

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

На правах рукописи

НИКИТИНА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ФИЗИОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ
ПАТОГЕНЕЗА НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С
ПРИВЛЕЧЕНИЕМ МОДЕЛЕЙ НА ДРОЗОФИЛЕ**

03.03.01 – физиология

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург

2015

Работа выполнена в лаборатории нейрогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П.Павлова Российской академии наук

Научный консультант: **Савватеева-Попова Елена Владимировна**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Балабан Павел Милославович**
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
директор, заведующий лабораторией клеточной нейробиологии обучения
Клименко Виктор Матвеевич
доктор медицинских наук, профессор
НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург
заведующий Физиологическим отделом им. И.П. Павлова, заведующий лабораторией нейробиологии интегративных функций мозга
Саранцева Светлана Владимировна
доктор биологических наук
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ Курчатовский институт, Гатчина
заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией экспериментальной и прикладной генетики

Ведущее учреждение: Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск

Защита состоится «___» _____ 2015 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций при Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН (Д 002.020.01). 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института физиологии им. И.П.Павлова РАН.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 002.020.01
доктор биологических наук

Н.Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Актуальной проблемой современной нейронауки является понимание этиологии и прогрессирования спорадических нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), таких как болезнь Альцгеймера (БА), Паркинсона (БП), Хантингтона (БХ), прионных болезней и делеционно-дупликационных синдромов, называемых многофакторными болезнями (МБ). МБ являются результатом сложного взаимодействия неблагоприятных внешних факторов и индивидуальных особенностей генома, предрасполагающих к развитию болезни.

Среди диагностических признаков НДЗ выделяют три основных, выраженных при разных заболеваниях в различной степени: 1) нарушение памяти, 2) моторную дисфункцию и 3) образование белковых агрегатов. Именно эта триада симптомов должна быть воспроизведена при создании животных моделей НДЗ. Сами эти модели необходимы в связи с тем, что этиология НДЗ остается малопонятной, часто окончательная постановка диагноза возможна только на посмертных образцах мозга пациентов. Животные модели, особенно с коротким жизненным циклом, позволяют изучать механизмы функциональных нарушений, лежащих в основе НДЗ человека, большинство из которых являются болезнями старения, и помогают в разработке терапевтических подходов. К таким модельным объектам относится дрозофила.

Секвенирование геномов человека и дрозофилы выявило, что более 70% локусов человека, связанных с развитием наследственных заболеваний, имеют аналоги у *D. melanogaster* (Reiter et al., 2001). Молекулярная основа патологических процессов, влекущих развитие НДЗ и иных функциональных расстройств, едина у млекопитающих и высших беспозвоночных. Головной мозг дрозофилы является достаточно высокоорганизованной структурой, обеспечивающей реализацию всех базовых форм когнитивной активности. Это обуславливает удобство использования дрозофилы в качестве модельного

объекта при изучении молекулярно-физиологических механизмов нормальных и патологических процессов, протекающих в центральной нервной системе (ЦНС). Важным направлением исследований после завершения проектов «Геном человека» и «Геном дрозофилы» стал анализ проявлений мутаций генов дрозофилы для установления функции гомологичных генов болезней человека и выявление групп тех генов, дисфункция которых провоцирует развитие полигенных заболеваний, к которым относятся НДЗ (Савватеева-Попова и др., 2002).

Важнейшую роль в обеспечении пластичности нервной системы играет реорганизация актинового цитоскелета. Ключевым ферментом этого процесса является LIMK1 (Bamburg, Bloom, 2009). LIMK1 регулирует ремоделирование актина за счет фосфорилирования кофилина и перевода его в неактивную форму (Yang et al., 2000). Это вызывает перестройку шипиков дендритов и модификацию аксонов, обеспечивая синаптическую пластичность - основу процессов обучения и памяти. НДЗ относят к болезням цитоскелета – кофилинопатиям, поскольку образование кофилин-актиновых комплексов в нейронах свойственно для всех НДЗ, что нарушает везикулярный транспорт (Bamburg, Zheng, 2010). Биоинформационный анализ нуклеотидной последовательности гена *limk1* *D. melanogaster* выявляет 71% гомологии с геном *H. sapiens* (National Centre for Biotechnology Information). В связи с этим, использование дрозофилы в качестве модели для исследования механизмов функционирования данного каскада, а также поиска способов влияния на его работу является важной научно-практической задачей.

Кроме того, LIMK1 представляет собой центральный узел взаимодействия между различными генными сетями, участвующими в регуляции функциональных процессов мозга в норме и при патологии. Начальным звеном системы ремоделирования актина является глутаматэргический сигнальный каскад (Shi, Ethell, 2006). Функционирование основного рецепторного субтипа этого каскада – N-метил-D-аспаратных (NMDA) рецепторов – рассматривают как молекулярно-физиологическую

основу процессов обучения и памяти (Cull-Candy et al., 2001). Важным эндогенным лигандом NMDA-рецепторов служит метаболит кинуренинового пути обмена триптофана (КПОТ) – кинуреновая кислота. Метаболиты КПОТ (кинуренины) участвуют в возникновении и течении многих заболеваний, например, воспалительных и дегенеративных болезней нервной системы (энцефалитов и менингитов, БА, БП, БХ), СПИДа, диабета и др. (Лапин, 2004). Однако, механизмы нейрофизиологической активности кинуренинов остаются не до конца изученными.

Нельзя упускать из вида и столь важный компонент регуляции активности LIMK1 как система белков теплового шока (БТШ). БТШ90 необходим для поддержания стабильности белка LIMK1, вызывая димеризацию и трансфосфорилирование фермента (Li et al., 2006). При дефектах синтеза БТШ происходят нарушения укладки и транспорта белков, в том числе и участвующих в процессах формирования памяти, а также образование белковых агрегатов, являющихся одним из диагностических симптомов НДЗ.

Выявление генов и исследование молекулярных механизмов их участия в реализации и контроле моторных и когнитивных функций у модельного объекта – дрозофилы подразумевает идентификацию ключевых генов и генов-модификаторов многофакторных заболеваний и анализ взаимосвязи аллелей этих генов с определенной болезнью. Это служит для разработки превентивных мер для индивидуумов с высокой степенью риска, и, следовательно, предиктивной медицины и генетического паспорта.

Для молекулярной медицины XXI века крайне важны не только генетические, но и эпигенетические аспекты нейродегенеративных и геномных болезней. Сложные взаимодействия между различными генными путями для МБ требуют высокоточной эпигенетической регуляции, одним из ведущих факторов которой являются микроРНК. МикроРНК способны специфически регулировать процессы модификации ДНК и хроматина, что является важным

звеном, связывающим эпигенетические механизмы с процессами синаптической пластичности и памяти (Vogel-Ciernia, Wood, 2014).

Таким образом, новые комплексные подходы к раскрытию механизмов нейродегенеративных и геномных заболеваний внесут вклад в развитие персонализированной и предиктивной медицины.

Цели и задачи исследования. Цель настоящей работы - проведение комплексного физиолого-генетического анализа когнитивных и моторных нарушений и выявление их молекулярных механизмов с использованием мутантных и трансгенных линий дрозофилы в качестве экспериментальных моделей нейродегенеративных заболеваний.

Для достижения данной цели были выдвинуты следующие задачи:

1. Выяснить особенности формирования среднесрочной и долгосрочной памяти при изменении компонентов генных сетей регуляции функциональных процессов мозга у мутантов дрозофилы и трансгенных линий, несущих гены человека для нейротрофических факторов, а также некодирующих РНК.

2. Изучить двигательную активность линий, несущих мутации в рецепторной и эффекторной частях сигнального каскада ремоделирования актина.

3. Выявить особенности распределения компонентов сигнального каскада ремоделирования актина и формирования белковых агрегатов в различных органах у мутантных и трансгенных линий дрозофилы.

Научная новизна. Абсолютно новым является комплексный подход к изучению диагностических признаков НДЗ, сочетающий методы анализа формирования памяти, а также локомоторной активности (с использованием оригинальных установок), иммуногистохимический анализ распределения компонентов сигнальных каскадов в различных органах дрозофилы (в том числе с использованием конфокальной микроскопии), молекулярно-генетические методы и биоинформационный анализ.

Новыми и не имеющими аналогов являются как данные о способности к обучению и формированию среднесрочной и долгосрочной памяти, так и

данные о двигательной активности при изменении компонентов генных сетей регуляции функциональных процессов мозга у мутантов дрозофилы.

Новыми и оригинальными являются данные о распределении компонентов сигнального каскада ремоделирования актина в различных органах дрозофилы. Выявлены ранее неизвестные pCREB-обогащенные нейрональные структуры, возможно, участвующие в формировании долгосрочной памяти при условно-рефлекторном подавлении ухаживания. Также впервые была показана вненейрональная локализация p-кофилина в области нейромышечных контактов дрозофилы, свидетельствующая о вовлеченности глии в функционирование сигнального каскада ремоделирования актина.

Получены новые нетривиальные данные о различном соотношении D- и C-изоформ LIMK1 у линий, проявляющих полиморфизм в гене *limk1*, что очень важно, поскольку обычно при изучении LIMK1 не учитывается представленность этого фермента несколькими изоформами с различной протеинкиназной активностью.

Впервые в результате секвенирования выявлены дефекты в структурных и регуляторных участках гена *limk1*, приводящие к изменениям моторных и когнитивных функций. Также установлены точное положение и характер вставки транспозона семейства Tc1/mariner, расположенной в 3'-UTR гена *limk1* у мутанта *agn^{ts3}*.

Получены принципиально новые данные об эпигенетической регуляции гена *limk1* – вставка транспозона семейства Tc1/mariner у *agn^{ts3}* создает 8 новых сайтов связывания микроРНК.

Теоретическая и практическая значимость. Работа посвящена исследованию фундаментальной проблемы нейробиологии, связанной с раскрытием механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Совокупность полученных данных имеет весомое значение для развития современных воззрений на взаимодействие между различными генными сетями, участвующими в регуляции функциональных процессов мозга в норме

и при патологии. На основании проведенных исследований обосновывается положение о том, что нейродегенеративные и геномные заболевания имеют одну и ту же общую точку пересечения - сигнальный каскад ремоделирования актина: рецепторы нейротрансмиттеров — малые ГТФазы Rho-семейства — LIM киназа 1 (LIMK1) – кофилин — актин, что существенно расширяет современные теоретические представления о механизмах нейродегенерации.

Теоретическая значимость диссертационного исследования также связана с тем, что удалось не только исследовать широкий спектр генетических аспектов этиопатогенеза НДЗ, но и выявить роль микроРНК как одного из ведущих факторов эпигенетической регуляции данных заболеваний.

В настоящей работе предложен новый оригинальный комплексный подход к анализу диагностических признаков нейродегенеративных и геномных заболеваний с использованием дрозофилы в качестве модели для изучения генеза нейропатологии, что имеет важное фундаментальное и прикладное значение.

Высокая практическая значимость работы заключается в разработке моделей для экспресс-оценки действия различных фармакологических агентов на когнитивные и моторные функции дрозофилы. Разработанные методы можно использовать для поиска лекарственных препаратов, корректирующих симптомы НДЗ. Большая скорость и сравнительно невысокая цена исследований на дрозофиле делают ее идеальным объектом для предварительного экспериментального тестирования терапевтических средств. Препараты, прошедшие отбор на такой системе, можно переводить на следующий этап тестирования с использованием позвоночных животных.

Результаты проведенных исследований могут быть использованы при чтении курсов лекций по физиологии, патофизиологии, генетике, молекулярной биологии, молекулярной генетике.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Нарушения сигнального каскада ремоделирования актина являются критическими для развития нейродегенеративных и геномных болезней.

2. Генетические аспекты этиопатогенеза НДЗ, а именно такие, как эксайтотоксичность, изменение конформации клеточных белков, дефекты шаперонной защиты, нарушения актинового цитоскелета сливаются воедино, обеспечивая взаимодействие между различными генными сетями, участвующими в регуляции функциональных процессов мозга в норме и при патологии.

3. Одним из ведущих факторов эпигенетической регуляции НДЗ являются микроРНК, способные специфически направлять процессы модификации ДНК и хроматина.

Апробация результатов. Материалы исследований докладывались: на международном симпозиуме, посвященном 150-летию академика И.П. Павлова (1999, Санкт-Петербург), II съезде ВОГиС (2000, Санкт-Петербург); VI, VII, IX и X East European Conference of the international society for invertebrate neurobiology (2000, Москва – Пущино; 2003, Калининград – Светогорск; 2009, Санкт-Петербург – Колтуши; 2012, Москва); III, IV, V и VII всероссийских медико-биологических конференциях “Человек и его здоровье” (2000, 2001, 2002, 2004, Санкт-Петербург); международных симпозиумах, посвященных 75-летию и 80-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (2000, 2005, Санкт-Петербург); XVIII, XXI и XXII съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (2001, Казань; 2010, Калуга; 2013, Волгоград); международной конференции “Новые биокибернетические и телемедицинские технологии 21 века для диагностики и лечения заболеваний человека” (2002, Петрозаводск); международной конференции «Актуальные проблемы современной генетики» (2006, Москва); конференции “Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям среды” (2007, Санкт-Петербург); международной школе-конференции «Системный контроль генетических и цитогенетических процессов» (2007, Санкт-Петербург); III и IV съезде физиологов СНГ (2011, Ялта; 2014, Сочи - Дагомыс), VII Сибирском физиологическом съезде (2012, Красноярск); 11th International Conference on Alzheimer`s and Parkinson`s

Diseases (2013, Флоренция); VI Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (2013, Уфа); 6th International Conference on Drug Discovery & Therapy (2014, Дубай); всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (2014, Санкт-Петербург – Колтуши).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 115 научных работ, включая 16 статей в рецензируемых журналах.

Личный вклад диссертанта. Все результаты, представленные на защиту, получены либо лично диссертантом, либо при его непосредственном участии. Ведущим направлением экспериментальной работы автора явилось изучение процессов обучения и памяти, что послужило отправной точкой всех последующих исследований. Автор выполнял постановку целей и задач исследований, разработку экспериментальных моделей, проведение экспериментов, обработку и интерпретацию результатов.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных экспериментальных исследований и их обсуждения, общего обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 820 источников, в том числе 50 отечественных и 770 иностранных. Диссертация изложена на 460 страницах, содержит 150 рисунков и 26 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования. В работе использовали следующие линии *D. melanogaster* (Таблица 1).

