

ЗАЛОМАЕВА ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

**РОЛЬ ГЕНА *limk1* В ОБУЧЕНИИ И ЗАБЫВАНИИ
У *DROSOPHILA MELANOGASTER***

1.5.5. Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2026

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

Научный руководитель: **Никитина Екатерина Александровна**, доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Маломуж Артем Иванович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биофизики синаптических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

Саранцева Светлана Владимировна, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», заведующий лабораторией экспериментальной генетики Отделения молекулярной и радиационной биофизики

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «__» _____ 2026 года в _____ на заседании Диссертационного совета 24.1.137.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6)

С диссертацией можно знакомиться в библиотеке ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте <http://www.infran.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Иванова Галина Тажимовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно растёт число людей, страдающих деменцией. Под деменцией подразумевают ряд заболеваний, которые негативно влияют на поведение, память и другие когнитивные функции. Одной из патологических характеристик когнитивной дисфункции является потеря дендритных шипиков нейронов (Yang et al., 2018). Дендритные шипики представляют собой постсинаптические мембранные структуры, играющие ключевую роль в синаптической пластичности, составляющей основу обучения и запоминания. Для формирования дендритных шипиков крайне важен актиновый цитоскелет. Он представлен двумя формами актина: полимеризованной F-формой и мономерной G-формой. F-актин способен деполимеризоваться до G-актина, а G-актин может полимеризоваться в F-актин под действием сигнального пути Rac1/кофилин. Rac1 фосфорилирует p21-активируемые киназы (PAK), которые способствуют фосфорилированию LIM-киназы 1 (LIMK1). LIMK1 является ключевым ферментом реорганизации актинового цитоскелета и кодируется геном *limk1* (Vamburg, Bloom, 2009). LIMK1 инактивирует кофилин, фосфорилируя его, что влечет за собой изменение структуры актина. Известно, что инактивация кофилина приводит к снижению обучения и вызывает тяжелые поведенческие аномалии (Ковалева и др., 2019). Таким образом, нарушения синтеза LIMK1 влияют на активность кофилина и синаптическую пластичность, лежащую в основе обучения.

Обучение является механизмом приобретения и сохранения информации, предшествующим формированию памяти (Покровский и др., 1997). Долгое время внимание исследователей, занимающихся изучением проблем формирования и нарушения памяти, было сфокусировано на процессе обучения. Однако в последние годы на передний план вышел вопрос о том, какую роль в формировании и сохранении памяти играет активное забывание (Medina, 2018). Обучение и забывание являются независимыми противоположными процессами. Какой из процессов вносит больший вклад в развитие когнитивных патологий, на сегодняшний день достоверно не определено. Известно, что забывание также регулируется каскадом ремоделирования актина, ключевым ферментом которого является LIMK1 (Davis, Zhong, 2017). Таким образом, ген *limk1* вовлечен в оба процесса – обучение и забывание. В этой связи вопрос о механизмах его влияния на эти процессы, является крайне актуальным.

Для понимания роли LIMK1 в реализации процессов обучения и памяти необходимы исследования на животных моделях, которые дают возможность изучить эти процессы не только на поведенческом, но и на молекулярно-генетическом уровне. Адекватным модельным объектом, позволяющим осуществить комплексное исследование, является *Drosophila melanogaster*. Ген *limk1 Drosophila melanogaster* имеет 71% гомологии с геном *Homo sapiens*, согласно анализу нуклеотидной последовательности. Благодаря расширению знаний и развитию технологий в области молекулярной биологии и генетики возможно создание трансгенных линий дрозофилы с изменённой экспрессией гена *limk1*. Молекулярные механизмы основных форм обучения млекопитающих сходны с таковыми у дрозофилы. Короткий жизненный цикл *Drosophila melanogaster* позволяет проводить пролонгированные исследования на данном объекте. Таким образом, *Drosophila melanogaster* является удобным модельным объектом для изучения роли гена *limk1* в обучении и забывании.

Цель диссертационной работы – изучение роли гена *limk1* в обучении и забывании у *Drosophila melanogaster*.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности формирования и динамики изменения краткосрочной и среднесрочной памяти у дрозофилы линий с полиморфизмом по гену *limk1*.
2. Проанализировать особенности формирования и динамики изменения краткосрочной и среднесрочной памяти у дрозофилы линий с изменением нейроспецифической экспрессии гена *limk1*.
3. Выявить особенности распределения LIMK1 в структурах головного мозга дрозофилы у линий с изменением нейроспецифической экспрессии гена *limk1*.

Научная новизна

Впервые изучена динамика изменения памяти у дрозофилы линий с полиморфизмом по гену *limk1* на временных интервалах от 0 минут до 24 часов при воздействии тепловым шоком и без такового.

Абсолютно новыми являются данные об изменении памяти у дрозофилы линий с активацией и подавлением гена *limk1* в нервной системе, в дофаминергических и серотонинергических нейронах, в холинергических нейронах и нейронах *fruitless*. Наиболее выраженные отличия формирования памяти наблюдали при изменении экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless*,

дофаминергических и серотонинергических нейронах, что, вероятно, указывает на специфическую роль этих клеток мозга в LIMK1-зависимом забывании.

Впервые описано распределение LIMK1 в разных отделах мозга дрозофилы у линий с активацией и подавлением гена *limk1* в нервной системе, в дофаминергических и серотонинергических нейронах, в холинергических нейронах и нейронах *fruitless*. Наибольшую интенсивность флуоресценции белка наблюдали в антеннальных долях и протоцеребруме, а наиболее низкую - в педункулюсах.

Теоретическая и практическая значимость

Работа способствует углублению знаний о молекулярно-генетических механизмах, вовлеченных в возникновение и развитие заболеваний с когнитивными нарушениями. Совокупность полученных данных имеет весомое значение для развития современных воззрений на вовлеченность определенных типов нейронов в процессы памяти. В результате обучения формируется память, сохраняющаяся на протяжении определенного интервала времени. Способность к формированию памяти говорит о высоком потенциале обучения и запоминания, а способность к длительному сохранению памяти - о возможности продолжительное время помнить вновь приобретённую информацию. Снижение способности к сохранению памяти говорит также о преобладании процессов забывания.

На основании проведенных исследований обосновывается положение о вовлечённости гена *limk1* в процессы обучения и забывания. Изменение экспрессии гена *limk1* в различных типах нейронов разнонаправленно сказывается на формировании и сохранении памяти. Так, изменение экспрессии гена *limk1* в нервной системе и холинергических нейронах интенсифицирует забывание, а в нейронах *fruitless*, наоборот, замедляет. Подавление экспрессии гена *limk1* в нервной системе способствует улучшению памяти на начальных этапах, в нейронах *fruitless* - сохранению памяти, в дофаминергических и серотонинергических нейронах снижает способность к обучению и формированию памяти, а в холинергических снижает способность к её сохранению. Активация экспрессии гена *limk1* в нервной системе, холинергических, дофаминергических и серотонинергических нейронах негативно сказывается на сохранении памяти, а в нейронах *fruitless* приводит к снижению способности к формированию памяти.

