 16 сентября 2008 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д.002. 020. 01.
доктор биологических наук

Н. Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Актуальной проблемой современной нейрофизиологии и медицины является изучение предпосылок возникновения социально-значимых болезней - синдромов с разнообразными расстройствами высшей нервной деятельности и васкулярными патологиями. Эти синдромы возникают спонтанно и непредсказуемо (спорадически) в результате протяженных делеций и дупликаций, генерируемых неравной рекомбинацией в районах хромосом со специфической архитектурой. Это синдромы: Уильямса в 7q11.23 (Peoples et al., 2000), Смит-Магениса в 17p11.2 (Chen et al., 1997), ДиГеорги в 22q11.2 (Shaikh et al., 2001), Прадер-Вилли-Ангельман в 15q11-q13 (Amos-Landgraf et al., 1999), дупликационный синдром (17)(p11.2p11.2) и синдромы с делециями в У-хромосоме (Shaw and Lupski, 2004). Высокая частота таких структурных перестроек генома, значительно превышающая частоты появления болезней из-за мутаций какого-либо одного гена, привлекла внимание клиницистов и привела к формированию концепции «геномных болезней» (Shaw and Lupski, 2004). Если симптомы таких болезней описаны, то механизмы их возникновения еще мало изучены, что требует усилий исследователей на стыке физиологии и генетики. Концепция «геномных болезней» определяет и соответствующую стратегию исследований – трехмерную проекцию нарушения каждого иерархического уровня организации генома на изменения физиологии клетки и организма. На первичном уровне – нуклеотидном – генетическим резервом этих заболеваний являются кластеры повторяющихся последовательностей, псевдогенов, фрагментов генов, палиндромы и другие хромосомные сегменты. Следующим уровнем является распределение этих районов по зонам различной конформации в хромосоме. И в заключение - создание определенной организации ядра, в которой достигается пространственное сближение функционально и структурно связанных районов хромосом, что создает возможность неравного кроссинговера по последовательностям с частичной гомологией. Все три уровня организации генетического материала находятся в гибком соподчинении. Роль основного фактора сопряжения отводят актину ядра. Актин способен: а) регулировать транскрипцию, активируя все три класса РНК-полимераз (Visa, 2005), б) участвовать в ремоделировании хроматина, взаимодействуя с большим количеством белков (Olave et al., 2001); в) выстилать ядерную мембрану, определяя точки прикрепления хромосом и образование ядерных пор, регулируя транспорт из ядра (Pederson and Aebi, 2005). На уровне физиологии клетки ремоделирование актинового цитоскелета определяет локализацию рецепторов нейромедиаторов в синаптических уплотнениях и морфологию шипиков дендритов, что на уровне физиологии организма

влияет на синаптическую пластичность – основу процессов обучения и памяти. В последнее время выяснено, что многие гены, кодирующие у человека рецепторы нейромедиаторов, ионные каналы и компоненты сигнальных каскадов, так же, как и у дрозофилы, расположены в районах хромосом со специфической архитектурой (Rossi et al., 2007). Поэтому неслучайно большинство нейродегенеративных болезней старения также возникают спорадически из-за нарушений интегральной целостности генетического аппарата и, следовательно, физиологических последствий его функционирования, предопределяемых в частности сигнальными каскадами ремоделирования актина (Minamide et al., 2000; Sherman and Goldberg, 2001). В связи с этим, большое значение приобретают модели, позволяющие осуществить комплексное изучение как механизмов взаимосвязи всех уровней организации генетического аппарата, так и физиологических последствий их нарушений на основе мутаций с известным биохимическим проявлением. Такая модель была разработана нами у *Drosophila melanogaster*, политенные хромосомы слюнных желез которой дают уникальную возможность изучения пространственной организации интерфазного ядра, а становление различных форм обучения соотнесено с функциями определенных структур мозга. В 1978 году Е.В. Савватеевой и Н.Г. Камышевым была получена мутация по гену *agnostic* (Савватеева и др. 1978), нарушающая системы вторичных посредников и оборонительное ольфакторное обучение. Клонирование фрагментов геномной ДНК локуса *agnostic* позволило установить его точное расположение в пределах района 11AB X-хромосомы дрозофилы, который содержит ген CG1848 для LIM-киназы 1 (LIMK1), гомологичный у многих видов. (Савватеева-Попова и др. 2002, 2004). Известно (Nagata et al., 1999), что фермент имеет два LIM-домена, обеспечивающих белок-белковое взаимодействие, и PDZ-домен, играющий ключевую роль в клеточной сигнализации и узнающий белки семейств рецепторов (NMDA NR2/D, AMPA, GluR2, mGluR5, бета-адренергических, мелатонина) и ионных каналов (Shaker K^+ , потенциал-управляемый Na^+ , Ca^{2+} - N-типа). LIMK1 принимает участие в регуляции динамики актина, фосфорилируя фактор его деполимеризации – кофилин (Yang et al., 1998), и, таким образом, совместно с актином является ключевым звеном интеграции иерархических уровней генома и продуктов его экспрессии в цитоплазме. Считается, что именно гемизиготность по этому гену в случае делеционного синдрома Уильямса обуславливает когнитивные нарушения у пациентов. У дрозофилы ген LIMK1 находится в районе 11AB цитологической карты X хромосомы, который является районом интеркалярного гетерохроматина, обогащенного повторами, а сам ген фланкирован AT-богатыми повторами (The National Centre for Biotechnology Information, NCBI), что создает на нуклеотидном уровне ситуацию сходную с той, которая

наблюдается у пациентов с делеционно-дупликационными синдромами. Трехкратное расширение карты в районе локализации мутантной аллели позволяет делать предположение о дупликационной природе данного повреждения, которое произошло в результате неравного кроссинговера (Савватеева-Попова и др., 2004). Кроме того, делеции, обнажающие ген *agnostic*, т.е. его гемизиготность, как в случае синдрома Уильямса, проявляют себя как мутации гена.