Мух выращивали в стаканчиках объемом 160 мл на стандартной изюмно-дрожжевой среде при $+25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 60% влажности и свето-темновом цикле 12:12 ч.

Таблица 1 - Линии, использованные в работе

Название	Краткая характеристика	Источник получения
1	2	3
<i>Canton-S (CS)</i>	Линия дикого типа.	Коллекция лаборатории нейрогенетики ИФ РАН (получена из Bloomington Drosophila Stock Center)
<i>Berlin</i>	Линия дикого типа, выделена из природной популяции города Берлина.	Коллекция лаборатории нейрогенетики ИФ РАН (получена из коллекции кафедры генетики и нейробиологии университета г. Вюрцбурга, Германия)
<i>Oregon-R (Or-R)</i>	Линия дикого типа из природной популяции штата Орегон, США.	Коллекция лаборатории нейрогенетики ИФ РАН (получена из Bloomington Drosophila Stock Center)
<i>cardinal (cd)</i>	Линия содержит мутацию <i>cd</i> (3–75,7; ярко-красный цвет глаз), нарушающую синтез фермента феноксазинон-синтетазы, что приводит к накоплению 3-гидрокскинуруенина (3-НОК).	Коллекция лаборатории нейрогенетики ИФ РАН (получена из Bloomington Drosophila Stock Center)
<i>vermilion (v)</i>	Линия содержит мутацию <i>v¹</i> (1-33,0; ярко-красный цвет глаз), нарушающую синтез фермента триптофаноксигеназы, что приводит к отсутствию кинуруенинов и накоплению триптофана.	Коллекция лаборатории нейрогенетики ИФ РАН (получена из Bloomington Drosophila Stock Center)
<i>cinnabar (cn)</i>	Линия содержит мутацию <i>cn</i> (2–57,5; ярко-красный цвет глаз), нарушающую синтез фермента кинуруенин-3-гидроксилазы, что приводит к накоплению кинуруеновой кислоты.	Коллекция лаборатории нейрогенетики ИФ РАН (получена из Bloomington Drosophila Stock Center)
<i>agn^{ts3}</i>	Несет температурочувствительную (<i>ts</i>) мутацию по гену <i>limk1</i> (1–38,9), который кодирует ключевой фермент ремоделирования актина LIMK1.	Коллекция лаборатории нейрогенетики ИФ РАН
<i>l(1)ts403; bw; st</i>	Содержит мутации <i>l(1)ts403</i> (1-32,5; термочувствительная клеточная леталь); <i>brown</i> (2-104,5; коричневый цвет глаз); <i>scarlet</i> (3-44,0; алый цвет глаз), взаимодействие мутационных аллелей <i>brown</i> и <i>scarlet</i> дает белый цвет глаз.	Коллекция кафедры генетики и селекции СПбГУ
<i>RQ1</i>	Трансгенная линия, несущая под <i>h</i> -промотором дрозофилы единичную инсерцию RQ конструктора (3 хромосома, 71C).	Коллекция лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации ИМБ РАН
<i>RQ2</i>	Трансгенная линия, несущая под <i>h</i> -промотором дрозофилы двойную инсерцию RQ конструктора (2 хромосома, 57A; 3 хромосома, 87B).	Коллекция лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации ИМБ РАН

Продолжение таблицы 1

1	2	3
<i>RQT157</i>	Трансгенная линия, несущая под <i>hs</i> -промотором дрозофилы двойную инсерцию RQT конструкта (1 хромосома, 3D; 3 хромосома, 86F).	Коллекция лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации ИМБ РАН
<i>GDNF</i>	Трансгенная линия, несущая во 2 хромосоме под <i>hs</i> -промотором дрозофилы ген человека для GDNF.	Коллекция группы нейрогенетики и генетики развития ИБГ РАН
<i>BDNF</i>	Трансгенная линия, несущая в 3 хромосоме под <i>hs</i> -промотором дрозофилы ген человека для BDNF.	Коллекция группы нейрогенетики и генетики развития ИБГ РАН

Методы исследования.

Предъявление теплового шока. Тепловое воздействие проводили в водном термостате GFL 1086 (GFL, Германия) при температуре +37°C в течение 30 мин согласно разработанной нами экспериментальной схеме, позволяющей оценивать у имаго последствия теплового шока (ТШ), применяемого на разных стадиях развития: имаго (ТШ), личинка I возраста (период формирования грибовидных тел (ГТ), ТШ1), предкуколка (период формирования центрального комплекса (ЦК), ТШ2) (Рисунок 1). Все эксперименты проводили через 1 час после предъявления ТШ. Во всех вариантах опыта применяли интактный контроль (без воздействия).

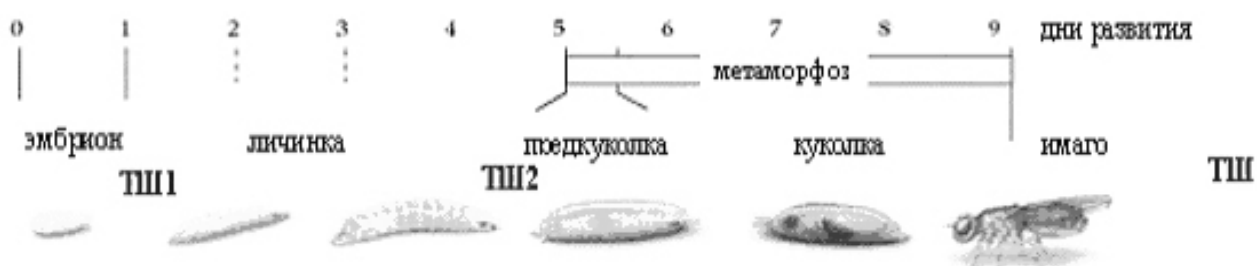


Рисунок 1 - Схема воздействия ТШ на разных стадиях развития дрозофилы.

Действие ТШ имело несколько целевых применений:

- для анализа эффектов собственно теплового шока;
- для индукции генов под *hs*-шоковым промотором.

Анализ когнитивного поведения. Использовали метод условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ) (Kamyshev et al., 1999) и регистрация параметров звукопродукции при ухаживании (Попов и др., 2000, 2006).

Изучение двигательной активности. Для регистрации локомоторного поведения личинок дрозофилы применяли оригинальную автоматизированную установку, созданную Г.А. Захаровым и Т.Л. Паялиной, адаптировав установку для регистрации локомоторного поведения имаго дрозофилы, сконструированную Н.Г. Камышевым с соавторами (Брагина и др., 2007). Принципиальная схема установки приведена на рисунке 2.

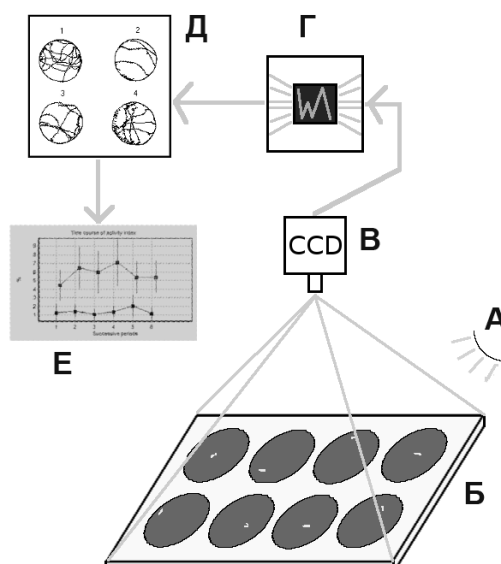


Рисунок 2 - Схема установки для регистрации локомоторного поведения личинок дрозофилы.

Иммуногистохимические методы. Для выяснения возможных механизмов поведенческих и нейрологических нарушений у исследуемых линий проводили иммунофлюоресцентный анализ межлинейных различий распределения LIMK1, p-кофилина, pCREB, БТШ70, GDNF в клетках слюнных желез личинок, различных зонах мозга имаго, нейромышечных контактах личинок и торакальной области имаго с использованием флюоресцентной и конфокальной микроскопии.

Выявление амилоидоподобных отложений проводили с помощью окрашивания Конго Ред и тиофлавином с использованием световой и флюоресцентной микроскопии.

Молекулярно-генетические методы. Использовали следующие методы: выделение ДНК из *Dr. melanogaster*, подбор праймеров гена *limk1* *Dr. melanogaster*, полимеразно-цепная реакция (ПЦР), электрофорез в агарозном

геле и очистка ПЦР-фрагментов, постановка сиквенс-реакции, выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР в режиме реального времени, анализ уровня экспрессии мРНК, выделение белков, электрофорез белков в полиакриламидном геле, вестерн-блоттинг и блот-гибридизация в соответствии со стандартными методиками (<http://molbiol.ru/protocol>), либо указаниями производителей реагентов.

Биоинформационный анализ. Моделирование вторичной структуры ДНК осуществляли с использованием программы RNAstructure 5.2 (Reuter, Mathews, 2010). Анализ вероятности связывания нуклеосом в районе гена *limk1* проводили при помощи сервера NuPop (<http://nucleosome.stats.northwestern.edu>; Xi et al., 2010). Поиск сайтов связывания транскрипционных факторов производили с применением ресурсов TFSEARCH (Heinemeyer et al., 1998; <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) и ConSite (Sandelin et al., 2004; <http://www.http.com/www.phylofoot.org/consite>). Поиск генов, имеющих частичную гомологию с районами гена *limk1*, свободными от нуклеосом, осуществляли с помощью программы NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Направленный компьютерный поиск микроРНК, взаимодействующих с 3'-UTR гена *limk1*, производили при помощи программ, предсказывающих взаимодействие микроРНК с 3'-UTR мРНК *D. melanogaster*, TargetScanFly (Ruby et al., 2007; http://www.targetscan.org/fly_12/) и Segal Lab (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html; Kertesz et al., 2007). Поиск микроРНК, гомологичных участкам гена *limk1 D. melanogaster*, осуществляли с помощью базы данных микроРНК miRBase (Kozomara, Griffiths-Jones, 2014; <http://www.mirbase.org>).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью рандомизационного анализа, дисперсионного анализа, критерия Манна – Уитни, критерия Фишера, критерия Краскела – Уоллиса, t-критерия Стьюдента, t-критерия для долей. Достоверность всех различий была рассчитана на уровне значимости $p < 0,05$. Программное обеспечение GraphPad Instat 3 и Statistica 6.0.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Анализ когнитивного поведения

Для исследования первого диагностического признака НДЗ – прогрессирующая потеря памяти – производили оценку особенностей формирования памяти у самцов *D. melanogaster* с использованием УРПУ. УРПУ является естественной формой обучения у дрозофилы, т.е. после ухаживания за нерецептивной оплодотворённой самкой (тренировки) у самца снижается интенсивность ухаживания за всеми последующими самками. У всех исследуемых линий была изучена динамика сохранения УРПУ. Обобщенная оценка способности к обучению и формированию среднесрочной и долгосрочной памяти при изменении компонентов генных сетей регуляции функциональных процессов мозга у мутантов дрозофилы и трансгенных линий, несущих гены человека для нейротрофических факторов (НТФ), а также некодирующих РНК (нкРНК) представлена в таблице 2.

У линий с полиморфизмом по гену *limk1* наблюдали следующее: самцы *CS* не проявляют нарушений обучения, среднесрочной и долгосрочной памяти, у *Berlin* выявлено только нарушение долгосрочной памяти через 8 суток после тренировки, тогда как *Or-R* и *agn^{ts3}* характеризуются выраженными дефектами, как обучения, так и обоих видов памяти (Рисунки 3, 4). Обращает на себя внимание тот факт, что при действии ТШ у *Or-R*, как и у *agn^{ts3}*, восстанавливается способность к обучению, что свидетельствует как о необходимости, так и о достаточности для этого стрессорных воздействий. Таким образом, LIMK1 вносит существенный вклад в функционирование нервной системы как центральной, так и периферической, обеспечивая формирование новых связей между нейронами в зависимости от полученного опыта, и, возможно, обеспечивает компенсаторный эффект, направленный на достижение результата.