Результаты проведенных исследований открывают перспективы для дальнейшего изучения белков-партнёров LIMK1 с целью выявления путей

целенаправленного терапевтического воздействия на белки и гены, вовлечённые в развитие когнитивных нарушений. Выявление таких путей может стать первым шагом в создании лекарственных препаратов, корректирующих подобные нарушения. Сравнительно невысокая цена в сочетании с большой скоростью исследований на дрозофиле делают её идеальным объектом для предварительного экспериментального тестирования подобных терапевтических средств. Препараты, прошедшие испытания на такой системе, можно переводить на следующий этап тестирования с использованием позвоночных животных.

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

Положения, выносимые на защиту

1. Ген *limk1* вовлечен в реализацию как процессов формирования и сохранения памяти, так и забывания у *Drosophila melanogaster*.

2. Характер влияния нейроспецифического изменения активности гена *limk1* на способность к формированию, сохранению и динамике изменения памяти у *Drosophila melanogaster* определяется конкретным типом нейронов.

3. Сохранение памяти требует надлежащего баланса активности *limk1* в различных типах нейронов и структурах мозга у *Drosophila melanogaster*.

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на: XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI и XXVII научных школах-конференциях молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, Москва); III, VI и V Молодежных школах-конференциях «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (2019, 2023, 2025, Москва); The allied genetic conference (2020, Вашингтон); Всероссийских конференциях с международным участием «Интегративная физиология» (2020, 2021, 2022, 2023, Санкт-Петербург); Четвертой международной конференции «Физика – наукам о жизни» (2021, Санкт-Петербург); VIII Молодежной школо-конференции по молекулярной биологии и генетическим технологиям института цитологии РАН (2022, Санкт-Петербург); 13th и 14th International Multiconferences “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology” (2022, 2024, Новосибирск); XXIV съезде физиологического общества им. И. П. Павлова (2023, Санкт-Петербург); Всероссийской конференции с

международным участием «Дрозофила 2023» (2023, Гатчина); VIII съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (2024, Саратов); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Учение академика И.П. Павлова в современной системе нейронаук» (2024, Санкт-Петербург); Международной научно-практической конференции «Генетика и физиология: прошлое, настоящее, будущее» IGRN2025 (2025, Алматы).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы 43 научные работы, включая 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора

Все экспериментальные данные, описанные в данной диссертации, получены либо лично автором, либо при её непосредственном участии. Автор принимала непосредственное участие в определении цели и постановке задач исследования, планировании, подготовке и проведении экспериментов, обработке результатов, а также подготовке публикаций и докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных экспериментальных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованных литературных источников. Объем диссертации составляет 157 страниц печатного текста, содержит 4 приложения, 6 таблиц и 57 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 243 источника, из них 28 отечественных и 215 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и методы исследования

В работе использовали следующие линии *Drosophila melanogaster* из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем»:

- *Canton-S* – линия дикого типа.
- *Berlin* – линия дикого типа, выделена из дикой популяции города Берлина и широко используется при анализе поведения в Европе.
- *Oregon-R* – линия дикого типа, выделенная из естественной популяции штата Орегон, США.
- *agn^{ts3}* – линия, несущая термочувствительную мутацию по гену *limk1* в локусе *agnostic*, влияющую на метаболизм цАМФ, полученная и поддерживаемая на генетическом фоне линии *Canton-S*.

Исследуемые линии *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R* и *agn^{ts3}* несут мутации и однонуклеотидные замены по гену *limk1* в 5'-регуляторной области и экзон-интронных областях.

В работе также использовали трансгенные UAS и Gal4 линии дрозофилы, которые были получены из биобанка Bloomington Drosophila Stock Center (BSDC), США.

- Трансгенная линия с генотипом $y[1] \ v[1]; P\{y[+t7.7] \ v[+t1.8]=TRiP.JF02063\}attP2$ – экспрессирует ген двухцепочечной РНК (dsRNA) для РНК интерференции гена *limk1* под контролем регуляторной последовательности UAS (номер в BSDC 26294).

- Трансгенная линия с генотипом $y[1] \ w[*]; P\{w[+mC]=UAS-LIMK1.T:Ivir\HA1\}M6$ - экспрессирует LIMK1 дикого типа, находящийся под контролем регуляторной последовательности UAS (номер в BSDC 9116).

- Трансгенная линия с генотипом $y[1] \ v[1]; P\{y[+t7.7]=CaryP\}attP2$ - является материнской линией по отношению к 26294 и 9116: ген dsRNA для РНК интерференции LIMK1 отсутствует (номер в BSDC 36303).

- Трансгенная линия с генотипом $w[*]; P\{w[+mC]=nrv2-GAL4.S\}8 \ P\{w[+mC]=UAS-GFP.S65T\}eg[T10]$ - экспрессирует активатор Gal4 в нервной системе и запускает экспрессию Green fluorescent protein (GFP) (номер в BSDC 6794).

- Трансгенная линия с генотипом $w[*]; P\{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4\}19BP\{w[+mC]=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF[T2]$ - экспрессирует

активатор Gal4 в холинергических нейронах и запускает экспрессию GFP (номер в BSDC 6793).

- Трансгенная линия с генотипом $w[1118]; P\{w[+mC]=Ddc-GAL4.L\}Lmpt[4.36]$ - экспрессирует активатор Gal4 в дофаминергических и серотонинергических нейронах (номер в BSDC 7009).

- Трансгенная линия с генотипом $w[1118]; P\{w[+mW.hs]=GawB\}fru[NP0021]$ - экспрессирует активатор Gal4 в нейронах *fruitless*, отвечающих за половое поведение (номер в BSDC 30027).

Для подавления и активации экспрессии гена *limk1* использовали систему скрещивания GAL4-UAS. Были проведены следующие скрещивания:

1. Подавление гена *limk1* в нервной системе (♀ 6794 x ♂ 26294).
2. Активация гена *limk1* в нервной системе (♀ 6794 x ♂ 9116).
3. Контроль: без изменения экспрессии *limk1* в нервной системе (♀ 6794 x ♂ 36306).
4. Подавление гена *limk1* в холинергических нейронах (♀ 6793 x ♂ 26294).
5. Активация гена *limk1* в холинергических нейронах (♀ 6793 x ♂ 9116).
6. Контроль: без изменения экспрессии *limk1* в холинергических нейронах (♀ 6793 x ♂ 36306).
7. Подавление гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах (♀ 7009 x ♂ 26294).
8. Активация гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах (♀ 7009 x ♂ 9116).
9. Контроль: без изменения экспрессии *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах (♀ 7009 x ♂ 36306).
10. Подавление гена *limk1* в нейронах *fruitless* (♀ 30027 x ♂ 26294).
11. Активация гена *limk1* в нейронах *fruitless* (♀ 30027 x ♂ 9116).
12. Контроль: без изменения экспрессии *limk1* в нейронах *fruitless* (♀ 30027 x ♂ 36306).