Цели и задачи работы состояли в том, чтобы на модели мутанта дрозофилы с известным биохимическим проявлением провести комплексное изучение взаимосвязи структурно-функциональной организации гена LIMK1, конформации и свойств хроматина, пространственной организации хромосом в ядре и физиологических последствий их нарушений на уровне клетки и целостного мозга. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Изучить распределение и активность LIMK1 в мозге имаго дрозофилы в норме и у мутантов по гену *agnostic* при пермиссивной (22⁰ C) и рестриктивной (29⁰ C) температуре.
2. Выяснить характер влияния гомозиготного и гемизиготного состояния гена LIMK1 (моделирование синдрома Вильямса) на распределение LIMK1 по зонам мозга имаго дрозофилы в норме и у мутантов по гену *agnostic* при пермиссивной (22⁰ C) и рестриктивной (29⁰ C) температуре.
3. Изучить распределение LIMK1 и фосфорилированного (p)-кофилина в слюнных железах личинок дрозофилы до и после действия теплового шока для выяснения их ядерно-цитоплазматической локализации.
4. Изучить частоту формирования эктопических контактов районами интеркалярного гетерохроматина в политенных хромосомах слюнных желез у разных линий дикого типа, гемизигот по гену *agnostic*, гомо- и гетерозигот мутанта *agn^{ts3}*, как показателя конформационного состояния гетерохроматиновых районов хромосом.
5. Изучить частоту асинопсиса в политенных хромосомах слюнных желез в норме и у мутантов *agn^{ts3}*, как показателя пространственной организации ядра в предположении, что способность к гомологичному синапсису варьирует в зависимости от внутриядерной локализации соответствующего района хромосомы.
6. Оценить частоту формирования белковых агрегатов – амилоидоподобных включений в мозге имаго и личиночных тканях до и после действия теплового шока в норме и у мутантов *agn^{ts3}* как следствие нарушений сигнального каскада ремоделирования актина.

Научная новизна работы. Впервые сформулирована концепция необходимости изучения многоуровневой организации ядра для выявления предпосылок геномных болезней. Впервые с использованием комплексного подхода с привлечением методов иммунофлуоресцентного, гистохимического, цитогенетического и поведенческого анализа прослежено изменение всех уровней организации генома при повреждении структуры гена для LIMK1 и физиологических последствий геномных нарушений. Впервые показано, что мутационно-обусловленное повреждение структуры гена для LIMK1, ключевого фермента ремоделирования актина, приводит к нарушениям формирования гетерохроматиновых районов и пространственной организации хромосом в ядре. Таким образом, спонтанные нарушения структуры гена для LIMK1, равно как и гемизиготность по этому гену (что наблюдается в случае синдрома Уильямса у человека) могут приводить к повреждениям всех уровней организации ядра, сказываясь и на когнитивных способностях. Впервые показано, что мутационно-обусловленное повреждение гена для LIMK1 приводит к образованию амилоидоподобных включений, частота которых снижается после теплового шока, и прослежена связь этих явлений со способностью к обучению и формированию памяти.

Научно-практическая значимость работы состоит в создании модели, позволяющей спроецировать повреждение каждого уровня организации генома на трехмерную организацию ядра и выяснить мало известные предпосылки для осуществления неравной рекомбинации, генерирующей делеционно-дупликационные синдромы (геномные болезни) со множественными, в том числе физиологическими и когнитивными проявлениями. Кроме того, работа позволяет представить механизмы возникновения спорадических нейродегенеративных заболеваний, сопровождаемых прогрессивной потерей памяти и нарушениями сигнального каскада ремоделирования актина.

Апробация работы. Полученные в ходе работы данные были представлены на следующих конференциях: V Съезде ВОГиС, 1987; III школе по генетике и селекции животных, Бийск, 1989, Международных конференциях «Простые нервные системы», Калининград.-2003; XIX Съезде физиологов России, Екатеринбург, 2004; 39th International Danube Symposium and 1st International Congress on ADHD, Würzburg, Germany, 2007; 17th World Congress "Parkinson's and Related Disorders", Amsterdam, 2007.

Вклад автора. Экспериментальная работа и обработка полученных результатов выполнена автором лично, в том числе и в ходе уникальных одномоментных молекулярно-генетических и поведенческих исследований лаборатории. Материалы,

вошедшие в данную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), выводов и списка литературы. Работа изложена на 184 страницах печатного текста, содержит 7 таблиц и иллюстрирована 41 рисунком. В списке литературы приведено 260 источников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Линии *Drosophila melanogaster*: Локус *agnostic* был обнаружен при целенаправленном скрининге индуцированных этилметансульфонатом (ЭМС) в линии Canton-S температурно-чувствительных (*ts*) мутаций, которые могли бы нарушать активность ферментов синтеза и распада цАМФ. *Df(1)112* несет небольшую, цитологически невидимую делецию, индуцированную нами рентгеном в линии CS и приводящую к гибели мух при их развитии при 29 °C в компаунде с *agn^{ts3}*. Р-инсерционных мутанты *P40* и *P29* были индуцированы перемещением Р-элемента из хромосомы 2 в X хромосому и отобраны по сниженной выживаемости при развитии в гетерозиготе с *Df(1)112* при 29° C. В качестве контроля использовали линию дикого типа Canton-S (CS) и Oregon-R. Развитие всех линий происходило при 24±0,5°С.