Таблица 2 - Оценка способности к обучению и формированию среднесрочной и долгосрочной памяти различных линий дрозофилы

Линия	Характеристика	Дефекты среднесрочной памяти				Дефекты долгосрочной памяти			
		конт роль	ТШ1	ТШ2	ТШ	конт- роль	ТШ1	ТШ2	ТШ
Линии, проявляющие полиморфизм в гене <i>limk1</i>									
<i>Canton-S</i>	Линия дикого типа.	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
<i>Berlin</i>	Линия дикого типа (Берлин).	нет	нет	нет	нет	8 суток	нет	нет	нет
<i>Oregon-R</i>	Линия дикого типа (Орегон).	0 и 3 часа	0 и 3 часа	0 и 3 часа	0 и 3 часа	нет	2 суток	8 суток	нет
<i>agn^{ts3}</i>	Дефект синтеза LIMK1.	0 и 3 часа	0 и 3 часа	нет	нет	2 и 8 суток	2 и 8 суток	нет	нет
Линии, несущие мутации по КПОТ									
<i>cn</i>	Накопление KYNA.	нет	нет	нет	нет	8 суток	8 суток	8 суток	8 суток
<i>cd</i>	Накопление 3-НОК.	нет	нет	3 часа	3 часа	8 суток	8 суток	8 суток	8 суток
<i>v</i>	Отсутствие кинуренинов	нет	нет	нет	нет	8 суток	8 суток	2 и 8 суток	8 суток
Линия с дефектом синтеза БТШ									
<i>l(1)ts403</i>	Дефект синтеза БТШ.	нет	3 часа	нет	3 часа	-	-	-	-
Трансгенные линии, несущие гены человека для некодирующих РНК									
<i>RQ1</i>	Единичная инсерция RQ-конструкта.	нет	нет	нет	нет	-	-	-	-
<i>RQ2</i>	Двойная инсерция RQ-конструкта.	нет	нет	3 часа	нет	-	-	-	-
<i>RQT157</i>	Делеция части RQ-конструкта.	нет	нет	нет	нет	-	-	-	-
Трансгенные линии, несущие гены человека для НТФ									
<i>GDNF</i>	Ген человека для GDNF.	3 часа	3 часа	нет	нет	нет	8 суток	нет	нет
<i>BDNF</i>	Ген человека для BDNF.	нет	нет	нет	нет	нет	нет	2 и 8 суток	нет

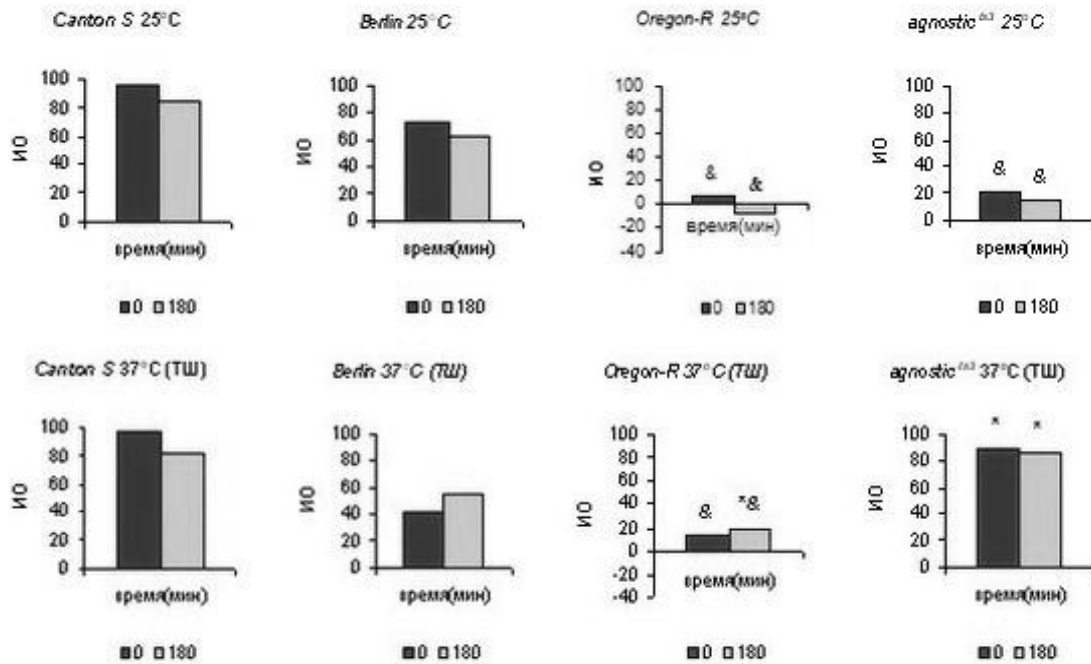


Рисунок 3 - Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания при тестировании среднесрочной памяти у линий *CS*, *Berlin*, *Or-R* и *agn^{ts3}*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, у.е. * - ИО после воздействия ТШ достоверно отличается от интактного контроля; & - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$).

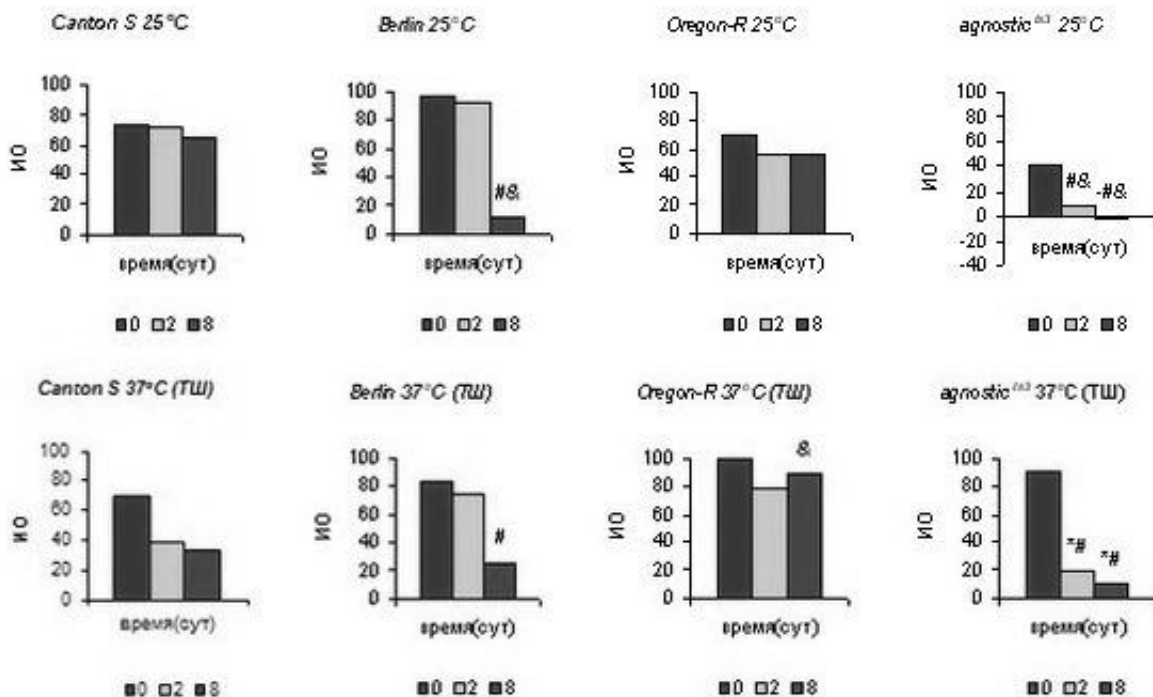


Рисунок 4 - Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания при тестировании долгосрочной памяти у линий *CS*, *Berlin*, *Or-R* и *agn^{ts3}*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, сут; по оси ординат: ИО - индекс обучения, у.е. * - ИО после воздействия ТШ достоверно отличается от интактного контроля; # - ИО в отсроченном тесте достоверно ниже, чем в тесте сразу после тренировки; & - ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$).

Мутанты с нарушениями КПОТ, изучение метаболитов которого является горячей точкой клинических исследований механизмов нейродегенерации и нейропротекции, могут быть использованы как модель деменции (прогрессивной потери памяти при старении), особенно при БХ. В качестве фактора нейродегенерации рассматривают 3-гидроксикинуруенин (3-НОК), фактора нейропротекции – кинуреновую кислоту (KYNA). Все линии, несущие мутации КПОТ, проявляют выраженные дефекты сохранения долгосрочной памяти. Особого внимания заслуживает мутант *cd* (накопление 3-НОК), для которого показаны также и нарушения среднесрочной памяти при ТШ и ТШ2. В силу того, что тестирование через 8 сут после тренировки происходит на самцах в возрасте 13 сут, это является еще одним подтверждением, что прогрессивная потеря памяти у мутанта проявляется именно с этого возраста.

Среди трансгенных линий, несущих под *hs*-промотором гены человека для некодирующих РНК, наиболее яркий дефект памяти проявляет *RQ2*, что указывает на важную регуляторную роль нкРНК в осуществлении когнитивных процессов. Напомним, что микроРНК также относятся к некодирующим. Созданная модель позволяет обратиться к экспериментальному изучению процессов регуляции с участием микроРНК на примере дрозофилы (Savvateeva-Porova et al., 2008). Высказанная нами идея, что именно дисрегуляция функций некодирующих РНК является триггером нейропатологий и НДЗ, получила подтверждение в последующих работах в этом новом перспективном направлении (Botella et al., 2009; Moloney et al., 2009; Rincon-Limas et al., 2010).

Эффекты, показанные для трансгенных линий, несущих гены человека для НТФ под *hs*-промотором, позволяют говорить о возможности использования НТФ в терапии НДЗ. Экспрессия GDNF, включающаяся при ТШ, восстанавливает формирование памяти.

В связи с обнаруженной спецификой формирования процессов обучения и памяти у исследуемых линий мы задались вопросом, дефект какого именно этапа ритуала ухаживания приводит к общему нарушению процессов памяти, и провели поэлементный анализ поведения ухаживания. В частности, были

проанализированы такие важные элементы ухода, как ориентация и вибрация, а также активность — элемент поведения, не связанный с уходом.

У мутанта *l(1)ts403* выявлена интригующе низкая доля элементов поведения, связанных с уходом. Данная мутация характеризуется широким плеiotропным эффектом при действии ТШ. У этого мутанта подавлен синтез БТШ из-за нарушений транспорта из ядра, практически отсутствует БТШ83 (ортолог БТШ90 у млекопитающих) и снижено количество БТШ70 (Евгеньев, Левин, 1980). Изменение баланса БТШ90/БТШ70 способно уменьшить период полужизни как RET-рецептора (RET-протоонкоген кодирует рецептор тирозинкиназы для членов семейства GDNF), так и LIMK1, то есть изменять функционирование сложных биохимических каскадов, что с необходимостью скажется на формировании памяти. Выявленные дефекты памяти у мутанта *l(1)ts403* свидетельствуют о важной роли молекулярных шаперонов в процессах нейродегенерации.

Наиболее интересные результаты получены при поэлементном анализе поведения ухода линий, проявляющих полиморфизм в гене *limk1*. Рисунок 5 показывает, что ведущим дефектом обучения и памяти у *Or-R* и *agn^{ts3}* являются драматические нарушения ориентации/преследования.

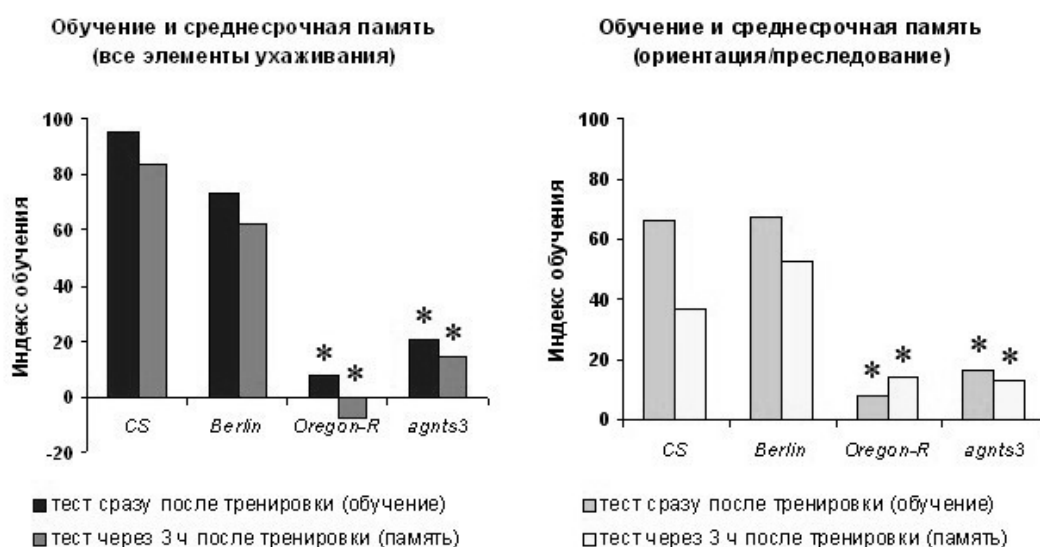


Рисунок 5 - Дефекты ориентации и преследования при нарушениях обучения и памяти у линий, проявляющих полиморфизм в гене *limk1*. * — отличия от CS (двусторонний тест рандомизации, $p < 0.05$).

Это явление дает хорошую возможность также и для тестирования диагностического признака из триады когнитивных отклонений при синдроме Уильямса – пристальной фиксации на лицах, в данном случае на объекте ухаживания, что позволяет использовать данную экспериментальную модель для изучения механизмов как нейродегенеративных, так и геномных заболеваний.

Анализ еще одного элемента ухаживания, вибрации, интересен для сопоставления двух использованных подходов - метода УРПУ и регистрации параметров звукопродукции при ухаживании самцов. Визуально регистрируемая вибрация крыла самца дрозофилы не позволяет судить о том, какой тип песни (импульсная или синусоидальная) и какие нарушения присутствуют в песне ухаживания. Поскольку параметры песни ухаживания несут семантическую нагрузку, то есть дают представление самке о том, какой же именно самец перед ней, то отклонения в параметрах песни ухаживания с неизбежностью будут сказываться на обучении, оцениваемом при УРПУ.

Для проведения более детального анализа способности к обучению самцов дрозофилы был применен метод оценки с использованием установки записи звуковых сигналов ухаживания, автоматически регистрирующей звукопродукцию при ухаживании – вибрацию, соответствующую импульсной и синусоидальной песням. Количественная оценка параметров звукопродукции дает информацию об уровне мотивации самца, семантической и эмоциональной нагрузке сигнала, о состоянии нейромоторной координации и эффективности регуляции поведения со стороны центральных отделов мозга.

При генерации звуковых сигналов в процессе ухаживания у самцов исследуемых линий возникали искажения формы звуковых импульсов, в том числе и у мух дикого типа. Процент искаженных импульсов характеризует стабильность работы пейсмейкеров пения, отражая частоту нарушений режима работы крыловых мышц. На рисунке 6 приведены осциллограммы сигналов ухаживания самцов: синусоидальной и импульсной песни с нормальными (Рисунок 6 а,б) и искаженными (Рисунок 6 в-ж) импульсами. У самцов *agn^{ts3}*

наиболее часто возникали искажения с полициклическими импульсами (Рисунок 6 г), вызванные, по-видимому, тремором мышц пения.