В качестве экспериментального подхода для анализа процессов обучения и забывания у дрозофилы использовали методику подавления ухаживания, основанную на половом поведении самцов. Для тренировки пятисуточного девственного самца исследуемой линии помещали в экспериментальную камеру вместе с оплодотворённой самкой линии дикого типа *Canton-S* на 30 минут. Самцов тестировали через разные интервалы времени после тренировки. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения. За поведением самцов наблюдали в течение 300 с, фиксируя при помощи специальной программы время начала и окончания отдельных

элементов, связанных с ухаживанием (ориентация, преследование, вибрация, попытка копуляции) или несвязанных с ним (активность, прининг, покой). (Kamyshev et al., 1999).

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

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

где ИУ_н – средний индекс ухаживания для независимой выборки самцов, не имеющих опыта полового поведения, ИУ_т – средний индекс ухаживания для независимой выборки обученных самцов, прошедших тренировку. Индекс ухаживания (ИУ) высчитывали как время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах от общего времени наблюдения (Камышев и др., 1999).

Реализация памяти является результатом обоих процессов — обучения и забывания. Для оценки активности процессов забывания провели анализ скорости снижения ИО на коротких временных интервалах (0, 15, 30, 60 минут после тренировки) и спустя 24 часа, когда ИО может оставаться высоким при нарушении активного забывания. Таким образом, интенсивность процессов забывания определяется не абсолютными величинами ИО в каждый момент времени, а динамикой (скоростью) его изменения. Под забыванием подразумевали динамику изменения, а именно снижения ИО. Если индексы обучения снижаются быстрее, чем в контрольной линии, то можно говорить о более интенсивном процессе забывания. В случаях, когда ИО не снижались, делали вывод о способности мух к сохранению памяти. В каждой группе тестировали по 20 пар мух.

Эксперимент проводили в три этапа. На первом этапе провели анализ ИО линий, характеризующихся полиморфизмом по гену *limk1* *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R*, а также у мутантной линии *agn^{ts3}*. На втором этапе провели анализ ИО у тех же линий при воздействии тепловым шоком. Тепловое воздействие проводили в водном термостате GFL 1086 при температуре +37°C в течение 30 минут за 1 час до эксперимента. На третьем этапе провели анализ ИО у линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе, холинергических, дофаминергических и серотонинергических нейронах, нейронах *fruitless*. Контролем служили линии без изменения таковой экспрессии.

Для анализа экспрессии гена *limk1* проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с обратной транскрипцией. РНК выделяли на колонках Direct-zol RNA MiniPrep (ZymoResearch, R2050), с обработкой ДНКазой I на колонках, согласно протоколу фирмы-производителя. Для синтеза кДНК использовали

обратную транскриптазу MMLV (Evrogen, SK021). ПЦР проводили с помощью смеси qPCRmix-HS (Evrogen, PK156L), с использованием системы StepOnePlusReal-Time PCR System (AppliedBiosystems). В каждом эксперименте проводили по пять повторностей.

Анализ распределения белка LIMK1 в различных структурах мозга дрозофилы проводили с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (LSM 710 CarlZeiss), предварительно проведя иммунофлуоресцентное окрашивание мозгов. В работе использовали: первичные антитела крысы к LIMK1 (Enzo Life Sciences, ALX-803-343-C100), вторичные антитела осли к антителам крысы, Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, A-21209); первичные антитела кролика к GFP (Abcam, ab290), вторичные антитела козы к антителам кролика, Alexa Fluor 633 (Invitrogen, A21071); первичные антитела мыши к *Drosophila* cysteine string protein (CSP) (любезно предоставлены профессором Эриком Бухнером, Институт клинической нейробиологии, Вюрцбург), вторичные антитела козы к антителам мыши, AlexaFluor 488 (Invitrogen, A32723). В каждом эксперименте проводили по три повторности.

Для оценки способности к обучению использовали рандомизационный анализ (Камышев и др., 1999; Sokal, Rohlf, 1995). Анализ уровня мРНК LIMK1 проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Анализ среднего уровня LIMK1 проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующими апостериорными попарными сравнениями с помощью U-критерия Манна-Уитни. Уровень значимости принимали $\leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Оценка процессов обучения и забывания у самцов дрозофилы

Оценка процессов обучения и забывания у линий, проявляющих полиморфизм в гене *limk1*

Исследования, проведённые ранее на линиях природных популяций с полиморфизмом по гену *limk1* (*Canton-S*, *Berlin* и *Oregon-R*) и мутантной линии *agn^{ts3}*, показали нарушения различных форм памяти. Так, у линии *Berlin* были выявлены нарушения долгосрочной памяти, у линии *Oregon-R* - нарушения краткосрочной и среднесрочной памяти, а у линии *agn^{ts3}* - всех видов памяти (Каминская и др., 2015; Никитина и др., 2014b). Поскольку, согласно современным представлениям, в формировании и сохранении памяти важную роль наряду с процессом обучения играет активное забывание, мы поставили

задачу изучить оба данных процесса у мух вышеупомянутых линий с целью определения роли каждого из них.

Как показано на рисунке 1, показатели ИО у линии *Canton-S* достоверно не изменяются, однако мы можем наблюдать их снижение с течением времени. У линии *Berlin* ИО через 15, 60 мин и 24 ч достоверно ниже, чем у *Canton-S* ($p \leq 0,05$). У линий *Oregon-R* и *agn^{ts3}* ИО низкие на всех временных интервалах и достоверно отличаются от ИО линии *Canton-S* ($p \leq 0,05$). Для оценки активности процессов забывания необходимо учитывать скорость снижения ИО на коротких временных интервалах. Сразу после тренировки ИО мух линий *Canton-S* и *Berlin* близки, однако спустя 15 минут кривая ИО *Berlin* лежит ниже, чем для *Canton-S*. Динамика ИО *Oregon-R* и *agn^{ts3}* слабо выражена. ИО сохраняется на протяжении исследуемого периода времени на относительно постоянном низком уровне. Таким образом, реализация процессов обучения и формирования памяти, а также динамика забывания может быть обусловлена полиморфизмом по гену *limk1*. При этом важно, характерно ли это только для интактного контроля, и приведет ли действие стресса к изменению протекания когнитивных процессов.