Предъявление теплового шока (ТШ). Для изучения эффектов ТШ, подаваемого в течение развития и у имаго дрозофилы, получали 5- часовые кладки яиц. Стаканчики с личинками 1-го возраста или предкуколками помещали на 30 мин в водяную баню при 37 °C. Для воздействия на взрослых мух их перед опытом переносили в предварительно подогретые стаканчики, которые затем помещали в водяную баню при тех же условиях. Этим достигалось резкое включение ТШ.

Иммунофлуоресценция. Мух помещали в воротнички для массовой гистологии (Hiesenberg and Böhl, 1979), фиксировали в течение 4-х час в 4% параформальдегиде, и заливали в парафин. Срезы толщиной 7 мкм подвергали депарафинизации и процедуре выявления антигенов в микроволновой печи (10 мин в 0.03 М цитратном буфере). После блокировки срезов в 10% нормальной сыворотке для выявления первичных антител к LIM-киназе 1 человека в разведении 1:500 использовали вторичное FITC-конъюгированное антитело в разведении 1:400 (goat LIMK1, donkey-anti-goat IgG-FITC, donkey serum, Santa Cruz). Для иммунофлуоресцентного изучения личиночных тканей выделение слюнных желез проводили на стадии предкуколки в PBT (0,1% Triton X-100 в PBS PH7,5), фиксировали в 3,7% параформальдегиде на 1% Triton X-100 в PBS PH7,5 в течение 10-30 с и в 2% параформальдегиде на 45% уксусной кислоте 2-3 мин. После

замораживания покровные стекла скалывали и препараты промывали в двух сменах PBS PH7,5 в течении 15 мин. Блокировку производили 1 час в 10% сыворотке на PBT. Первичное антитело в разведении 1:500 (goat LIMK1, rabbit p-cofilin, Santa Cruz) в 1,5% сыворотке на PBT инкубировали во влажной камере на ночь при температуре 4С. После отмытки в PBS 3 раза по 5 мин., инкубировали вторичное антитело (donkey-anti-goat IgG-FITC; donkey-anti-rabbit IgG-RHODAMINE, Santa Cruz) в разведении 1:400 в 1,5% сыворотке на PBT в течение 1 часа. После трехразовой отмытки в PBS окрашивали DAPI в течении 5 мин. Заключенные в среду Vectashield (Vector Laboratories) для сохранения флуоресценции препараты изучали с помощью флуоресцентного микроскопа МИКМЕД 11, FITC-фильтр. Изображения срезов вводили в компьютер (черно-белая цифровая видеокамера с накоплением cX05 Baumer Optronic) и анализировали с использованием программного обеспечения FISH-ВидеоТест С. Петербург.

Эктопическое спаривание и асинапсис политечных хромосом. Использовали стандартную методику приготовления давленных препаратов слюнных желез личинок дрозофилы III возраста и ацето-орсеинового окрашивания. Частоты формирования негомологичных (эктопических) контактов (ЧЭК) и асинапсиса для каждого района рассчитывали по отношению к общему числу проанализированных ядер и выражали в процентах. Межлинейные различия выражали в процентах и оценивали критерием t-dif. Всего для каждой линии проанализировано от 40 до 50 особей, по 10-20 ядер в каждой.

Применение Конго Ред – красителя для диагностики амилоидных отложений. Препараты слюнных желез личинок или мозга имаго дрозофилы, приготовленные вышеописанным способом подвергали окраске Конго Ред в модификации Путчлера с параллельным окрашиванием гематоксилином по Майеру для выявления розово-красных амилоидных отложений и окрашенных голубым ядер (Elghetany and Saleem, 1988). Препараты заключали в среду Entellan-New. Частоту появления особей с Конго Ред-позитивными включениями выражали в процентах и межлинейные различия выявляли критерием t-dif.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Распределение LIMK1 по зонам мозга у гомозигот и гемизигот по гену *agnostic* до и после температурного воздействия.

Иммуно-флуоресцентное изучение распределения LIMK1 по зонам мозга дрозофилы выявляет ее преимущественную локализацию в центральном комплексе и в зрительной системе у нормальных мух линии CS (рис.1). У *agn^{ts3}* наблюдается резкое увеличение экспрессии LIMK1 во всех зонах мозга. Подобные изменения происходят у CS после

экспозиции при 29⁰С (2 час). Гемизиготность по гену LIMK1, аналогичная наблюдаемой при синдроме Уильямса у человека, приводит к тому, что LIMK1 обнаруживается

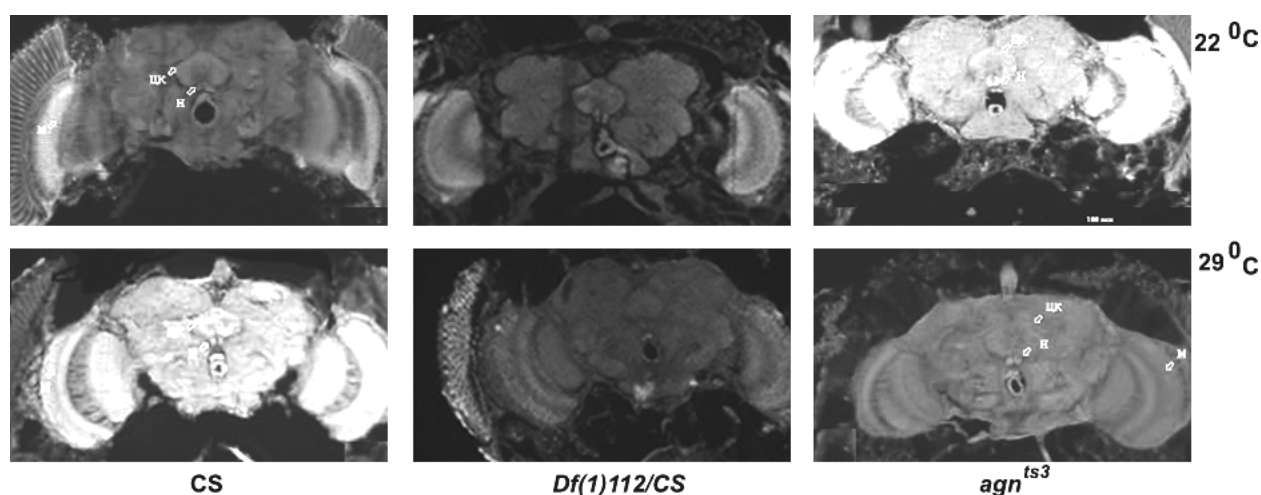


Рис.1. Распределение LIMK1 по зонам мозга.
Обозначения: ЦК - центральный комплекс мозга; Н – нодули; М- медула