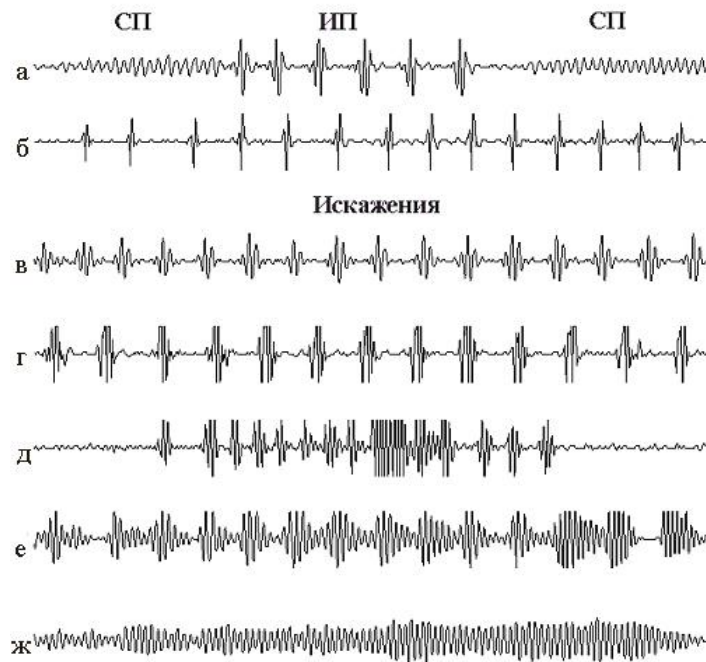


Рисунок 6 - Примеры нормальных (а, б) и искаженных (в - ж) коммуникационных сигналов самцов: а) вариант чередования синусоидальной (СП) и импульсной (ИП) песен; б) отрезок нормальной посылки ИП; в) – д) - примеры искажения импульсов; е) пример искажения СП – она модулирована по амплитуде с частотой повторения импульсов в ИП в результате сбоя фазовых отношений пейсмекеров; ж) пример искажения СП – повышена её основная частота.

Наибольшие нарушения звукопродукции присущи мутанту *cd*, у которого выявлены все виды искажений коммуникационных сигналов. Таким образом, избыток в мозгу самцов 3-НОК снижает устойчивость к стрессу параметров их песен (режима работы нейромоторного комплекса).

Применение установки для автоматической регистрации звукопродукции позволяет проводить экспресс-оценку любых могущих возникнуть в дальнейшем нарушений памяти. Одни и те же закономерности выявляются обеими методиками. Но лишь автоматическая регистрация звукопродукции, как более тонкий и точный способ анализа поведения, выявляет снижение способности к обучению, связанное, по-видимому, с серьезными нарушениями параметров ухаживания.

Итак, нарушения памяти при НДЗ, которые являются не моногенными болезнями, а полигенными синдромами, в подавляющем большинстве случаев

возникающими спорадически, могут быть обусловлены различными факторами. Именно это нами и продемонстрировано в настоящем исследовании при анализе первого из триады диагностических признаков НДЗ – нарушения процессов памяти – с использованием моделей, характеризующихся дефектами ключевых процессов, приводящих к данным заболеваниям.

Анализ двигательной активности

С использованием созданной в лаборатории нейрогенетики установки были исследованы параметры локомоции личинок (индекс активности, частота побегов, длительность и скорость побежки). Для оценки способности к пространственному ориентированию при исследовании окружающей среды, непременно вовлекающем зрительно-пространственную ориентацию, проводили анализ по форме траекторий движения (треков), описываемых личинкой в процессе движения. Обобщенные данные, полученные при анализе локомоторного поведения, представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Локомоторное поведение личинок различных линий дрозофилы

Линия	Характеристика	Индекс локомоторной активности		Способность к пространственному ориентированию	
		контроль	ТШ	контроль	ТШ
Линии, проявляющие полиморфизм в гене <i>limk1</i>					
<i>Canton-S</i>	Линия дикого типа	0.34	↔	без дефектов	↔
<i>Berlin</i>	Линия дикого типа	0.15*	↔	значительные дефекты	↔
<i>Oregon-R</i>	Линия дикого типа	0.15*	0.31	значительные дефекты	дефекты
<i>agn^{ts3}</i>	Дефект синтеза LIMK1	0.12*	↔	значительные дефекты	↔
Линии, несущие мутации по КПОТ					
<i>cd</i>	Накопление 3-НОК.	0.36	↔	дефекты	↔
<i>cn</i>	Накопление KYNA	0.14*	↔	дефекты	↔
<i>v</i>	Отсутствие кинуренинов	0.13	↔	дефекты	↔

При сравнении без воздействия линии *Berlin*, *Or-R*, *agn^{ts3}*, *v*, *cd*, *cn* сравнивали с *CS*. При анализе влияния ТШ сравнение производили с той же линией в интактном контроле. Достоверные различия отмечены символом «*» (критерий Краскела-Уоллиса), недостоверные изменения заменены знаком «↔». Изменение параметров более чем на 50% отмечено полужирным шрифтом.

Все линии, несущие полиморфизмы в гене *limk1*, демонстрировали существенные нарушения локомоторного поведения. У линий *Berlin*, *Or-R* и *agn^{ts3}* понижен индекс активности. Также личинки этих линий имели заметные дефекты в распределении треков. Доля треков, полностью заполняющих экспериментальную камеру, заметно снижена, а большая часть приходилась на треки с дефектами заполнения в центральной части камеры (Рисунок 7).

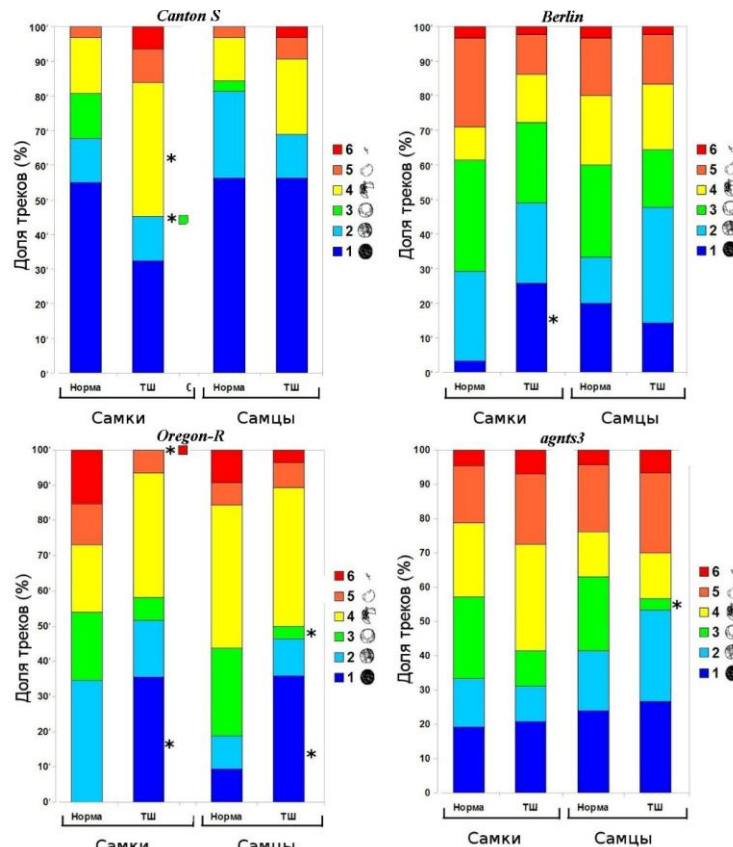


Рисунок 7 - Сравнение распределений треков личинок линий *CS*, *Berlin*, *Or-R* и *agn^{ts3}* по классам в норме и после воздействия ТШ по классам. Достоверность различий: * – отличия от нормы (t-критерий для долей, $p < 0,05$).

Напомним о выявленных нами когнитивных дефектах у самцов *Or-R* и *agn^{ts3}*, обусловленных недостаточным подавлением ориентации/преследования (взаимодействия с партнером). Как становится понятным после анализа локомоторного поведения, дефекты ориентации проявляются уже на стадии личинки. Таким образом, выявлена связь мутационного повреждения гена *agnostic* и нарушений в локомоторной и когнитивной сфере.

Мутанты каскада деградации триптофана демонстрировали ряд локомоторных нарушений, однако они менее выражены, чем у линий с

полиморфизмами по *limk1*. Достоверных отличий по индексу активности почти нет. Подобный результат достаточно легко объяснить, если учесть, что в случае *limk1* мы имеем дело с нарушениями гена, оказывающего непосредственное влияние на транскрипцию. В случае же мутантов по ферментам КПОТ – с нарушениями синтеза эндогенных модуляторов активности, которые оказывают опосредованное воздействие на LIMK1 и актин. При этом сам фермент LIMK1 остается незатронутым, что дает возможность компенсировать его активацию или ингибирование за счет привлечения других сигнальных путей. Это является наглядным подтверждением многообразия причин видимых когнитивных и локомоторных нарушений при различных НДЗ.

Совершенно очевидно, что рассмотренные два диагностических признака НДЗ (когнитивные и локомоторные нарушения) вызваны дисбалансом различных компонентов сигнальных каскадов. Поэтому мы обратились к анализу межлинейных различий их распределения с использованием иммуногистохимических методов.

Анализ распределения компонентов сигнальных каскадов в различных органах дрозофилы

Распределение LIMK1. На данный момент в литературе отсутствуют сведения о связи LIMK1 и кофилина с определенными нейрональными подструктурами и/или типами клеток. Данные по пространственному распределению LIMK1 и кофилина в мозге имаго дрозофилы, полученные с использованием лазерной конфокальной микроскопии, представлены на рисунке 8. У 5-суточных взрослых самцов *CS* LIMK1 концентрируется не в структурах нейропиля, обогащенных синаптическим белком CSP, а в цитоплазме тел клеток, сосредоточенных в периферических отделах мозга. Предположительно, они относятся к клеткам поверхностной глии. Некоторые из них, однако, являются нейрональными клетками, к примеру, скопление клеток Кеньона, окружающих каликсы грибовидных тел. Мутанты *agn^{ts3}*, *cn* и *cd* имеют аналогичное распределение LIMK1. Нефосфорилированный кофилин в мозге дрозофилы распределен сходно с LIMK1, концентрируясь

преимущественно в клеточных тяжах вокруг структур нейропиля и в проводящих трактах. Кофилин, однако, присутствует также и в ядрах клеток, главным образом в поверхностных отделах мозга. Локализация LIMK1 и ее основного субстрата кофилина в одних и тех же структурах мозга обеспечивает возможность взаимодействия этих компонентов актин-ремоделирующего сигнального каскада. Поскольку LIMK1 фосфорилирует кофилин, то распределение р-кофилина в различных органах дрозофилы может являться показателем активности LIMK1.

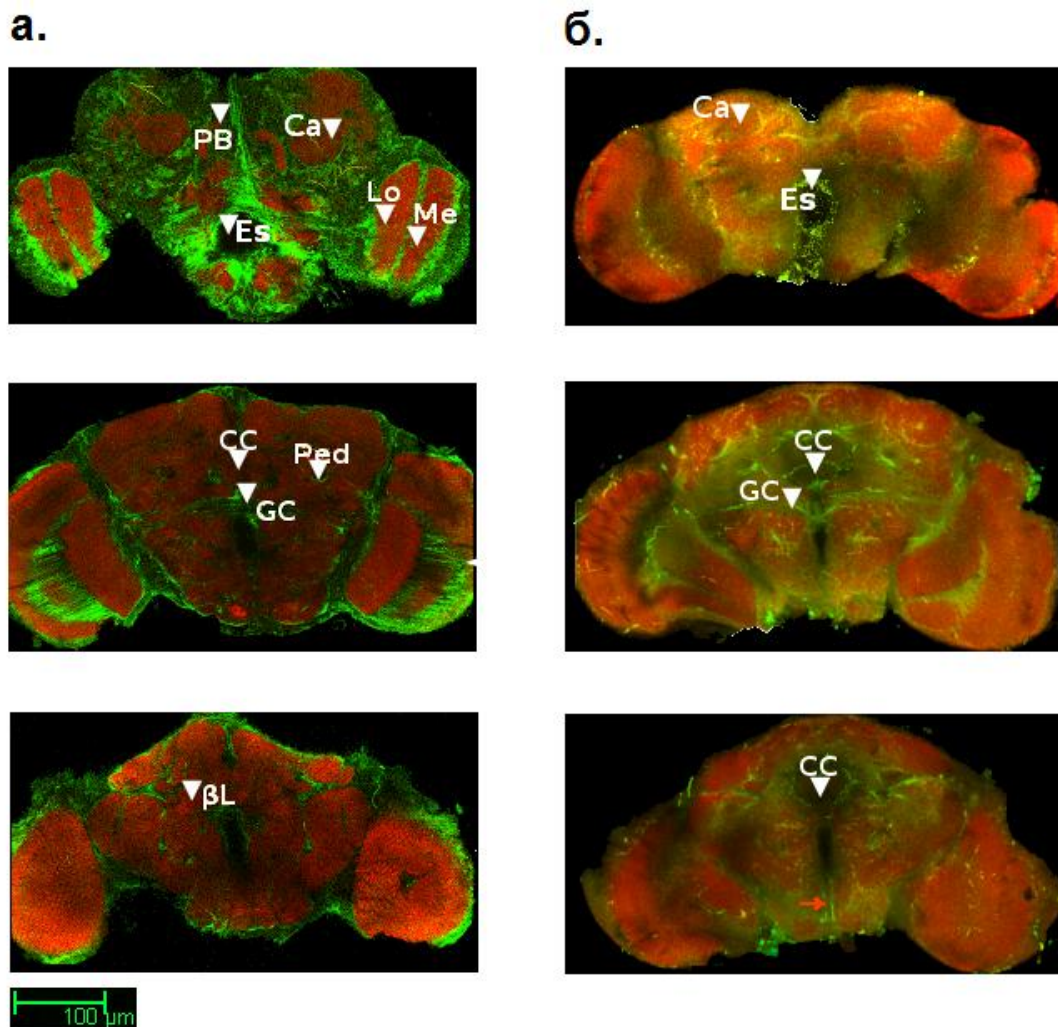


Рисунок 8 - Распределение LIMK1 и кофилина в мозге имаго дрозофилы. А. - LIMK1; б. - кофилин (мозг во фронтальной проекции). Обозначения структур: β L (β -lobe) – бета-лопасть грибовидного тела, Ca (calyx) – каликсы, CC (central complex) – центральный комплекс, Es (esophagus) – глотка, GC (great commissure) – большая комиссура, Lo (lobula) — лобула, Me – (medulla) - медулла, PB (protocerebral bridge) – протоцеребральный мост, Ped (pedunculus) – педункулус. Белыми стрелками указаны структуры нейропиля, красной — кофилин-обогащенный тракт в районе ПГ. Красный цвет – CSP, зеленый – LIMK1/кофилин.