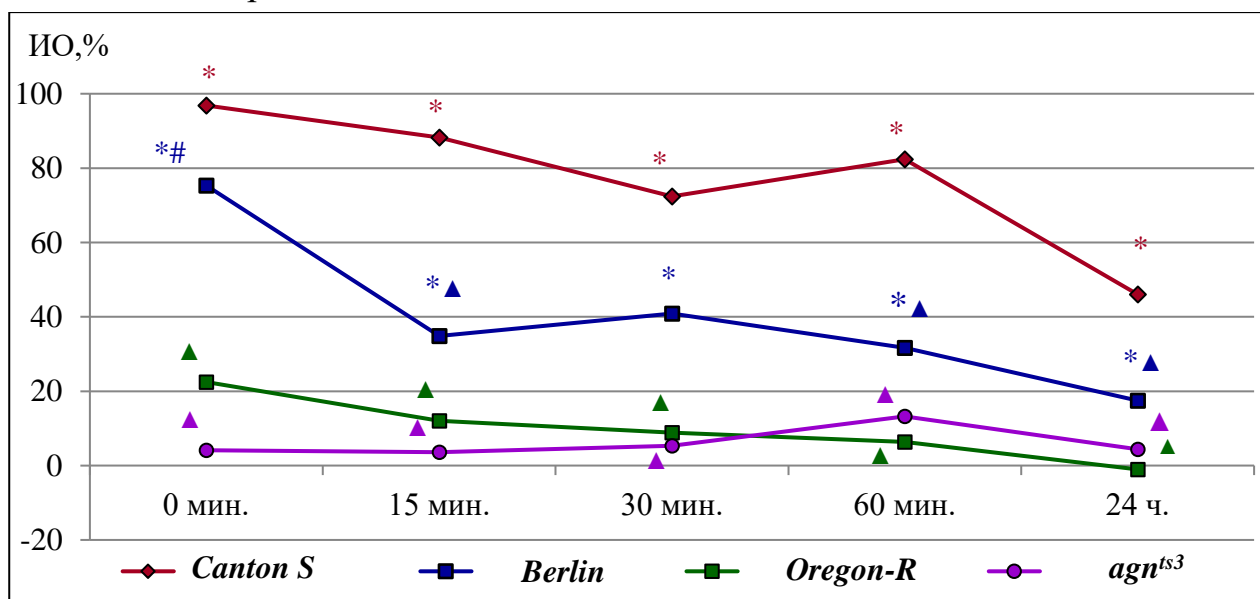


Рисунок 1. Динамика индексов обучения *Drosophila melanogaster* линий, проявляющих полиморфизм в гене *limk1*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от 0, ▲ - достоверно отличается от *Canton-S*, # - достоверно отличается от 24 ч ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Влияние теплового шока на процессы обучения и забывания у линий, проявляющих полиморфизм в гене *limk1*

Ранее было показано восстановление способности к обучению и формированию памяти у мутантной линии *agn^{ts3}* после воздействия

стрессорными факторами, такими как тепловой шок и ослабление магнитного поля Земли (Никитина и др., 2012, 2014а, 2017). Поскольку инициация синтеза белков теплового шока как ответная реакция на стресс обеспечивает способность организма менять врождённые формы поведения и восстанавливать функционирование процессов, лежащих в основе обучения и памяти (Никитина и др., 2014а), мы задались вопросом о влиянии теплового шока на процессы обучения и забывания у исследуемых линий.

Исследование показало, что у мух линии *Canton-S* тепловой шок вызывает снижение ИО: через 24 часа после тренировки он уже достоверно ниже, чем сразу после тренировки. Кроме того, ИО отличается от интактного контроля в точке 24 часа ($p \leq 0,05$) (рис. 2). У мух линии *Berlin* также спустя 24 часа после тренировки ИО достоверно снижается по сравнению с тестом сразу после тренировки ($p \leq 0,05$). Однако в целом действие теплового шока на линию *Berlin* устраняет отличия ИО данной линии от *Canton-S*. Тепловой шок устраняет отличия ИО мух линии *Oregon-R* от *Canton-S* только через 24 часа. Тепловой шок восстанавливает у мутанта *agn^{ts3}* уровень ИО, присущий в норме линии *Canton-S*. Также тепловой шок оказывает влияние и на динамику изменения памяти. Так, например, стрессирующее воздействие теплового шока интенсифицирует забывание у *Canton-S*, но, наоборот, препятствует ему у *agn^{ts3}*, что является косвенным подтверждением роли факторов стрессорного ответа в формировании памяти и забывании.

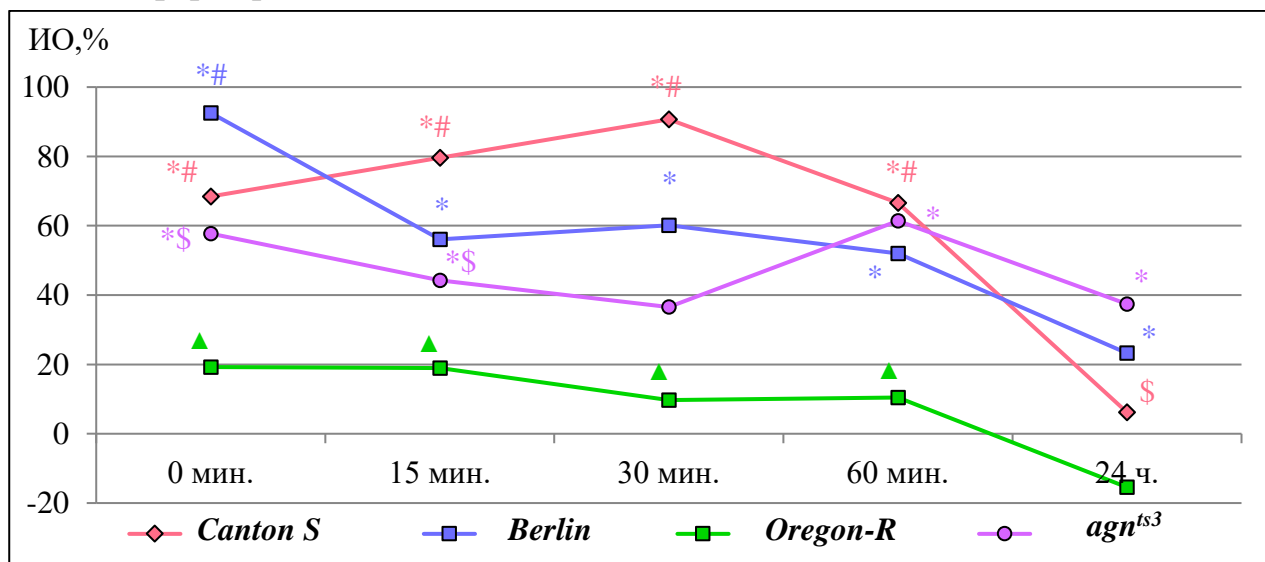


Рисунок 2. Динамика индексов обучения *Drosophila melanogaster* линий, проявляющих полиморфизм в гене *limk1* при воздействии тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от 0, ▲ - достоверно отличается от *Canton-S*, # - достоверно отличается от 24 ч, \$ - достоверно отличается от интактного контроля ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Таким образом, действие внешних стрессорных факторов может изменять протекание как процессов обучения (Медведева и др., 2020), так и забывания, компенсируя изменения структуры гена *limk1* на функциональном уровне. Кроме того, известно, что после стрессорного воздействия снижается активность LIMK1, что также может оказывать существенное влияние на динамику забывания (Никитина и др., 2023; Munsie et al., 2011).

Оценка процессов обучения и забывания у линий с изменением экспрессии гена *limk1*

У исследуемых линий с полиморфизмом по гену *limk1* ранее были выявлены различия в содержании изоформ LIMK1, позволившие предположить, что именно полиморфизм LIMK1 вызывает нарушения обучения и формирования памяти у самцов. В этой связи мы задались закономерным вопросом: как будет отражаться изменение экспрессии гена *limk1* на процессах забывания. Для этого провели анализ динамики ИО у линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе, в холинергических нейронах, в дофаминергических и серотонинергических нейронах и в нейронах *fruitless*.