исключительно в зрительной системе и теряет зависимость от температурного воздействия. По-видимому, подобными перераспределениями локализации LIMK1 в зонах мозга объясняются когнитивные нарушения зрительно-пространственной ориентации при синдроме Уильямса. Выявляемые у *agn^{ts3}* когнитивные нарушения при условно-рефлекторном подавлении ухаживания могут быть результатом повышенной экспрессии LIMK1.

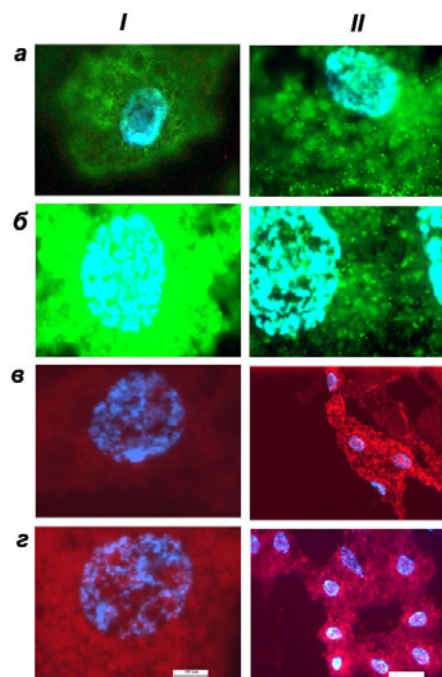
2. Характер распределения LIMK1 и р-кофилина в слюнных железах у CS и *agn^{ts3}* до и после температурного воздействия.

Иммуно-гистохимические исследования (рис.2) свидетельствуют о повышенной экспрессии LIMK1 в слюнных железах мутантов *agn^{ts3}* по сравнению с контролем. Также для *agn^{ts3}* характерно аномальное распределение LIMK1 в клетках слюнных желез – крупными метками в ядре и цитоплазме, в то время как у CS LIMK1 формирует состоящие из мелких меток структуры, подобные цитоскелетным. Продемонстрирована повышенная активность LIMK1 линии *agn^{ts3}*, которая выражается в высоком содержании р-кофилина по сравнению с CS. После температурного воздействия межлинейные различия *agn^{ts3}* и CS практически нивелируются за счет увеличения окрашивания антителами к LIMK1 у линии CS и, напротив, уменьшения размеров метки у *agn^{ts3}*. При этом для обеих линий характерна ядерно-цитоплазматическая локализация LIMK1. В обоих случаях показано усиление активности LIMK1, что выражается в увеличении яркости свечения меченного р-кофилина. Проведенный в нашей лаборатории ПЦР-анализ гена LIMK1 выявил

полиморфизм среди линий дикого типа и у *agn^{ts3}*. За пределами гена, в 3'-нетранслируемом районе, у *agn^{ts3}* была обнаружена вставка. Можно предположить, что повреждение 3'-нетранслируемого района мутантной линии скажется на посттранскрипционной регуляции гена *agnostic* с помощью микро РНК (miR-134).

Рис. 2. Иммунофлуоресцентное выявление LIMK1 (а-б) и фосфорилированного кофилина (в-г) в слюнных железах личинок линий дикого типа и мутантов *agn^{ts3}* до (I) и после действия ТШ (II).

а- LIMK1 у Canton-S; б - LIMK1 у *agn^{ts3}*; в – р-кофилин у Canton-S; г- р-кофилин у *agn^{ts}*. Результирующее изображение: зеленый цвет - LIMK1, FITC; красный цвет - р-кофилин, RHODAMIN; сине-голубой – окраска DAPI хромосом ядер. Калибровочный маркер (белый прямоугольник) – 100 мкм.



Известно, что miR-134 частично комплементарна нетранслируемому 3' району LIMK1 (3'UTR) и регулирует трансляцию иРНК для LIMK1 (Schratt et al.,2006). По-видимому, сбоями в регуляции можно объяснить повышенное содержание LIMK1 у *agn^{ts3}*. Дальнейшие эксперименты по секвенированию гена и его 3' района позволят прояснить этот вопрос.

3. Частота формирования эктопических контактов (ЧЭК) районами интеркалярного гетерохроматина (ИГХ) в левом плече хромосомы 2 (2L) слюнных желез у CS и *agn^{ts3}* при разнонаправленных температурных воздействиях.

При 22°C наблюдаются высокие межлинейные различия по ЧЭК, как показателя конформационного состояния гетерохроматиновых районов хромосом. ИГХ в *agn^{ts3}* вступает в эктопическое спаривание достоверно чаще по сравнению с двумя линиями дикого типа CS и Or-R (рис.3а). При этом ЧЭК в гетерозиготе по гену *agnostic* зависит от направления скрещивания и, таким образом, по этому признаку наблюдается материнский эффект. Рис.3б демонстрирует увеличение ЧЭК также и при гемизиготном состоянии гена, независимо от того какая хромосома находится в компаунде с делецией – дикого

типа, мутанта *agn^{ts3}*, Р-инсерционного мутанта. Таким образом, существует связь между увеличением ЧЭК и изменением дозы гена, а так же нарушением его структуры. Следовательно, ген *agnostic* вовлечен в механизмы формирования негомологичных контактов.