Распределение р-кофилина. В отличие от LIMK1 и кофилина, р-кофилин в мозге взрослых самцов локализован преимущественно в ядрах клеточных тел, располагающихся в периферических слоях и между структурами нейропиля. Также он присутствует в пронизывающих нейропил диффузных тяжах, предположительно сформированных глией. В глубинных отделах мозга р-кофилин содержится в ядрах глиальных клеток в области ЦК (Рисунок 9) и в некоторых проводящих трактах (большой комиссуры).

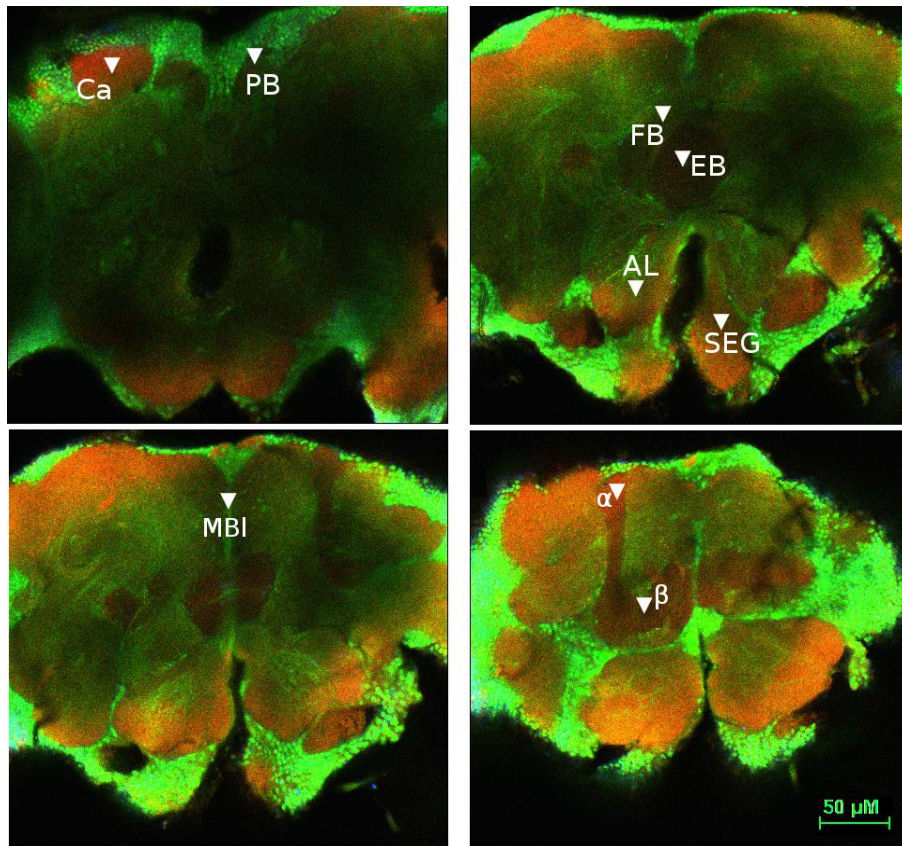


Рисунок 9 - Распределение р-кофилина в мозге имаго дрозофилы (фронтальная проекция, без зрительных долей). Обозначения структур: α , β альфа- и бета-лопасти грибовидного тела, AL (antennal lobe) – антенные доли, Ca (calyx) – каликсы, EB (ellipsoid body) – эллипсоидное тело, FB (fan-shaped body) – веерообразное тело, MBI (median bundle) – медиальный пучок, PB (protocerebral bridge) – протоцеребральный мост, SEG (subesophageal ganglion) – подглоточный ганглий. Стрелками указаны структуры нейропиля. Красный цвет – CSP, зеленый – р-кофилин.

Распределение р-кофилина в мозге самцов *agn^{ts3}* сходно с таковым у *CS*. Однако следует напомнить, что мутант *agn^{ts3}* сильно отличается от дикого типа в том смысле, что он неспособен ни к обучению, ни к сохранению памяти при нормальной температуре, и только ТШ восстанавливает эти процессы до нормы. Поэтому можно ожидать изменения локализации р-кофилина после

применения ТШ. Анатомическое строение мозга дрозофилы таково, что тела нервных клеток лежат на его периферии, а их отростки находятся в нейропиле и слишком малы по размеру, чтобы проводить анализ существующих между ними синаптических переключений. Поэтому исторически, начиная с работ Jan и Jan (1982), большинство исследований проводится на нейромышечных контактах (НМК) личинок. В связи с этим было исследовано изменение экспрессии р-кофилина в НМК в ответ на ТШ у линий *CS* и *agn^{ts3}*. Полученные данные представлены на рисунке 10.

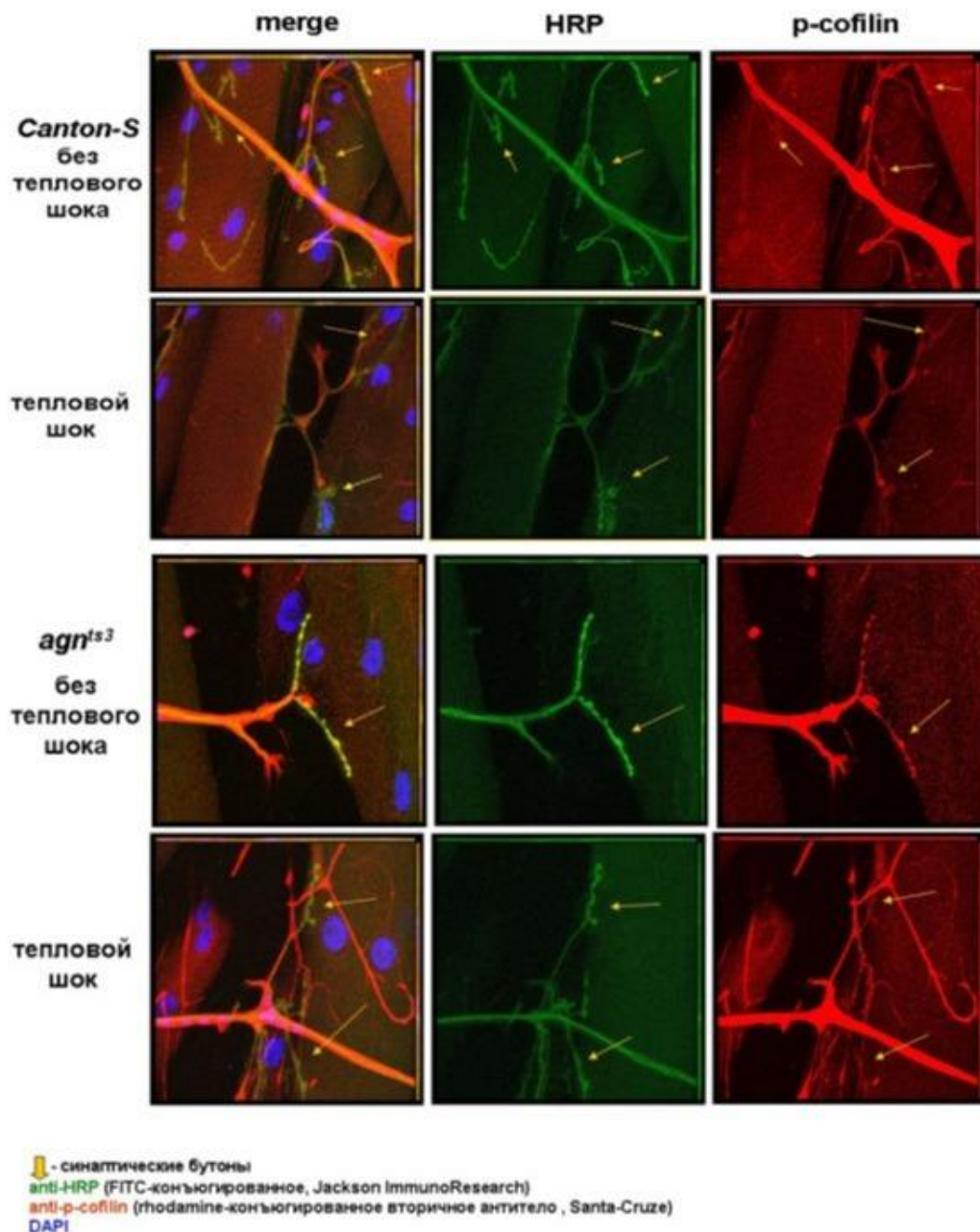


Рисунок 10 - Распределение р-кофилина в области нейромышечных контактов личинок дрозофилы без воздействия и после теплового шока у линии дикого типа *CS* и мутанта *agn^{ts3}*.

У *agn^{ts3}* р-кофилин содержится в аксонах и их синаптических бутонах, тогда как у *CS* он располагается преимущественно вдоль аксонов. Под действием ТШ у *agn^{ts3}* снижается количество р-кофилина в аксоне и в бутонах, и картина приближается к такому же распределению, как у дикого типа.

Кроме р-кофилина, регулятора ремоделирования актинового цитоскелета, субстратом LIMK1 является рCREB, инициирующий процесс консолидации памяти, и тем самым представляющий исключительный интерес для наших исследований, направленных на понимание механизмов обучения и памяти.

Распределение рCREB. Белок CREB, один из важнейших сигнальных факторов, запускает в ядре транскрипцию цАМФ-зависимых генов. К числу протеинкиназ, активирующих CREB, относится и LIMK1, напрямую фосфорилирующая его по Ser¹³³ (Yang et al., 2004). У дрозофилы функциональным аналогом CREB является dCREB2-а, который активируется при фосфорилировании Ser²³¹, остатка, гомологичного Ser¹³³ млекопитающих (Yin et al., 1995). dCREB2-а запускает процесс формирования долгосрочной памяти (Siegel, Hall, 1979; Ishimoto et al., 2009). Эта форма памяти нарушена как у *agn^{ts3}*, так и у кинурениновых мутантов. Они также различаются параметрами локомоторной активности личинок. Эти особенности могут быть обусловлены дисрегуляцией LIMK1-зависимых сигнальных каскадов, влияющих как на процессы ремоделирования актина, так и на CREB-зависимую транскрипцию генов. Поэтому мы проанализировали распределение рCREB у этих линий в мозге и нейромышечных контактах в зависимости от обучения.

рCREB в мозге дрозофилы избирательно концентрируется в ряде морфологически взаимосвязанных нейрональных структур (Рисунки 11, 12). Примечательно, что рCREB локализован преимущественно в цитоплазме и аксонах клеток, в ядрах его содержание ниже, особенно в транскрипционно неактивном гетерохроматине рядом с хромоцентром.

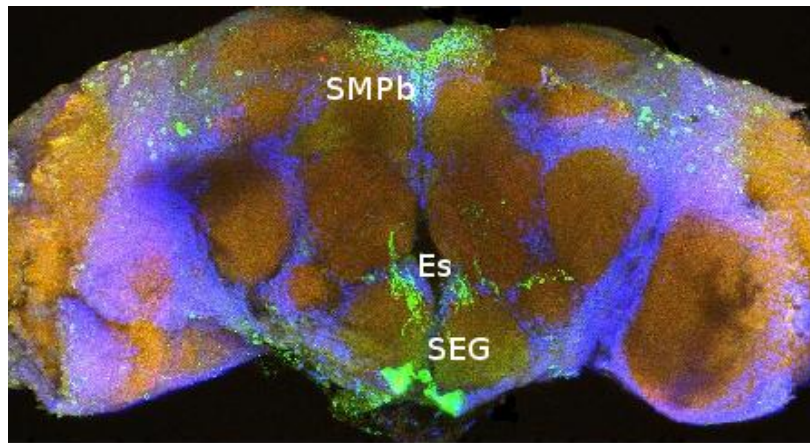


Рисунок 11 - Распределение pCREB в мозге дрозофилы (фронтальная плоскость, Z-проекция). Es – пищевод, SEG — подглоточный ганглий, SMPb — верхний медиальный протоцеребрум. Ядра изображены синим цветом, CSP – красным, pCREB– зеленым.

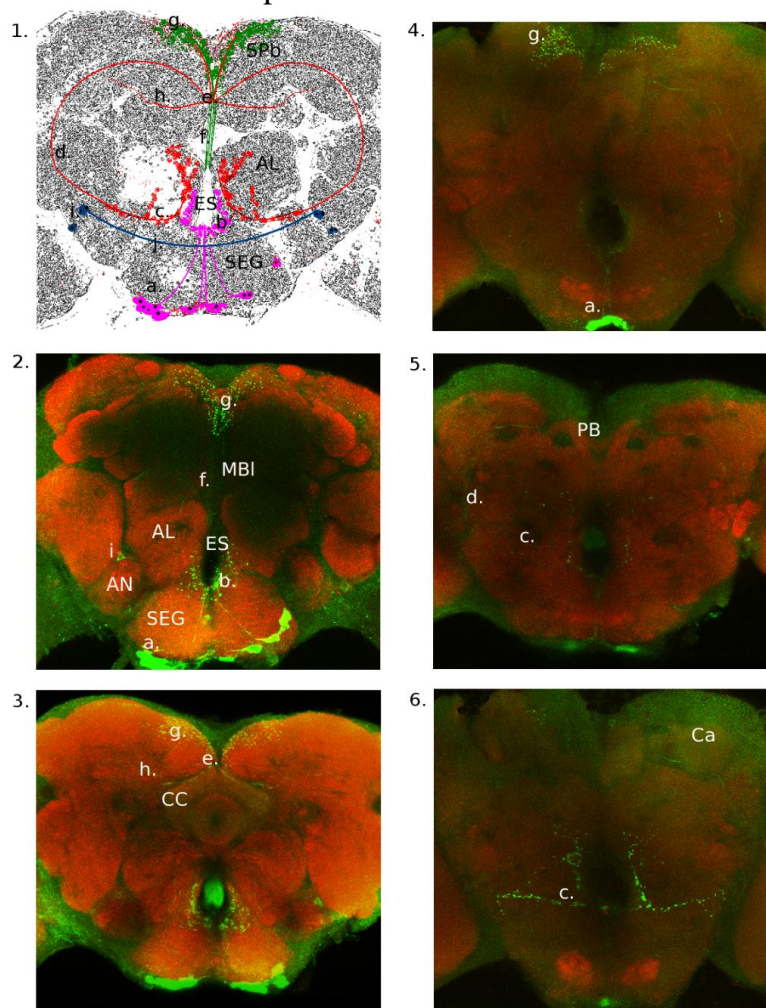


Рисунок 12 - Основные pCREB –обогащенные структуры мозга дрозофилы. а. – клетки подглоточного ганглия, b. – гломерулярная структура 1, с. – гломерулярная кистевидная структура 2, горизонтальные ветви, d. – проводящие тракты, связывающие ветви гломерулярной структуры с протоцеребрумом, e. – область взаимосвязи проводящих трактов с V-образной структурой протоцеребрума, f. – медиальный пучок, g. – V-образная структура, h. – проводящие тракты сверху от CC, i – кластеры клеток в области антенного тракта, j –нейрональный тракт, связывающий данные кластеры.