При анализе ИО линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе выявили, что у мух контрольной линии ИО после тренировки на всем тестируемом промежутке времени достоверно отличались от нуля (рис. 3). Таким образом, мухи данной линии способны к обучению и сохраняют память вплоть до 24 часов после 30-минутной тренировки. Подавление экспрессии *limk1* в нервной системе повышает ИО сразу после тренировки (0 — 15 мин) и, также, способствует сохранению памяти до 24 часов. При этом скорость забывания у линии с подавлением *limk1* на интервале 0 — 60 мин выше, чем у контроля. Статистически значимых отличий ИО от контроля не наблюдали. Активация *limk1* в нервной системе, напротив, снижает ИО у мух на начальном этапе (30 мин ниже по сравнению с контролем и линии с подавлением *limk1*). Начиная с 30 мин ИО не отличаются от нуля, а спустя 24 ч ИО достоверно ниже, чем сразу после тренировки.

Таким образом, активация *limk1* в нервной системе увеличивает скорость забывания. Это согласуется с ранее полученными данными об отсутствии способности к обучению у линии *agn^{ts3}*, у которой количество LIMK1 выше в сравнении с линией дикого типа (Каминская и др., 2011).

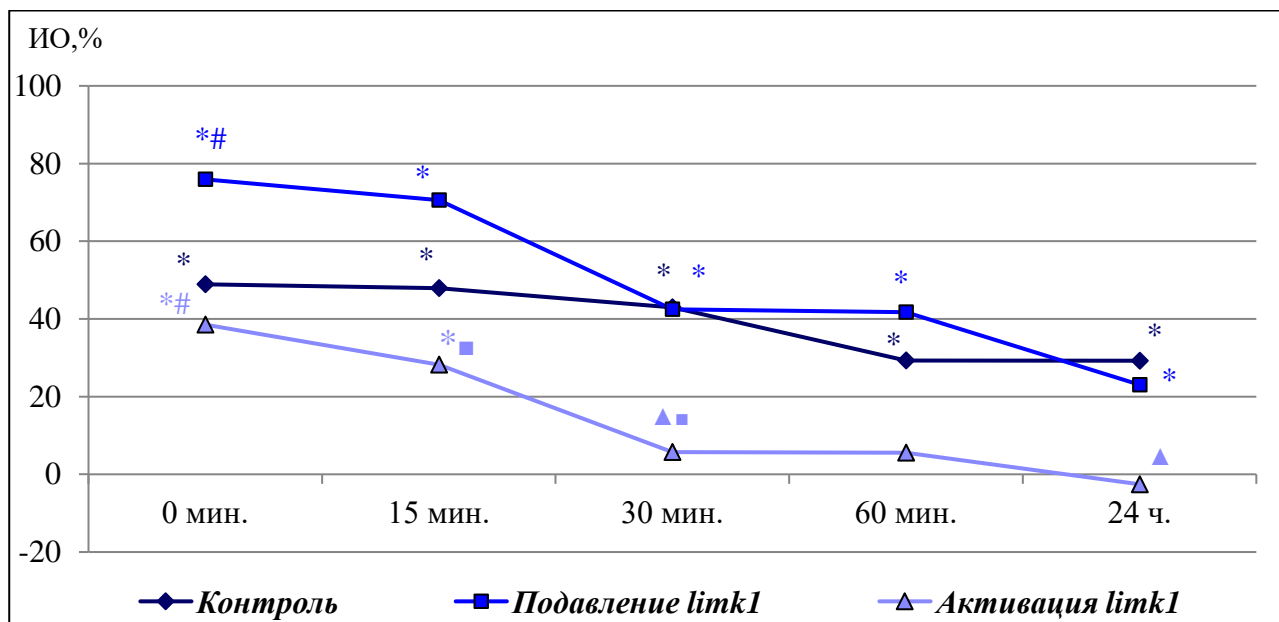


Рисунок 3. Динамика индексов обучения линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе у *Drosophila melanogaster*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, # - достоверно отличается от 24 ч, ▲ - достоверно отличается от контроля, ■ - достоверно отличается от линии с подавлением *limk1* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Возникает вопрос: с какими типами нейронов может быть связано нарушение когнитивных процессов у дрозофилы? При анализе ИО линий с изменением экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах выявили, что контрольная линия способна к обучению и сохранению памяти вплоть до 60 минут (рис. 4). Подавление *limk1* в холинергических нейронах не оказывает значительного влияния на формирование памяти, но ускоряет забывание: спустя 60 мин после обучения ИО не отличается от нуля, но отличается от контроля и теста сразу после тренировки. Активация *limk1* в холинергических нейронах имеет аналогичный эффект: отличий ИО от нуля не наблюдается уже спустя 15 мин после тренировки, а спустя 30 минут ИО уже отличается от 0 минут. Изменение экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах ускоряет забывание. Ацетилхолин может оказывать двойное воздействие в зависимости от фазы запоминания. Экспериментально было показано, что высокий уровень ацетилхолина в гиппокампе способствует кодированию новой информации, а низкий уровень способствует консолидации вновь закодированной информации (Micheau, Marighetto, 2011). Возможно, при формировании памяти для холинергических нейронов активация *limk1* более благоприятна, чем её подавление: самый высокий уровень ИО наблюдали именно у данной линии, однако достоверных отличий сразу после тренировки мы не наблюдали.

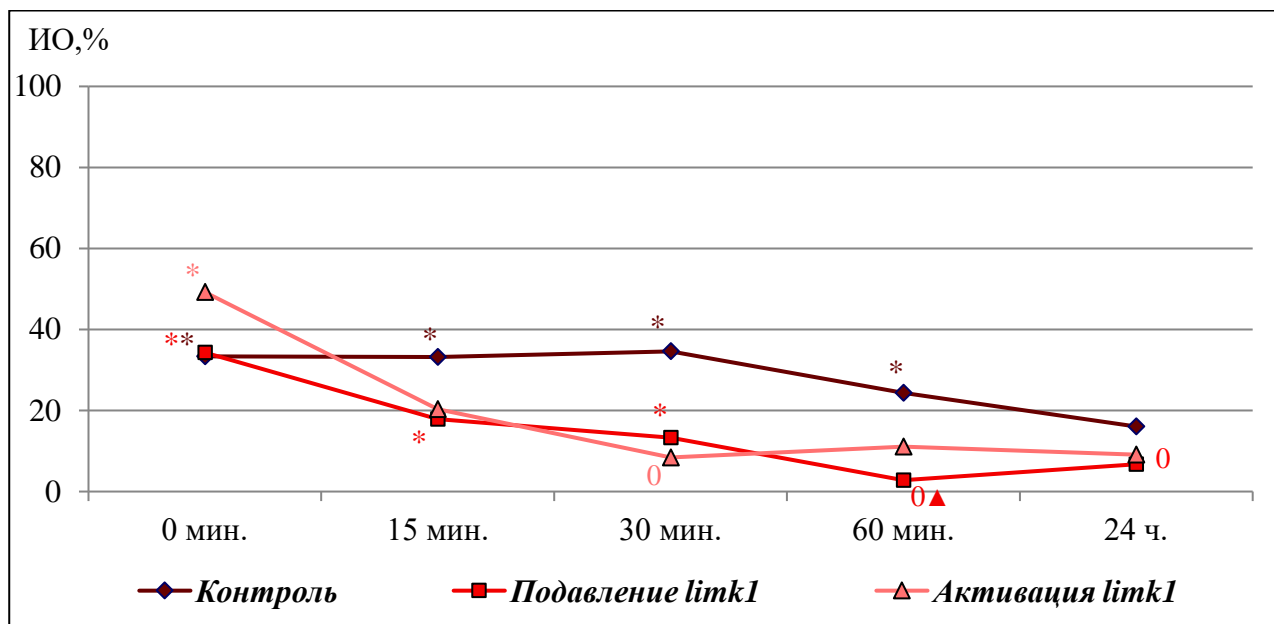


Рисунок 4. Динамика индексов обучения линий с изменением экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах у *Drosophila melanogaster*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, 0 - достоверно отличается от 0 мин, ▲ - достоверно отличается от контроля ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