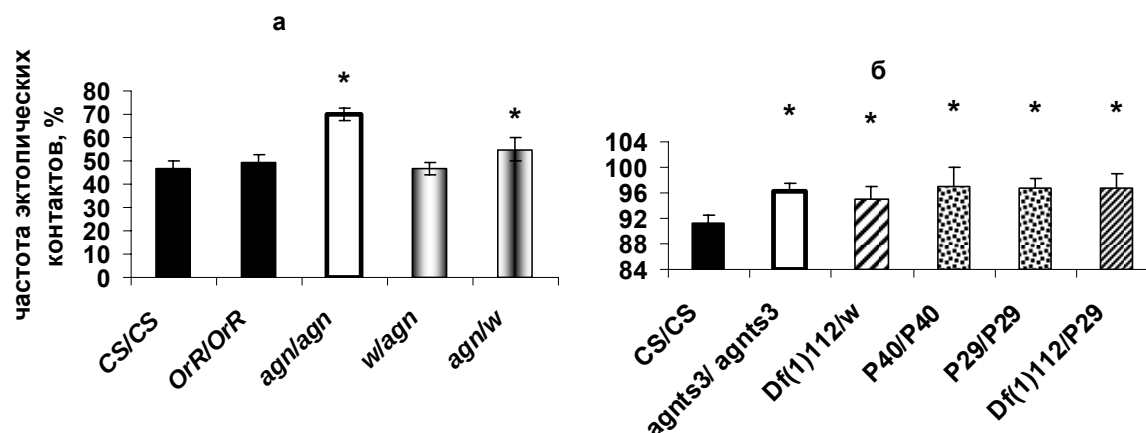


Рис. 3. Частота формирования эктопических контактов у разных линий.

При разнонаправленных температурных воздействиях (15°C , 29°C , 37°C) на эмбриональную и личиночные стадии развития выявлены чувствительные периоды формирования ЧЭК. У CS это первый 4.5- часовой период после откладки яйца, выявляемый при 37°C по увеличению ЧЭК. Температурное воздействие на вторую половину эмбрионального развития - стадию интенсивного органогенеза (Марвин, 1975), не изменяет ЧЭК. По современным представлениям для формирования гетерохроматина необходима транскрипция соответствующего района хромосомы (Hoskins et al., 2002; Lippman et al., 2004). Поэтому мы предполагаем, что именно в период начала транскрипции зиготических генов возможна модификация свойств гетерохроматиновых районов, что и подтверждают наши данные. У *agn^{ts3}* ранняя эмбриональная стадия оказалась нечувствительной к 37°C , снижение ЧЭК в ответ на воздействие 15°C наблюдается на I и II личиночных стадиях. По-видимому, в первые часы развития происходит закладка гетерохроматина, а на личиночных стадиях свойства гетерохроматина могут быть модифицированы в сторону большей или меньшей компактизации ранее сформированной «закрытой» конформации гетерохроматина при помощи соответствующих белковых комплексов. Исходя из того, что именно эмбриональная стадия оказывается нечувствительной к температурному воздействию у *agn^{ts3}*, можно предположить, что мутационное повреждение гена приводит к нарушению формирования гетерохроматиновых районов хромосом. Гетерохроматин *agn^{ts3}* приобретает повышенную конъюгационную способность, которую невозможно модифицировать на этой стадии развития. Полученные результаты по формированию ЭК на стадии бластодермы

согласуются с данными изучения процессов гетерохроматинизации при эффекте положения, для которого критичными являются первые 3 час развития эмбриона (Vlassova et al., 1991). Совпадение критических сроков распространения эффекта положения по хромосоме и формирования ЭК, а также их однонаправленность, свидетельствуют как о связи этих двух явлений, так и об усилении гетерохроматиновых, репрессирующих, свойств под действием температуры. Таким образом: 1) частота формирования негомологичных контактов является таким же показателем степени генетической репрессии этих участков, как и эффект положения; 2) ген *agn^{ts3}* принимает участие в репрессивных механизмах, так как мутационное повреждение гена увеличивает ЧЭК и нарушает механизмы формирования гетерохроматина. Это выражается в снижении ЧЭК и модификации чувствительных периодов при температурном воздействии.

3. Частота асиапсиса и сопоставление частот гомологичного и гетерологичного синапсиса (ЧЭК) в политенных хромосомах у CS и *agn^{ts3}* с целью выявления различий в хромосомной организации ядра.

Опосредуя функции транскрипционных факторов (Scott, Olson, 2007; Schul et al., 1998; Jacobs, 1999) и комплексов ремоделирования хромосом (Olave et al., 2001), LIMK1 и функционально связанный с ней актин участвуют в работе подвижных компартментов ядра. Известно, что эти белковые компартменты осуществляют и структурную функцию, организуя в пространстве активные домены хромосом. Кроме того, те же подвижные ядерные домены принимают участие в формировании гетерохроматина, который в свою очередь, является основным структурообразующим фактором ядра. Таким образом, аппарат ремоделирования актина обуславливает организацию в ядре активных, и репрессированных районов хромосомы. Изучая роль LIMK1 в пространственной организации ядра, мы предположили, что его характеристикой может служить частота асиапсиса и особенности распределения асиаптированных зон. В гомологичное спаривание (синапсис) вступают как эу- так и гетерохроматиновые районы, и межлинейные различия способны вскрыть модификацию и тех, и других. Как представлено на рис. 4, сам феномен асиапсиса происходит у *agn^{ts3}* почти в 2,5 раза реже, чем у CS. Анализ межлинейных различий по распределению ЭК и асиаптированных зон по длине X-хромосомы и 2L показал, что за незначительным исключением, районы, демонстрирующие повышенную ЧЭК, редко асиаптируются. Для всех хромосом выявлены "точки слома" (гетерохроматиновой природы) характеристик асиапсиса, обусловленные резким изменением частот асиапсиса в одной или в обеих изучаемых

линий. Известно, что районы ИГХ связаны с ядерной мембраной эктопическими нитями (Mathog et al., 1984).