В мозге дрозофилы нами выявлены как минимум 2 pCREB-обогащенных нейрональных структуры. Первая из них условно подразделяется на три подсистемы: 1) клеточные тела в области ПГ → аксональные отростки → гломерулярная структура 1; 2) отростки в составе медиального пучка → V-образная структура; 3) следующие сверху от ЦК к этой структуре и далее в составе полукруглых трактов отростки → гломерулярная структура 2. Нейрональная система, образованная кластерами клеточных тел в районе антенного нерва и формирующая полукруглую комиссуру в области ниже пищевода, является морфологически автономной.

Сравнительный анализ распределения pCREB у линий, несущих мутации в рецепторной и эффекторной частях сигнального каскада ремоделирования актина, не выявил различий. Также не обнаружено существенных изменений в распределении pCREB после 5-часовой тренировки. Это согласуется с данными о тотальном фосфорилировании (Ser²³¹)CREB в мозге дрозофилы (Horiuchi et al., 2004). В НМК у имаго *CS* pCREB локализуется в цитоплазме нейронов, в области поперечных перемычек между аксонами до тренировки и в зоне продольных отростков аксонов после тренировки. Напротив, у *agn^{ts3}* после тренировки распределение pCREB соответствует таковому у *CS* до тренировки.

Подытожим данные о локализации LIMK1 и ее субстратов. Поскольку не выявлено значительных межлинейных различий локализации LIMK1 и ее субстратов, то акцентируем внимание на распределении компонентов актинового каскада как таковых (Таблица 4).

Таблица 4 - Распределение LIMK1 и ее субстратов

Вещество	Внутриклеточное распределение	Клеточный тип
LIMK1	цитоплазма	нейроны, глия
кофилин	цитоплазма	нейроны, глия
p-кофилин	ядро	глия
pCREB	цитоплазма	нейроны

Фосфорилированная форма CREB является транскрипционным фактором, необходимым для активации транскрипции таких генов, как *c-fos*, *zif/268*, *somatostatin* и *BDNF* (Liu, Graybiel, 1996), необходимых для

консолидации памяти. С другой стороны, pCREB также активирует транскрипцию гена PEN-2, являющегося компонентом γ -секретазы, которая разрезает APP (предшественник β -амилоида) до β -амилоида (Wang et al., 2006). Поэтому дисфункция pCREB приводит к сдвигу баланса секретаз с образованием и накоплением агрегатов β -амилоида при БА.

В этой связи мы обратились к исследованию третьего диагностического признака нейродегенеративных заболеваний – образования белковых агрегатов.

Распределение белковых агрегатов. В мозге имаго линии *CS* включений не наблюдали, в то время как у *agn^{ts3}* обнаружены конгофильные включения при разведении мух в нормальной температуре (Рисунок 13).

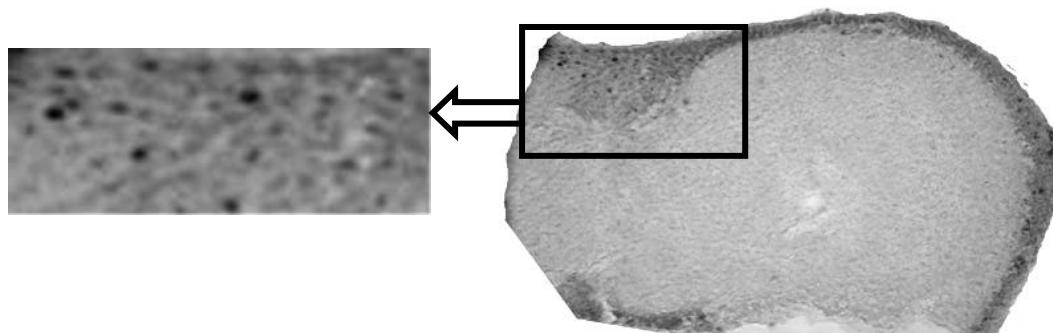


Рисунок 13 - Конго Ред-позитивные амилоидоподобные включения в клеточной протоцеребральной массе имаго *agn^{ts3}* при нормальной температуре. Выноска – то же, увеличено.

При анализе личиночных органов обнаружено, что в 40% случаев включения встречаются и у линии *CS*, но у *agn^{ts3}* они присутствуют у всех проанализированных особей. После ТШ (30 мин) с адаптацией в течение 1 ч у обеих линий количество особей с амилоидными включениями снижается в 2 - 3 раза, то есть *agn^{ts3}* после ТШ демонстрирует ту же частоту появления особей с включениями, что и *CS* без ТШ.

У мутанта *cd* амилоидные включения обнаружены у всех проанализированных особей как до, так и после ТШ. Белковые агрегаты в нейронах часто представлены в виде актин-кофилиновых комплексов, которые, в случае БА и БП окружают β -амилоиды и аккумулируются в отростках нейронов и экстраклеточном матриксе и только при БХ в ядре (Munsie et al., 2011). Следует напомнить, что мутант *cd* может служить моделью БХ, для

развития которой важно именно раннее повышение концентрации 3-НОК как фактора запуска болезни (Guidetti et al., 2000). Повышенный синтез 3-НОК у мутанта *cd* наблюдается на стадии предкуколки, на которой и проводили анализ наличия агрегатов. Наличие амилоидных включений в данном случае может служить фактором ранней диагностики когнитивных нарушений.

Нарушения обучения и памяти в интактном контроле у мутанта *agn^{ts3}* сопровождаются формированием белковых агрегатов. Известно, что после стресса активность LIMK1 снижается (Munsie et al., 2011). По-видимому, именно это служит причиной восстановления способности к обучению у мутантов *agn^{ts3}*, коррелирующей с исчезновением амилоидоподобных включений после ТШ.

Образование актин-кофилиновых комплексов при снижении уровня экспрессии LIMK1 нарушает межнейрональную коммуникацию, блокирует везикулярный транспорт и является причиной атрофии нейритов и синаптической патологии (Stokin, Goldstein, 2006). Синаптическая дисфункция напрямую коррелирует с нарушениями когнитивных функций у пациентов с БА (Masliah, 2000). При БА наличие олигомеров β -амилоида затрудняет ретроградный транспорт BDNF по аксонам и активацию внуклеточного путей сигнальной трансдукции, опосредованной BDNF в аксонах нейронов мышей (Roop et al., 2011). Прямое участие β -амилоида, а также кофилина, вовлеченного в синаптическую патологию, подчеркивает значимость именно сигнального каскада ремоделирования актина в процессах нейродегенерации.

Под действием стресса актин может влиять на ДНК непосредственно или косвенно за счет изменения укладки хроматина или передвижения хромосом в ядре, что будет проявляться как изменение экспрессии генов. Поскольку такие изменения наблюдаются у больных БХ (Cha, 2007), это позволяет выдвинуть предположение о транскрипционной дисрегуляции как центральном механизме патогенеза НДЗ. В этой связи представляется совершенно необходимым анализ экспрессии генов, вовлеченных в функционирование сигнальных каскадов у *Drosophila melanogaster*.

Анализ экспрессии генов, вовлеченных в функционирование сигнальных каскадов у *Drosophila melanogaster*

Анализ экспрессии генов на уровне трансляции. С использованием метода иммуноблоттинга и последующей гибридизацией антител к С-концу LIMK1 был проведен количественный анализ содержания и соотношения D- и С-изоформ LIMK1, полученных из голов самцов линий с полиморфизмом по *limk1* (Рисунок 14).

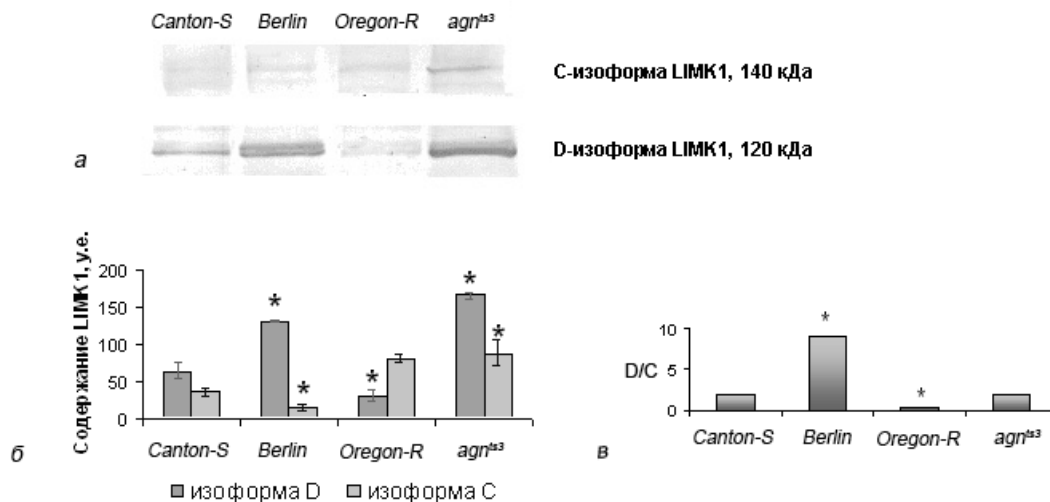


Рисунок 14 - Вестерн-блот анализ LIMK1 у самцов линий *CS*, *Berlin*, *Or-R* и *agn^{ts3}* а) С- и D-изоформы LIMK1; б) содержание D- и С-изоформ; в) соотношение количества изоформ D/C. * - отличия от *CS*, (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$).

Количество D-изоформы у *Berlin* в 2 раза превышало таковое у *CS*, а у *Or-R* было в 2 раза меньше, чем у *CS*. Для линий дикого типа характерно различное соотношение D- и С-изоформ, однако суммарное количество обеих изоформ LIMK1 у *Berlin* и *Or-R* было сопоставимым с таковым у *CS*. Количество D- и С-изоформ LIMK1 у *agn^{ts3}* в 2,5 раза превышало таковое у *CS*, в то время как их соотношение не различалось. Таким образом, впервые выявлено различное содержание и соотношение изоформ LIMK1 у линий дикого типа *Berlin*, *Or-R* и *CS* и мутанта *agn^{ts3}*.

Интересно проследить возможную взаимосвязь между содержанием и соотношением изоформ LIMK1, наблюдаемых у этих линий, с организацией полового поведения и формированием памяти. К чему приводит дисбаланс изоформ LIMK1 в пользу более длинной и менее активной изоформы С у линии *Or-R*? И эффективность ухаживания, и индекс пения у нее такие же, как у *CS*,

но нарушение среднесрочной памяти наблюдается как при учете всех элементов ритуала ухаживания, так и только вибрации крыла. Повышение содержания обеих изоформ LIMK1 в 2,5 раза у мутанта *agn^{ts3}* при их сопоставимом с *CS* соотношении, также не сказывается на эффективности ухаживания и индексе пения. И обучение, и среднесрочная память сильно нарушены, что вызвано не изменениями при генерировании вибрации, а модификациями другого компонента ритуала ухаживания – ориентации/преследования.

Полученные нами данные позволяют по-новому взглянуть на участие LIMK1 в формировании долгосрочной памяти. У линии *Or-R* отсутствует среднесрочная память, но не долгосрочная. В то же время у самцов мутантной линии *agn^{ts3}* нарушено формирование как среднесрочной, так и долгосрочной памяти, что, видимо, вызвано как изменениями структурной и регуляторной области гена *limk1*, так и повышением содержания изоформ LIMK1. Вероятно, высокое содержание LIMK1 у *agn^{ts3}* оказывает ингибирующее действие в процессе обучения и при формировании следа памяти.

Выявленное изменение соотношения изоформ LIMK1 у линий, проявляющих полиморфизм по гену *limk1*, возможно, является результатом изменений транскрипционной и посттранскрипционной регуляции гена *limk1*, причиной которой могут служить точковые мутации – трансверсии и трансцизии, а также инсерции и делеции у этих линий, выявляемые при секвенировании гена *limk1*.

Анализ нуклеотидных последовательностей. Ген *limk1* дрозофилы расположен в локусе *agnostic*, обрамленном А/Т-богатыми районами, насыщенными палиндромными последовательностями и короткими нуклеотидными повторами. Эти способствует как спонтанным перестройкам, так и инсерциям мобильных элементов (Edelmann et al., 2001) в разных природных популяциях. Полученные в ходе секвенирования ДНК-последовательности *limk1* мутанта по локусу *agnostic agn^{ts3}*, а также трех линий дикого типа – *CS*, *Or-R* и *Berlin* доступны в международной базе данных

GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под номерами: *CS* - JX987486, *agn^{ts3}* - JX987487, *Or-R* - JX987488, *Berlin* - JX987489. Сравнение проводили относительно консенсусной нуклеотидной последовательности, взятой из базы данных Flybase (<http://www.flybase.com/>). Результаты полного секвенирования гена *limk1* представлены на рисунке 15.