При анализе ИО линий с изменением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах выявили, что контрольная линия способна к обучению и сохранению памяти вплоть до 30 минут (рис. 5). При этом спустя 24 часа память у данной линии резко нарушена, и ИО даже оказался отрицательным — т.е. спустя 24 часа обученные самцы ухаживали за самкой активней, чем наивные самцы. Подавление *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах снижает ИО, которые статистически не отличаются от нуля уже сразу после тренировки. Мухи линии с активацией *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах показали способность к обучению, однако спустя 24 часа после тренировки ИО также принял отрицательное значение. Кривые забывания у мух всех трёх линий демонстрируют сходный характер. На протяжении 60 мин ИО сохраняется на относительно постоянном уровне, а через 24 ч после тренировки приобретает отрицательные значения (Медведева и др., 2022).

Поскольку дофамин и серотонин являются важными нейромедиаторами для реализации процессов памяти, неудивительно было обнаружить сниженную способность к формированию памяти у линии с подавлением экспрессии *limk1* в данных типах нейронов. Активация *limk1*, наоборот, препятствует забыванию спустя 24 часа после тренировки. Этот факт также может быть связан с положительным влиянием исследуемых нейромедиаторов на процессы памяти (Keleman et al., 2012; Sitaraman et al., 2008; Sitaraman et al., 2012).

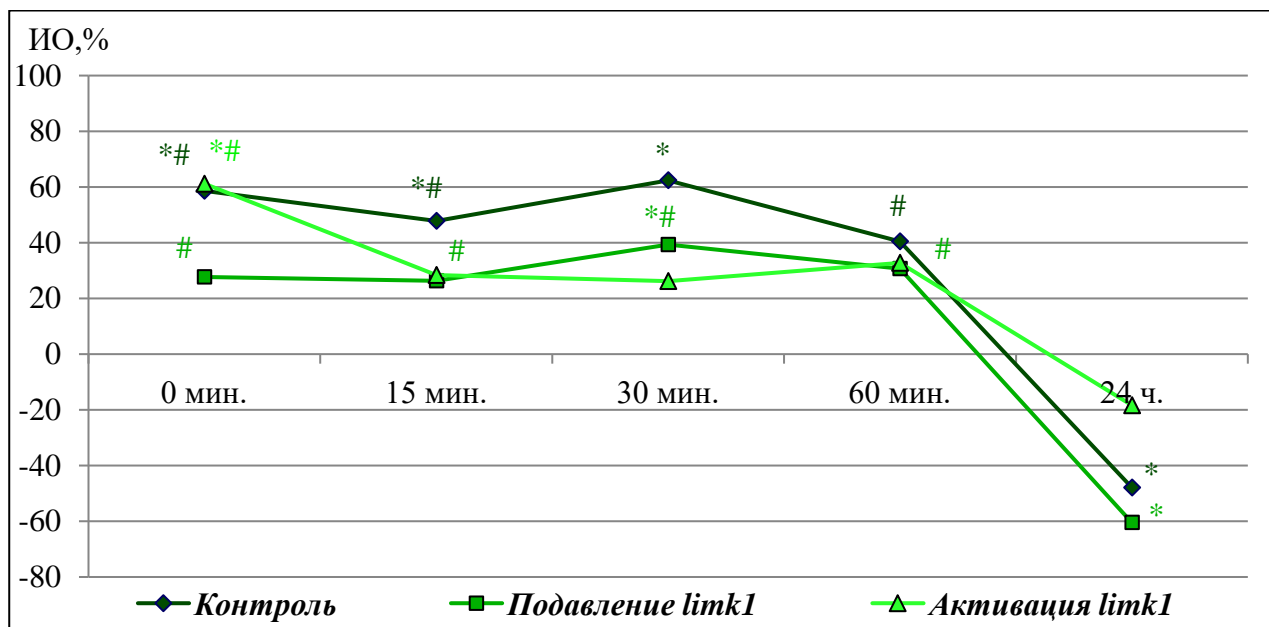


Рисунок 5. Динамика индексов обучения линий с изменением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах у *Drosophila melanogaster*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО – индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, #- достоверно отличается от 24ч ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

При анализе ИО линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless* выявили, что у контрольной линии забывание развивается быстрее, чем у остальных линий без изменения экспрессии: уже через 30 мин после обучения ИО не отличается от нуля (рис. 6). Подавление *limk1* в нейронах *fruitless* восстанавливает память на интервале 30 — 60 мин. и замедляет процессы забывания. У линии с активацией *limk1* в нейронах *fruitless* в большинстве точек значения ИО были низкими, а спустя 60 минут после тренировки достоверно отличались от ИО линии с подавлением *limk1*. Спустя 24 часа после тренировки ИО всех трёх линий имеют схожие значения. У контрольной линии ИО спустя 24 часа достоверно ниже, чем сразу после тренировки, а у линии с активацией *limk1* достоверно ниже, чем спустя 15 минут после тренировки.