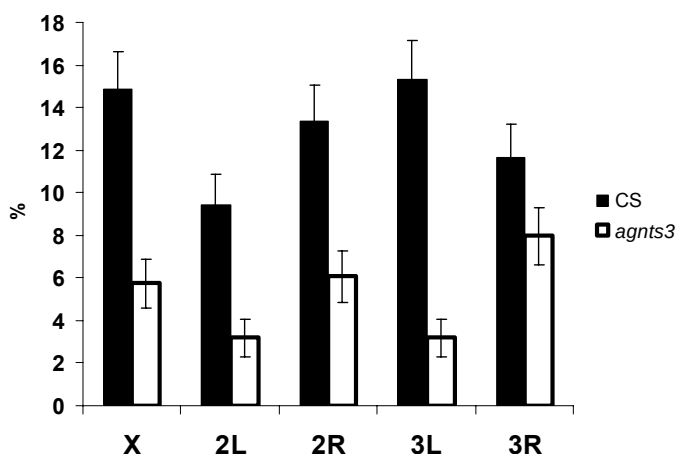


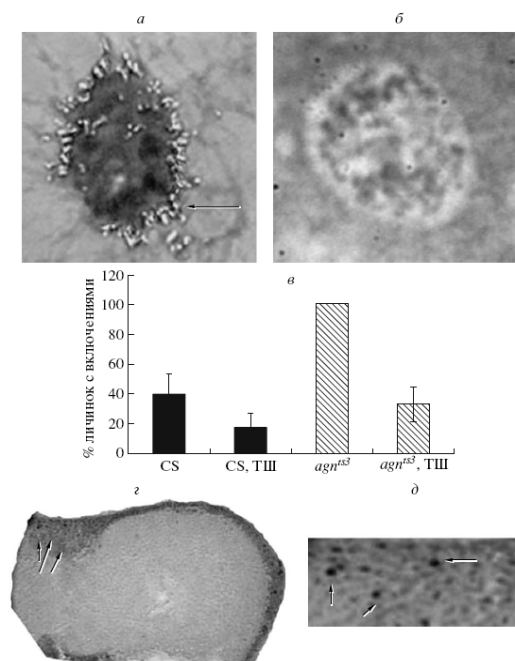
Рис. 4. Межлинейные различия по частоте формирования асиапсиса отдельными хромосомами

Поэтому вероятно, что относительно "точек слома" возможно перемещение ограниченного ими участка хромосомы в альтернативные территории ядра. Перемещение способствует изменению свойств интерстициального участка хромосомы, что приводит к изменениям интимности синапсиса гомологичных хромосом. Наши результаты подтвердили наблюдения об индивидуальности каждого плеча хромосом по распределению терминальных точек и частоте возникновения асиапсиса (Полянская, 1976). Впервые выявлены межхромосомные различия по соотношению асиапсисов разной протяженности. Они могут быть короткими (до 5 секций), средними (5 - 10 секций), длинными (10 - 15 секций) и почти полностью асиаптированные плечи хромосом (15 - 20 секций). В хромосомах CS и *agn^{ts3}* обнаружены сильные межлинейные различия по всем характеристикам асиапсиса. Так как для *agn^{ts3}* характерно увеличение ЧЭК и, в то же время, резко сниженная частота асиапсиса, то можно предположить наличие связи между анализируемыми признаками: вовлечение ИГХ в гомологичное спаривание, а также - участие в этих процессах гена *agnostic*. По-видимому, модификации асиаптированного состояния складываются из двух факторов: 1) при сходном распределении длинных и коротких асиапсисов межлинейные различия его частот будут зависеть от того, в какой компартмент ядра попадет интерстициальный, ограниченный терминальными точками, район; 2) в случае межлинейных различий, касающихся распределения длин асиапсиса большее значение приобретает состояние гетерохроматина и его прикрепленность к мембране или ядерному матриксу (Mathog et al., 1984). На основе полученных нами данных возможно построение теоретических моделей пространственной организации хромосом в ядре.

4. Частота появления особей с Конго Ред-позитивными включениями у CS и agn^{ts3} , отражающих нарушения каскадов сигнальной трансдукции в норме и при температурном шоке.

Амилоидо-подобные включения, выявляемые диагностическим красителем Конго Ред, возникают при системных нарушениях функций клетки и целого организма. В мозге имаго CS включений не наблюдается, в то время как у agn^{ts3} обнаружены конгофильные агрегаты как при нормальной температуре, так и после ТШ (рис. 5).