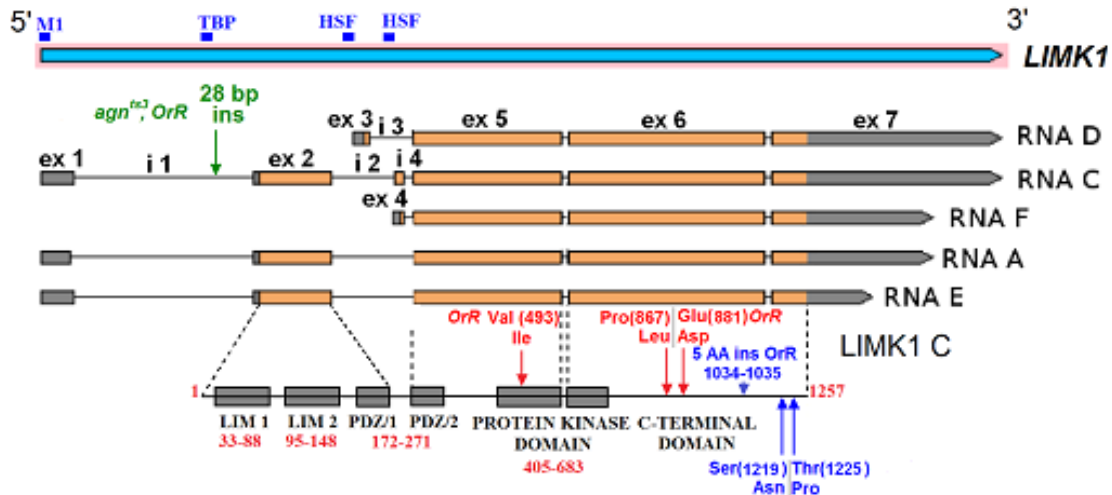


Рисунок 15 - Обнаруженные вставки, делеции и замены в гене *limk1* у линий дикого типа *CS*, *Berlin*, *Or-R* и мутанта *agn^{ts3}* по сравнению с эталонной последовательностью гена *limk1* в базе данных flybase.org.

Всем исследуемым линиям свойственны определенные модификации либо в структурной, либо в регуляторной областях гена *limk1*. Так, мутанта *agn^{ts3}* и у линии *Or-R* в 1-м интроне выявлена А/Т-обогащенная вставка 28 п.н., частично гомологичная сайту связывания микро-РНК *dme-miR-1006*. Обнаруженные нами однонуклеотидные полиморфизмы и мутации в 5'-UTR, экзон-интронных областях гена *limk1*, по-видимому, вносят вклад в изменение содержания и соотношения изоформ LIMK1 у анализируемых линий.

Также обнаружена вставка ~1700 п.н. мобильного S-элемента семейства Tc1/mariner вблизи 3'-UTR гена *limk1* у *agn^{ts3}*. Последовательность этой вставки частично идентична последовательности *S-AGO2* {[S-1008]} во втором интроне гена *argonaute-2* (Flybase ID: FBti0020119). Встраивание этого транспозона у *agn^{ts3}* может приводить к появлению новых сайтов связывания микроРНК. Каким же образом транспозиции могут нарушать цис-регуляторные области и изменять экспрессию самого гена? Поиску ответа на этот вопрос и посвящена следующая часть наших исследований.

Анализ экспрессии микроРНК

В настоящее время у *D. melanogaster* известно 238 предположительных микроРНК генов и 422 зрелых микроРНК (www.mirbase.org). Совместно с Институтом молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Москва) была получена полная библиотека микроРНК линий *CS*, *agn^{ts3}*, *Or-R* и *Berlin*. Проведен компьютерный поиск микроРНК, гомологичных протяженным вставкам и делециям в гене *limk1* у полиморфных линий *D. melanogaster* с помощью базы данных микроРНК miRBase (<http://www.mirbase.org>). Выявлена гомология вставки 28 п.н. с dme-mir-1006-3p и обнаружена дополнительная гомология со шпилькой предшественника dme-mir-2492 (Рисунок 16).

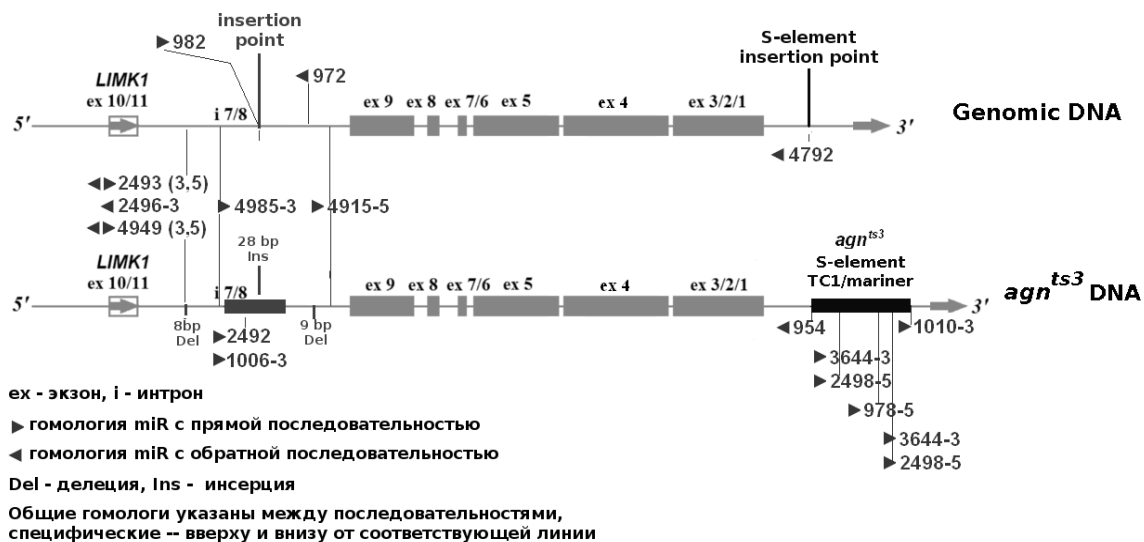


Рисунок 16 - Гомология микроРНК с последовательностью гена *limk1*.

Проведено количественное исследование представленности микроРНК у этих линий. Оказалось, что у мутанта *agn^{ts3}* изменена экспрессия 158 зрелых микроРНК, а также снижен общий уровень экспрессии микроРНК по сравнению с линиями дикого типа (Рисунок 17).

Поэтому возникает вопрос: что же является отличительной особенностью последовательности гена *limk1* у мутанта *agn^{ts3}*, могущей приводить к такому характерному спектру микроРНК? Можно выдвинуть два предположения: разрушение сайтов связывания микроРНК или приобретение новых сайтов. Тогда какие же микроРНК связываются с этими сайтами?

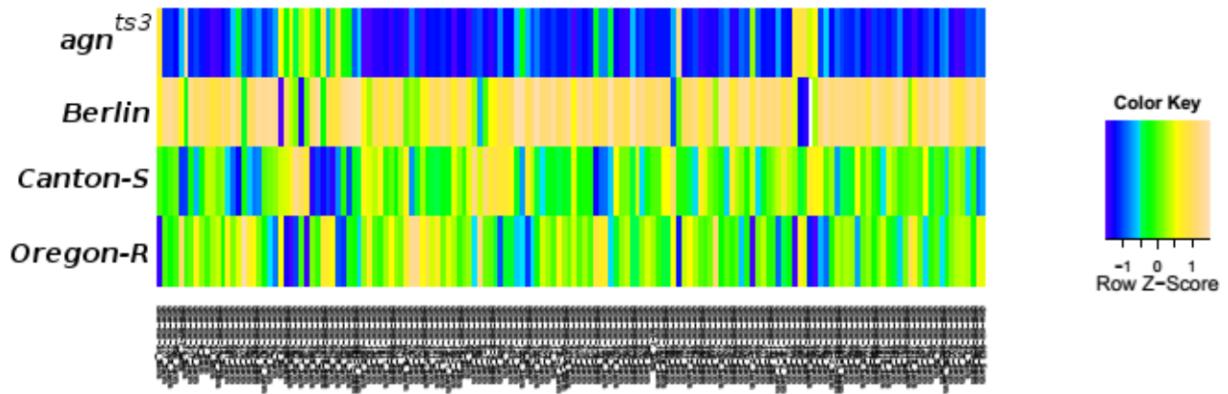


Рисунок 17 - МикроРНК дрозофилы, уровень которых достоверно изменен у *agn^{ts3}* по сравнению с линиями *CS*, *Or-R* и *Berlin*.

Мы провели компьютерный поиск сайтов связывания микроРНК *D. melanogaster* с участками *limk1*, несущими протяженные вставки и делеции у полиморфных линий. Он был осуществлен с помощью программы, предсказывающей связывание микроРНК с 3'-UTR мРНК (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html) и представлен на рисунке 18.

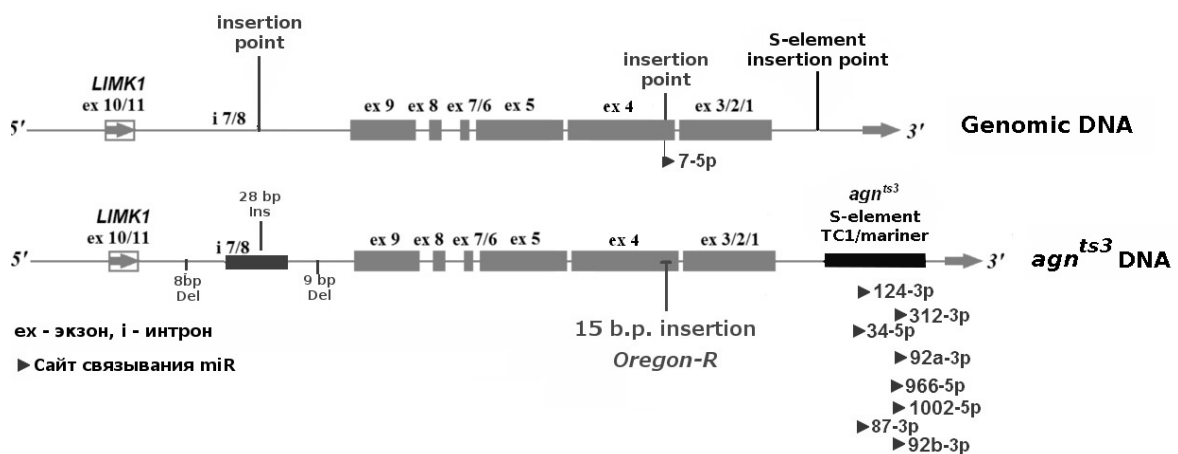


Рисунок 18 - Новые сайты связывания микроРНК, возникающие за счет инсерции транспозона (S-element Tc1/mariner) у *agn^{ts3}* в 3'-UTR гена *limk1* и инсерции 15 п.н. у *Or-R*.

Вставка транспозона семейства Tc1/mariner у *agn^{ts3}* создает 8 новых сайтов связывания микроРНК: 124-3arm, 312-3arm, 92a-3arm, 34-5arm, 966-5arm, 87-3arm, 92b-3arm и 1002-5arm. Таким образом, мутации в гене *limk1* у *agn^{ts3}* изменяют сайты гомологии с микроРНК, создавая новые по сравнению с диким типом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для современной нейрофизиологии и медицины крайне необходимо понимание механизмов возникновения социально-значимых болезней, таких как нейродегенеративные заболевания (БА, БП, БХ), что важно для разработки терапевтических стратегий их лечения. Поскольку нарушения в сигнальном каскаде ремоделирования актина (рецепторы нейротрансмиттеров — малые ГТФазы Rho-семейства — LIMK1 — кофилин — актин) могут приводить к возникновению симптомов НДЗ, в последнее время они получили название «болезни актинового цитоскелета», или «кофилинопатии» (Bamburg, Bloom, 2009, Bernstein, Bamburg, 2010).

Другой проблемой при медико-генетическом консультировании являются «геномные заболевания» — синдромы со множественными проявлениями, спорадически возникающие вследствие делеций или дупликаций при неравной рекомбинации в районах хромосомы со специфической архитектурой. Одним из примеров таких заболеваний является синдром Уильямса, возникающий вследствие протяженной (1500 т.п.н.) делеции в области 7q11.23, затрагивающей более чем 20 генов. Наименьшая из установленных делеций затрагивает *limk1*, ген ключевого фермента ремоделирования актина. Гемизиготность LIMK1 вызывает нейропатологические (локомоторные) и когнитивные расстройства — нарушения зрительно-пространственного ориентирования.

Каким образом получается, что вышеуказанные заболевания с различными этиологией, возрастом возникновения, поражаемыми структурами мозга, тем не менее, перекрываются на одном уровне — сигнального каскада ремоделирования актина? В настоящем исследовании мы предприняли попытку проследить взаимодействие между различными генными сетями, участвующими в регуляции функциональных процессов мозга в норме и при патологии. Схема этого взаимодействия представлена на рисунке 19.



Рисунок 19 - Взаимодействие между различными генными сетями, участвующими в регуляции функциональных процессов мозга в норме и при патологии (функциональные блоки представлены разным цветом).

Таким образом, становится очевидным, что на современном этапе все имеющиеся представления об этиопатогенезе НДЗ, такие как эксайтотоксичность, изменение конформации клеточных белков, дефекты шаперонной защиты, нарушения актинового цитоскелета, сливаются воедино. Поэтому приоритетом нашей работы явилось изучение роли LIMK1 как ключевого узла взаимодействия между различными генными сетями, участвующими в регуляции функциональных процессов мозга.

Уровень же активности LIMK1 регулируется микроРНК. Впервые регуляторная роль микроРНК была показана для miR-134 при взаимодействии с мРНК для LIMK1 у мышей (Schratt et al., 2006). С тех пор сформировалось представление о том, что дисрегуляция микроРНК, являющихся мощным фактором эпигенетической регуляции, может быть причиной возникновения НДЗ, подавляющее большинство которых возникает спорадически (Savvateeva-Popova et al., 2008; Maciotta et al., 2013). Таким образом, исходная концепция ключевой роли генов, напрямую определяющих морфологию мозга и поведение, сменилась концепцией мозговой пластичности и необходимости поиска эпигенетических факторов, влияющих на развитие мозга и его функций,

проявляющихся в поведенческих изменениях.

В результате проведенного исследования трех основных диагностических признаков НДЗ с привлечением моделей на дрозофиле мы проследили весь путь от гена к поведению, что позволяет предложить схему полного изучения генеза нейропатологии при нейродегенеративных и геномных заболеваниях (Рисунок 20).