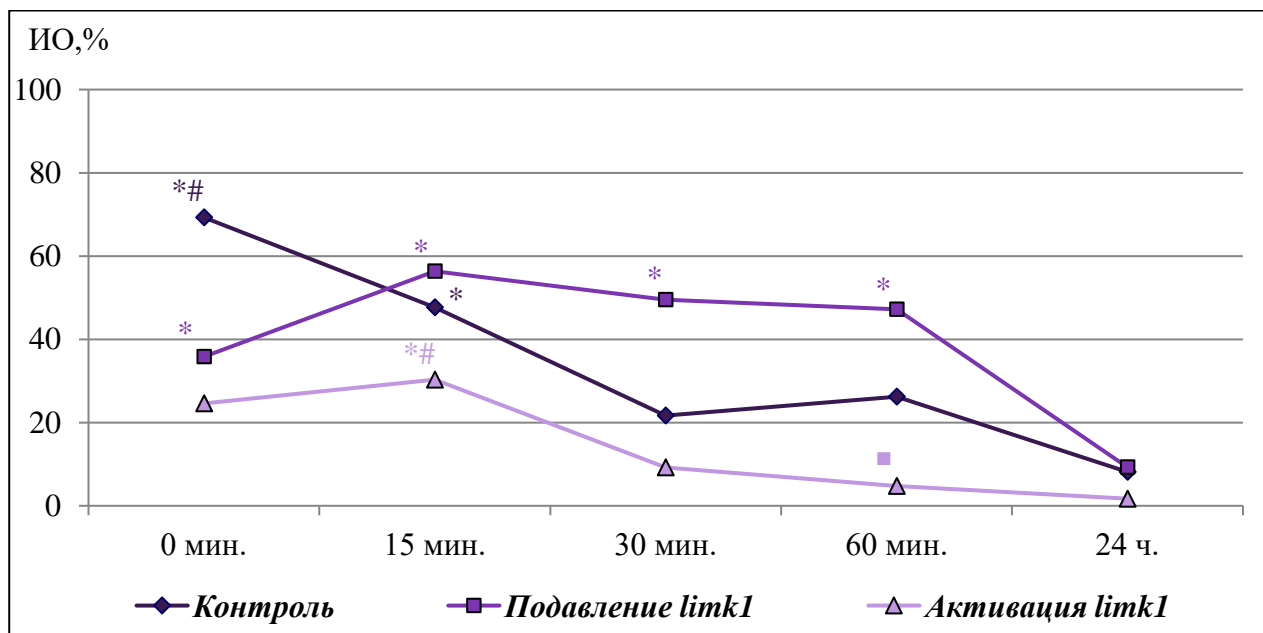


Рисунок 6. Динамика индексов обучения линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless* у *Drosophila melanogaster*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, #- достоверно отличается от 24 ч, ■ - достоверно отличается от линии с подавлением *limk1* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Таким образом, полученные данные говорят о вовлеченности гена *limk1* в процессы врожденного забывания у *Drosophila melanogaster*. При этом характер влияния нейроспецифического изменения гена *limk1* на динамику ИО определяется конкретным типом нейронов. В этой связи представляется совершенно необходимым анализ экспрессии гена *limk1* у исследуемых линий.

2. Анализ экспрессии гена *limk1*

На рисунке 7 представлены данные сравнительного анализа экспрессии гена *limk1* в телах самцов дрозофилы с нейроспецифической регуляцией экспрессии данного гена. При исследовании уровня РНК у линий с изменением экспрессии в нервной системе, в холинергических нейронах, а также в дофаминергических и серотонинергических нейронах было выявлено, что у линий с подавлением *limk1* уровень РНК был достоверно ниже, а у линий с активацией достоверно выше, чем в контроле. Также у данных линий уровень РНК при активации гена был достоверно выше, чем при подавлении.

При изменении экспрессии в нейронах *fruitless* у линии с подавлением *limk1* уровень РНК был достоверно ниже, чем в контроле. Однако не обнаружено достоверных отличий уровня РНК линии с активацией *limk1* по сравнению с контролем и линией с подавлением экспрессии. Это может быть связано с незначительным количеством нейронов, которого, возможно,

недостаточно для детектирования различий при помощи используемых методов: всего 1,5 тысячи на 100 тысяч нейронов в головном мозге дрозофилы.

Таким образом, ожидаемые различия уровня РНК *limk1* в тканях при подавлении наблюдали у всех исследуемых линий, а при активации - у трёх из четырёх.

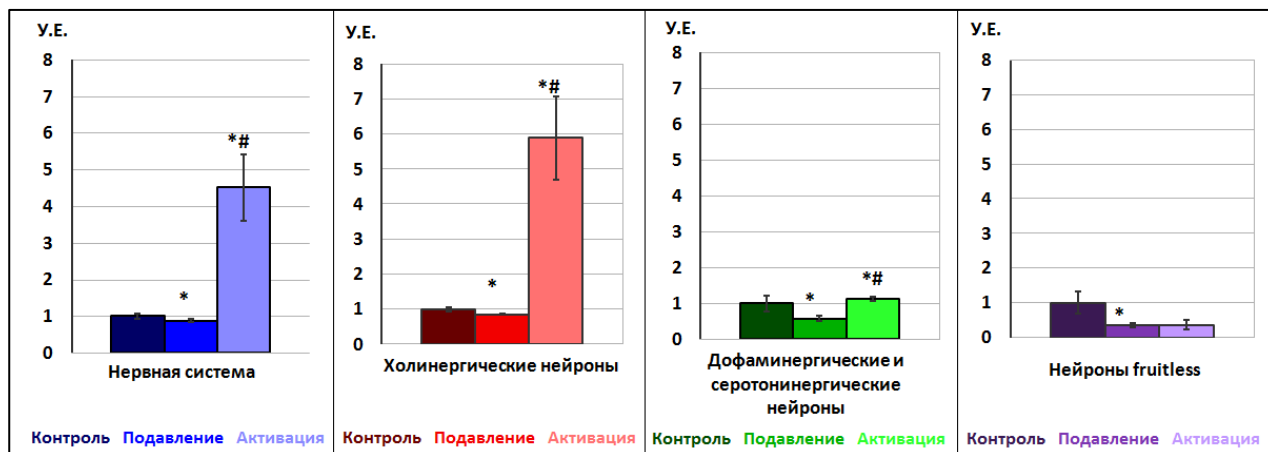


Рисунок 7. Сравнительный уровень РНК *limk1* в теле самцов дрозофилы линий GAL4-UAS с нейроспецифической регуляцией активности гена *limk1*. * - достоверно отличается от контроля, # - достоверно отличается от линии с подавлением *limk1* ($p \leq 0,05$, U-критерий Манна-Уитни)

Поскольку была выявлена вовлечённость гена *limk1* в процессы обучения и забывания, следующим необходимым шагом является анализ распределения белка LIMK1 в различных структурах мозга дрозофилы.

3. Анализ распределения LIMK1 в разных структурах мозга дрозофилы

Проведенные исследования привели нас к поиску ответа на вопрос: в каких структурах мозга дрозофилы изменение экспрессии гена *limk1* оказало наибольшее влияние на обучение и забывание. Для оценки влияния изменения экспрессии гена *limk1* на процессы памяти провели анализ распределения белка LIMK1 в антеннальных долях, протоцеребруме, α , β и γ лопастях грибовидных тел, эллипсоидном теле и педункулюсах.

Сравнительный анализ распределения белка LIMK1 у линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе показал, что у линии с подавлением *limk1* интенсивность флуоресценции в протоцеребрумах, γ лопастях грибовидных тел и эллипсоидном теле была достоверно ниже, чем в контроле (рис. 8). У линии с активацией интенсивность флуоресценции в β лопастях грибовидных тел была достоверно выше, чем в контроле и у линии с подавлением (Zhuravlev et al., 2023; 2024).