Рис. 5. Конго Ред-позитивные включения у личинок (а-в) и имаго (г-д).
 а – нормальная температура, личинки agn^{ts3} ;
 б - личинки agn^{ts3} через 1 час после ТШ;
 в – процент личинок с включениями;
 Черные столбики – Canton-S
 Заштрихованные столбики -- agn^{ts3} ;
 г – включения в клеточной протоцеребральной массе;
 д – то же, увеличено
 Стрелками обозначены включения



В тканях личинок включения встречаются и у CS (40%), но у agn^{ts3} присутствуют у всех проанализированных особей. Таким образом, наблюдаемое у agn^{ts3} повышенная экспрессия LIMK1 и р- кофилина приводит к сбоям в динамике актинового цитоскелета и формированию амилоидных агрегатов. Такие агрегаты, окруженные комплексом актин-кофилин, равно как и собственно «актиновые» включения, обнаружены при болезни Альцгеймера (Minamide et al., 2000). Тепловой шок (ТШ) вызывает резкое уменьшение частоты включений у agn^{ts} , что хорошо согласуется с результатами иммунохимического исследования экспрессии LIMK1 в слюнных железах личинок, когда ТШ приводит к снижению уровня LIMK1 у agn^{ts3} . Показано наличие корреляции между частотой амилоидных включений и успешностью обучения у самцов. У agn^{ts3} по сравнению с диким типом при 22°C резко подавлены 3-х часовая память и способность к обучению. При ТШ на стадии предкуколки обучение и память восстанавливаются до уровня дикого типа. По-видимому, улучшение когнитивных способностей agn^{ts3} связано со снижением частоты амилоидных включений после ТШ на стадии формирования центрального комплекса мозга. Выявленная связь мутационного повреждения гена *agnostic*, изменение

экспрессии и активности LIMK1, наличие амилоидных включений и нарушений в когнитивной сфере, позволяет использовать данную модель для изучения как нейродегенеративных заболеваний, так и геномных болезней.

Результаты исследования свидетельствуют о существовании еще мало изученного уровня сигнальной трансдукции. Гены сигнальных каскадов, локализованные в гетерохроматине, подобно *limk1*, регулируют экспрессию генов при формировании памятного следа и обучения не только посредством активации эффекторных молекул, но и перестраивая генетический аппарат, именно в силу особенностей своей локализации. Возможно, этим объясняется согласованность биохимических каскадов в процессах адаптации и в ответ на стрессорные воздействия.

ВЫВОДЫ.

1. Иммуно-флуоресцентное изучение распределения по зонам мозга дрозофилы LIMK1, ключевого фермента сигнального каскада ремоделирования актина, выявляет его преимущественную локализацию в центральном комплексе мозга и в зрительной системе. Мутационно-обусловленное повреждение гена LIMK1, (мутация *agn^{ts3}*) приводит к резкому увеличению активности LIMK1 во всех зонах мозга. Такой же эффект вызывает у нормальных мух воздействие повышенной температурой (29⁰ C).
2. Гемизиготное состояние гена LIMK1, как и при синдроме Уильямса у человека, приводит у дрозофилы к изменению распределения LIMK1 по зонам мозга. Фермент локализуется исключительно в зрительной системе и теряет зависимость от температурного воздействия.
3. Иммуно-флуоресцентное изучение распределения LIMK1 и фосфорилируемого этим ферментом кофилина (p-кофилина) в клетках слюнных желез личинок дрозофилы выявляет их преимущественно цитоплазматическую локализацию в норме. Тепловой шок вызывает перемещение компонентов сигнального каскада ремоделирования актина в ядро и приводит к резкому увеличению активности LIMK1 и p-кофилина. Мутационно-обусловленное повреждение гена LIMK1 (мутация *agn^{ts3}*) увеличивает содержание и активность LIMK1, которое падает после теплового шока.
4. Мутационно-обусловленное повреждение гена LIMK1 (ЭМС и Р-инсерционные мутации по гену *agnostic*) влияет на конъюгационные свойства хромосом у дрозофилы: резко увеличивает частоту формирования эктопических контактов районами интеркалярного гетерохроматина в политенных хромосомах слюнных желез. Гемизиготность по гену, как при синдроме Уильямса у человека, воспроизводит мутантный фенотип.

5. При разнонаправленных температурных воздействиях выявлены критические периоды эмбрионального (формирование гетерохроматина) и пост-эмбрионального (модификация свойств гетерохроматина) развития дрозофилы в отношении конъюгационных свойств хромосом. Воздействие на эти стадии в норме приводит к увеличению частоты формирования эктопических контактов. Мутационно-обусловленное повреждение гена LIMK1 нарушает чувствительность эмбриональной стадии к температурным воздействиям и приводит к снижению частоты эктопического спаривания на личиночных стадиях развития, что свидетельствует об участии гена *agnostic* в формировании гетерохроматина.
6. Ген *agnostic* вовлечен в механизмы гомологичного синапсиса хромосом, что выражается в резком снижении частоты асинапсиса в линии *agn^{ts3}* и аномалиях распределения длинных и коротких асинапсисов по длине хромосомы. Это указывает на различия локализации в ядре хромосомных плеч относительно друг друга в норме и у *agn^{ts3}*, т.е. на разные способы формирования пространственной 3х-мерной организации ядра.
7. Мутационно-обусловленные нарушениями сигнального каскада ремоделирования актина приводят к формированию амилоидо-подобных агрегатов в мозге имаго и в личиночных тканях всех особей *agn^{ts3}*. Частота встречаемости агрегатов снижается до уровня нормы после теплового шока. Это коррелирует со способностью к обучению и формированию памяти при условно-рефлекторном подавлении ухаживания: резкие дефекты у мутантов *agn^{ts3}* восстанавливаются при действии теплового шока.

Публикации по теме диссертации.