Рисунок 20 - Изучение генеза нейропатологии при нейродегенеративных и геномных заболеваниях с учетом генетических и эпигенетических аспектов.

Таким образом, современное понимание механизмов генетической и эпигенетической регуляции нервных сетей мозга при формировании памяти может быть достигнуто только совместными усилиями физиологии и генетики. Это открывает новые перспективы для разработки инновационных средств терапии при прогрессирующих нейродегенеративных заболеваниях.

ВЫВОДЫ

Комплексный анализ основных признаков нейродегенеративных заболеваний с использованием линий дрозофилы, несущих мутации, затрагивающие различные компоненты генных сетей, участвующих в регуляции функциональных процессов мозга, и трансгенных линий, несущих гены человека для нейротрофических факторов, а также некодирующих РНК, показал:

1. Нарушение структуры гена *limk1* приводило к дефектам обучения, среднесрочной и долгосрочной памяти. Инсерция S-элемента семейства Tc1/mariner в нетранслируемой 3'-области гена *limk1* вызывала восстановление обучения, среднесрочной и долгосрочной памяти при действии теплового шока. Дисбаланс кинуренинов вызывал нарушение сохранения долгосрочной памяти как в норме, так и при действии теплового шока. Накопление 3-гидроксикинуренина ухудшало среднесрочную память при действии теплового шока. Дефект синтеза белков теплового шока приводил к нарушению среднесрочной памяти при действии теплового шока. Активация гена для *GDNF* человека при действии теплового шока влекла за собой восстановление среднесрочной памяти до уровня дикого типа.

2. Анализ звукопродукции, направленный на тонкую диагностику ранних моторных нарушений, показал, что нарушение структуры гена *limk1* чаще всего приводило к возникновению искажений с полициклическими импульсами, что может быть связано с тремором мышц пения. Накопление 3-гидроксикинуренина вызывало наибольшее количество искажений звуковых импульсов.

3. Нарушение структуры гена *limk1* приводило к существенным нарушениям двигательной активности и пространственного ориентирования личинок. Дефекты локомоторной активности, вызванные дисбалансом кинуренинов, носили менее выраженный характер.

4. Локализация компонентов сигнального каскада ремоделирования актина в мозге и нейромышечных контактах дрозофилы носила следующий характер: LIMK1, кофилин и p-CREB сосредоточены преимущественно в цитоплазме, а p-кофилин – в ядре. p-CREB располагается в основном в нейронах, LIMK1 и кофилин – как в нейронах, так и в глии, а для p-кофилина характерно распределение в глиальных клетках.

5. Нарушение структуры гена *limk1* увеличивало количество амилоидных включений, однако тепловой шок способствовал снижению их числа до уровня дикого типа. Накопление 3-гидроксикинуренина приводило к возрастанию

количества амилоидных включений как в норме, так и после теплового шока.

6. Анализ экспрессии генов на уровне трансляции и транскрипции выявил, что полиморфизм по гену *limk1* связан с различным соотношением D- и C-изоформ при сопоставимом суммарном содержании LIMK1. Дисбаланс кинуренинов приводит к увеличению активности генов рецепторов нейротрансмиттеров (*dNR1*, *da7*).

7. Секвенирование и определение последовательности гена *limk1* и изучение микроРНК как фактора эпигенетической регуляции показало, что инсерция 28 п.н. в интроне 1 гена *limk1* обуславливает формирование микроРНК, гомологичной микроРНК *dme-mir-1006*, способной регулировать звукопродукцию и формирование памяти. Вставка S-элемента семейства Tc1/mariner в нетранслируемой 3'-области гена *limk1* приводит к созданию 8 новых сайтов связывания микроРНК и резкому снижению общего уровня экспрессии микроРНК.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Журавлев А.В., Никитина Е.А., Савватеева-Попова Е.В. Обучение и память у дрозофилы: физиолого-генетические основы // Успехи физиол. наук. – 2015. – Т. 46. № 1. – С. 75 – 90.
2. Каминская А.Н., Никитина Е.А., Паялина Т.Л., Молотков Д.А, Захаров Г.А., Попов А.В., Савватеева-Попова Е.В. Влияние соотношения изоформ LIMK1 на поведение ухаживания *Drosophila melanogaster*: комплексный подход // Экологическая генетика. - 2011. - Т. 9. № 4. - С. 3–14.
3. Мамон Л.А., Бондаренко Л.В., Третьякова И.В., Комарова А.В., Никитина Е.А., Пугачева О.М., Голубкова Е.В. Последствия клеточного стресса при нарушенном синтезе белков теплового шока у дрозофилы // Вестник СПбГУ. - 1999. - Сер. 3. Вып. 4. № 24. - С. 100-114.

4. Мамон Л.А., Никитина Е.А., Пугачева О.М., Голубкова Е.В. Влияние материнского и отцовского организмов на определяемую мутацией *l(1)ts403* теплочувствительность ранних эмбрионов *Drosophila melanogaster* // Генетика. - 1999. - Т. 35. № 8. - С. 1078–1085.
5. Медведева А.В., Молотков Д.А., Никитина Е.А., Попов А.В., Карагодин Д., Баричева Е.М., Савватеева-Попова Е.В. Регуляция генетических и цитогенетических процессов сигнальным каскадом ремоделирования актина: структура гена LIMK1, архитектура хромосом и способность к обучению спонтанных и мутантных вариантов локуса *agnostic* дрозофилы // Генетика. - 2008. - Т. 44. № 6. - С. 669-681.
6. Никитина Е.А., Каминская А.Н., Молотков Д.А., Попов А.В., Савватеева-Попова Е.В. Влияние теплового шока на обучение, формирование памяти и содержание LIMK1 в мозге самцов *Drosophila melanogaster* с измененной структурой гена *limk1* // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. - 2014. - Т. 50. № 2. - С. 137–147.
7. Никитина Е.А., Комарова А.В., Голубкова Е.В., Третьякова И.В., Мамон Л.А. Полудоминантное влияние мутации *l(1)ts403 (sbr^{l0})* на нерасхождение половых хромосом в мейозе у самок *Drosophila melanogaster* при тепловом воздействии // Генетика. - 2003. - Т. 39. №3. - С. 1–8.
8. Никитина Е.А., Медведева А.В., Долгая Ю.Ф., Корочкин Л.И., Павлова Г.В., Савватеева-Попова Е.В. Участие GDNF, LIMK1 и белков теплового шока в формировании процессов обучения и памяти у дрозофилы // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. - 2012. - Т. 48. № 6. - С. 588–596.
9. Никитина Е.А., Медведева А.В., Захаров Г.А., Савватеева-Попова Е.В. Локус *agnostic* дрозофилы: вовлеченность в становление когнитивных нарушений при синдроме Уильямса // Acta Naturae. - 2014. - Т. 6. № 2 (21). - С. 58–66.
10. Никитина Е.А., Медведева А.В., Захаров Г.А., Савватеева-Попова Е.В. Синдром Уильямса как модель изучения пути гены – мозг – когнитивные функции: генетика и эпигенетика // Acta Naturae. - 2014. - Т. 6. № 1 (20). С. 9–23.
11. Никитина Е.А., Токмачева Е.В., Савватеева-Попова Е.В. Тепловой шок в период развития центральных структур мозга дрозофилы: формирование памяти у мутанта *l(1)ts403 Drosophila melanogaster* // Генетика. - 2003. - Т. 39. № 1. - С. 33–40.

12. Савватеева-Попова Е.В., Никитина Е.А., Медведева А.В. От нейрогенетики к нейроэпигенетике // Генетика. – 2015. – Т. 51. № 5. – С. 1–12.
13. Godenschwege T.A., Reisch D., Diegelmann S., Eberle K., Funk N., Heisenberg M., Hoppe V., Hoppe J., Klagges B.R.E., Martin J.-R., Nikitina E.A., Putz G., Reifegerste R., Reisch N., Rister J., Schaupp M., Scholz H., Schwarzel M., Werner U., Zars T.D., Buchner S., Buchner E. Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour // Eur. J. Neurosci. – 2004. - V. 20. № 3. - P. 611-622.
14. Kuzin B.A., Nikitina E.A., Cherezov R.O., Vorontsova J.E., Slezinger M.S., Zatsepina O.G., Simonova O.B., Enikolopov G.N., Savvateeva-Popova E.V. Combination of Hypomorphic Mutations of the *Drosophila* Homologues of *Aryl hydrocarbon receptor* and *Nucleosome assembly protein* Family Genes Disrupts Morphogenesis, Memory and Detoxification // PLoS One. - 2014. - V.9. № 4. - e94975.
15. Savvateeva-Popova E.V., Popov A.V., Grossman A.I., Nikitina E.A., Medvedeva A.V., Peresleni A.I., Korochkin L.I., Moe G., Davidowitz E., Pyatkov K.I., Myasnyankina E., Zatsepina O.G., Schostak N., 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. № 1. - P. 9-19.
16. Savvateeva-Popova E.V., Popov A.V., Grossman A., Nikitina E.A., Medvedeva A.V., Peresleni A.I., Molotkov D.A., Kamyshev N.G., Pyatkov K.I., Zatsepina O.G., Schostak N., Zelentsova E.S., Pavlova G., Panteleev D., Riederer P., Evgen`ev M.B. Non-coding RNA as a trigger of neuropathologic disorder phenotypes in transgenic *Drosophila* // J. Neuronal Transm. – 2008. - V. 115. №. 12. - P. 1629-1642.

Публикации в материалах конференций и сборниках научных трудов:

17. Иванова П.Н., Долгая Ю.Ф., Никитина Е.А. Особенности распределения БТШ70 в условиях нарушения актинового каскада у дрозофилы // Тезисы Всероссийской конф. с междунар. участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». 24 – 26 июня 2014. Санкт-Петербург – Колтуши, Россия. С. 68.
18. Медведева А.В., Никитина Е.А., Молотков Д.А., Савватеева-Попова Е.В. Особенности архитектуры хромосом у мутантов локуса *agnostic* дрозофилы - модели

геномных заболеваний человека // Материалы ВОГиС. 21 – 28 июня 2009. Москва, Россия. С. 123.

19. Никитина Е.А. Актин как фактор организации генома // Функциональная морфология, экология и жизненные циклы животных. 2010. Вып. 10. С. 102–113.

20. Никитина Е.А., Долгая Ю.Ф., Журавлев А.В., Савватеева – Попова Е.В. Исследование влияния эндогенных кинуренинов на поведение и организацию цитоскелета у мутантов дрозофилы с нарушениями кинуренинового пути обмена триптофана // Тезисы VII Сибирского физиологического съезда. 27–29 июня 2012. Красноярск, Россия. С. 385–386.

21. Никитина Е.А., Каминская А.Н., Савватеева-Попова Е.В. Влияние теплового шока на когнитивные процессы у *Dr. melanogaster* при полиморфизме гена *limk1* // Тезисы XXII Съезда Физиологического общества им.И.П.Павлова. 16-20 сентября 2013. Волгоград, Россия. С. 384.

22. Никитина Е.А., Медведева А.В., Долгая Ю.Ф., Савватеева-Попова Е.В. Нейропротективная роль GDNF в формировании памяти у дрозофилы // Труды VI Всероссийской научно-практ. конференции с междунар. участием «Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения». 24–26 ноября 2011. Санкт-Петербург, Россия. С. 253–256.

23. Никитина Е.А., Медведева А.В., Долгая Ю.Ф., Захаров Г.А., Журавлев А.В., Каминская А.Н., Паялина Т.Л., Савватеева-Попова Е.В. Изучение триады диагностических признаков нейродегенеративных заболеваний с привлечением моделей на дрозофиле // Научные труды IV Съезда физиологов СНГ. 8-12 октября 2014. Дагомыс, Россия. С. 59.

24. Kaminskaya A.N., Medvedeva A.V., Nikitina E.A., Payalina T.L., Savvateeva-Popova E.V. Adult neuromuscular junctions and memory formation of *limk1* mutant strains *D. melanogaster* // Abstracts of 24th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and the American Society for Neurochemistry. 20-24 April 2013. Cancun, Mexico. J. Neurochemistry. V. 125. Suppl. 1. P. 221.

25. Molotkov D.A., Kaminskaya A.N., Medvedeva A.V., Nikitina E.A., Popov A.V., Savvateeva-Popova E.V. 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 2007. Amsterdam RAI, Netherlands. Parkinsonism & related disorders. V. 13. Suppl. 2. P. S132.

26. 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 remodeling // Abstracts of 39th International Danube Symposium and 1st International Congress on ADHD. 2 – 5 June 2007. Würzburg, Germany. J. Neural Transmission. Vol. 114. №. 7. P. CXIV.

27. Nikitina E.A., Dolgaya Yu.F., Savvateeva-Popova E.V. Influence of endogenic kynurenines on behavior and cytoskeleton organization in *Drosophila* mutants of the kynurenine pathway // Neurodegenerative diseases. Abstracts of 11th International Conference on Alzheimer`s and Parkinson`s Diseases. 6 – 10 March 2013. Florence, Italy. V. 1. № 1. P. 1891.

28. Nikitina E.A., Dolgaya Yu.F., Utesheva N.K., Savvateeva-Popova E.V. Hsp70 intracellular localization in *Drosophila cd* mutant of the kynurenine pathway // Simpler nervous systems. Abstracts of X East European Conference of the international society for invertebrate neurobiology. 6 - 10 September 2012. Moscow, Russia. P. 37.

29. Nikitina E.A., Medvedeva A.V., Zhuravlev A.V., Savvateeva-Popova E.V. *Drosophila agnostic* locus bearing a gene for LIMK1: from heterochromatin via non-coding RNAs to complex behavior // Abstracts of 51th Annual *Drosophila* Research Conference. 7-11 April 2010. Washington, USA. P. 417C.

30. Savvateeva-Popova E.V., Nikitina E.A., Medvedeva A.V., Kaminskaya A.N., Dolgaya Yu.F., Zhuravlev A.V., Zakharov G.A., Payalina T.L. The polymorphism in *limk1* gene and stress effects on courtship behavior and memory formation in *D.melanogaster* // Proceedings of 17th Annual International "Stress and Behavior" Neuroscience and Biopsychiatry Conference. 16–19 May 2012. St. Petersburg, Russia. P. 17.