Статьи:

1. Фельчер А.В., Стефанова В.Н., Дукельская А.В., Смирнов А.В. Изучение закономерностей специфической деконденсации гетерохроматиновых районов митотических хромосом дрозофилы // Цитология.- 1981.- Т. 10.- С.
2. Smaragdov M.G., Smirnov A.F., Felcher A.V., Dukelskaya A.V. Condensation and interchromosomal heterogeneity of *Drosophila melanogaster* heterochromatin // DIS.- 1981.- V. 56.- С. 127.
3. Smirnov A.F., Chiraeva O.G., Felcher A.V., Stefanova V.N., Dukelskaya A.V. Specific decondensation of heterochromatic regions of *Drosophila* chromosomes – intrachromosomal and genomic control // Genetica.- 1986.- V. 71.- P. 225-231.
4. Медведева А.В., Савватеева Е.В. Влияние ts-мутаций по гену *agnostic*, контролирующему функции кальмодулина и способность к обучению, на эктопическую конъюгацию политенных хромосом у дрозофилы // Докл. АН СССР.- 1991.- Т. 318.- С. 733 – 736.
5. Медведева А.В., Савватеева Е.В. Влияние температуры на пространственную организацию политенных хромосом мутантов дрозофилы с измененными функциями кальмодулина // Докл. АН СССР.- 1991.- Т. 318.- С. 988 – 991.
6. Savvateeva E., Peresleny I., Peresleny A., Tokmacheva E., Medvedeva A., Sharagina L.

- Behavioral and biochemical effects of the *agnostic* gene mutations // J. Neurogenetics.- 1993.- V.8.- P.247-248.
7. Медведева А.В., Токмачева Е.В., Савватеева Е.В., Корницкий В.С. Особенности организации генома дрозофилы у мутантов с изменениями метаболизма вторичных посредников и способности к обучению // Физиол. Журн., 1995, Т.81, № 8, С.90-93
Medvedeva A.V., Tokmacheva E.V., Savvateeva E.V., Kornitskii V.S. Organization of the *Drosophila* genome in mutants with changes in second messenger metabolism and learning ability // Neurosci. Behav. Physiol.- 1997.- V.27.- P.272-274.
 8. Савватеева-Попова Е.В., Переслени А. И., Шарагина Л. М., Медведева А. В., Корочкина С.Е., Григорьева И.В., Дюжикова Н.А., Попов А.В., Баричева Е. М., Карагодин Д., Хайзенберг М. Особенности архитектуры X-хромосомы, экспрессии LIM - киназы 1 и рекомбинации у мутантов дрозофилы локуса *agnostic*: модель синдрома Уильямса человека // Генетика.- 2004.- Т.40.- № 6.- С.749-769.
 9. Савватеева-Попова Е.В., Переслени А.И., Шарагина Л.М., Токмачева Е.В., Медведева А.В., Камышев Н.Г., Попов А. В., Озерский П.В., Баричева Е.М., Карагодин Д., Хайзенберг М. Комплексное изучение мутантов *Drosophila melanogaster* по локусу *agnostic*: модель для сопряжения нарушений архитектуры генома и когнитивных функций // Журн. Эвол. Биохим. Физиол.- 2002.- Т.38.- № 6.- С.557-577.
 10. Savvateeva-Popova, E.V., Popov, A.V., Nikitina, E.A., Medvedeva, A.V., Peresleni, A.I., Korochkin, L., Grossman, A.I., Pyatkov, K.I., Zatssepina, O.G., Zelentsova, E.S., Evgen'ev, M.B., Pathogenic chaperone-Like RNA induces congophilic aggregates and facilitates neurodegeneration in *Drosophila*. // *Cell Stress & Chaperones*.- 2007.- V.12.- P.9-19.
 11. Медведева А.В., Молотков Д.А., Никитина Е.А., Попов А.А., Карагодин Д.А., Баричева Е.М., Савватеева-Попова Е.В. Системная регуляция генетических и цитогенетических процессов сигнальным каскадом ремоделирования актина: локус *agnostic* дрозофилы // Генетика.- 2008.- Т.44.- №.6.- С.669-681.
- Избранные тезисы:
1. Савватеева Е.В., Переслени И.В., Переслени А.И., Медведева А.В. Генетический контроль внутриклеточных регуляторов (циклические нуклеотиды – Ca^{2+} - калмодулин) у дрозофилы // Тез. Докл. 5 Съезда ВОГиС.- 1987.- Т.1.- С.241-242.
 2. Медведева А.В., Савватеева Е.В. Роль вторичных посредников в структурно-функциональной организации хромосом интеркалярного гетерохроматина дрозофилы // Тез.докл. 3 школы по генетике и селекции животных, Бийск.- 1989.- С.80.
 3. Savvateeva-Popova E., Peresleni A., Medvedeva A., Grigorieva I., Popov A., Baricheva E., Heisenberg M. The *Drosophila agnostic* locus as a model for human Williams syndrome // Простые нервные системы, Калининград.- 2003.- С.99.
 4. Савватеева-Попова Е.В., Переслени А.И., Медведева А.В., Токмачева Е.В., Никитина Е.А., Шарагина Л.М., Комарова А.Ю., Ильиных Ю.Ф., Молотков Д.А., Попов А.В. Нейротрофины – факторы пластичности нервной системы и генотерапия нейродегенеративных болезней человека // Материалы XIX Съезда физиологов России Екатеринбург.- 2004.- С.121.
 5. Molotkov D., Medvedeva A., Nikitina E., Savvateeva-Popova E. From structure of the LIMK 1 gene to cognitive disorders: a *Drosophila* model for defective actin remodelling // J. Neural Transmission. Abstracts of 39th International Danube Symposium and 1st International Congress on ADHD. Würzburg, Germany - 2007.- Vol.114.- №. 7.- P.CXIV.
 6. Molotkov D., Kaminskaya A., Medvedeva A., Nikitina E., Popov A., Savvateeva-Popova E. (2007) Cognitive and locomotor deficits accompanied by congophilic aggregate formation in the *Drosophila* model for defective actin remodeling. Proceedings of the XVII WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, 9-13 December, Amsterdam RAI, Netherlands, session 2.022.