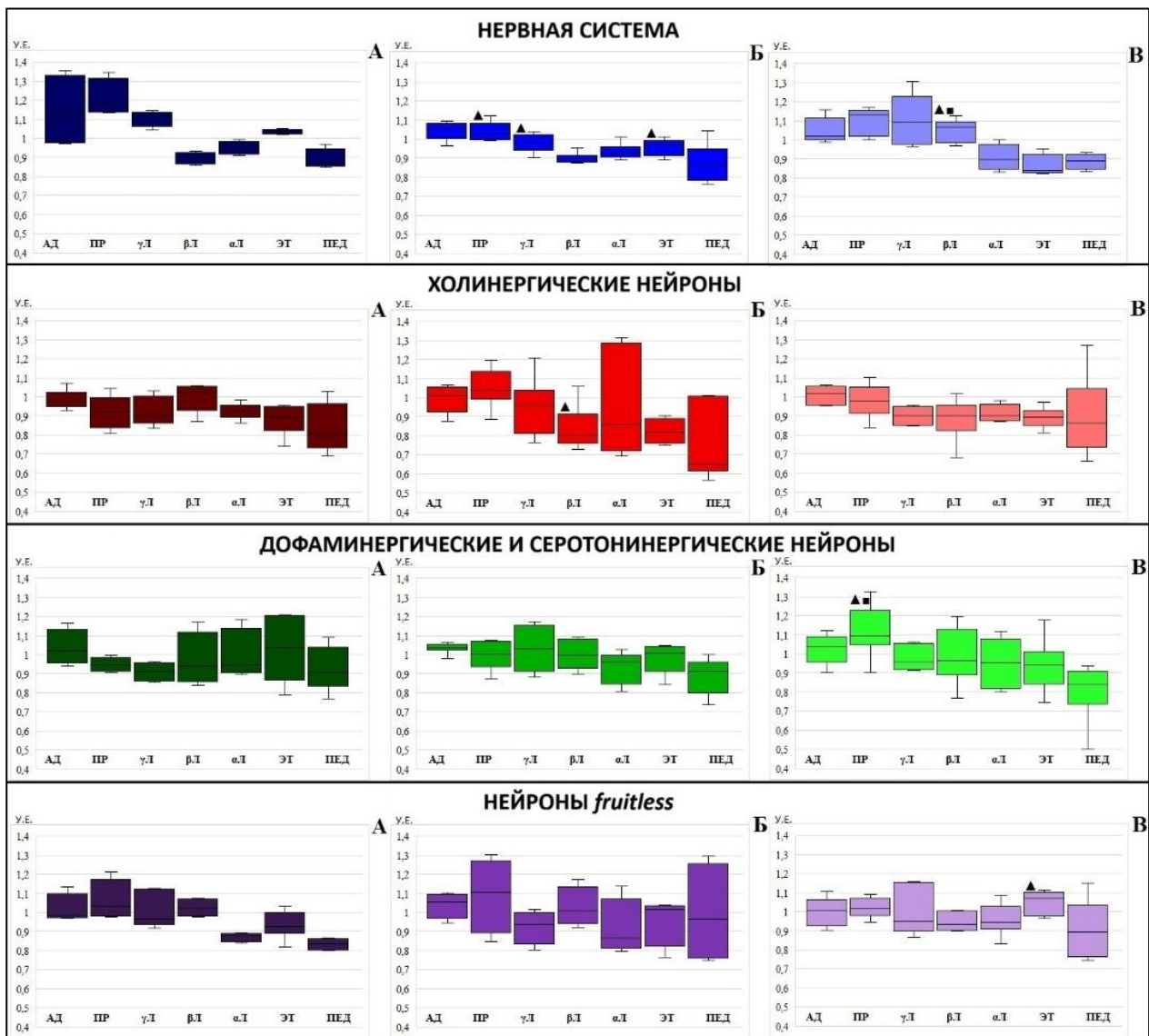


Рисунок 8. Анализ распределения LIMK1 в различных структурах мозга линий GAL4-UAS с нейроспецифической регуляцией активности гена *limk1*. А – контроль, Б – подавление, В – активация. АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γЛ – γ лопасти грибовидных тел, βЛ - β лопасти грибовидных тел, αЛ – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПЕД – педункулы. ▲ - достоверно отличается от контроля, ■ - достоверно отличается от подавления *limk1* ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Сравнительный анализ распределения белка LIMK1 у линий с изменением экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах показал, что в β лопастях грибовидных тел контрольной линии интенсивность флуоресценции была достоверно выше, чем у линии с подавлением экспрессии. Других достоверных отличий не было выявлено.

Сравнительный анализ распределения белка LIMK1 в аналогичных структурах мозга у линий с изменением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах показал, что в протоцеребруме линии с активацией интенсивность флуоресценции была достоверно выше, чем у контрольной линии и у линии с подавлением. Других достоверных отличий не было выявлено.

Сравнительный анализ распределения белка LIMK1 у линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless* показал, что интенсивность флуоресценции в эллипсоидном теле линии с активацией была достоверно выше, чем у контрольной линии. Других достоверных отличий не было выявлено.

ВЫВОДЫ

1. Тепловой шок оказывает разнонаправленное влияние на забывание - интенсифицирует у линии *Canton-S*, препятствует у *agn^{ts3}* и не влияет на динамику забывания у *Berlin*. У линий *Oregon-R* и *agn^{ts3}* слабо выражена динамика изменения памяти как при воздействии тепловым шоком, так и без такового. Динамика забывания у исследуемых линий может быть обусловлена полиморфизмом по гену *limk1*.

2. Подавление экспрессии гена *limk1* в нервной системе *Drosophila melanogaster* (преимущественно в протоцеребруме, γ лопастях грибовидных тел и эллипсоидном теле) способствует улучшению памяти и увеличивает скорость забывания. Активация экспрессии гена *limk1* в нервной системе (преимущественно в β лопастях грибовидных тел) ускоряет забывание.

3. Изменение экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах *Drosophila melanogaster* ускоряет забывание. При этом активация гена не оказывает значимого влияния на изменение интенсивности флуоресценции LIMK1 в разных отделах мозга, а его подавление влияет: снижает флуоресценцию LIMK1 в β лопастях грибовидных тел.

4. Подавление экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах *Drosophila melanogaster* снижает способность к обучению и формированию памяти, но не оказывает значимого влияния на динамику забывания и не влияет на изменение интенсивности флуоресценции LIMK1 в разных отделах мозга, а его активация (преимущественно в протоцеребруме) ускоряет динамику забывания на начальном этапе, а затем ее снижает.

5. Изменение экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless Drosophila melanogaster* замедляет забывание, не оказывая значимого влияния на изменение интенсивности флуоресценции LIMK1 в разных отделах мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из ключевых проблем при изучении заболеваний, сопровождающихся когнитивным дефицитом, является недостаточность методов ранней диагностики и превентивной нейропротекторной терапии. Нехватка фундаментальных знаний о механизмах патогенеза деменций на молекулярном и клеточном уровнях препятствует разработке эффективных методов диагностики и лечения заболевания на ранних стадиях. В связи со значительным ростом социально-значимых заболеваний в современном мире, а также отсутствием адекватных методик их лечения, крайне важны физиолого-генетические исследования, направленные на изучение распространения, этиологии, патогенеза, течения наследственных болезней, разработку системы диагностики, лечения, профилактики и реабилитации больных. Также имеет большое значение изучение предпосылок возникновения социально-значимых заболеваний, в частности, нейродегенеративных и геномных болезней.

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

Таким образом, проведенные исследования подчеркивают значимость дальнейшего изучения роли генов, вовлеченных в развитие когнитивных нарушений, в процессах памяти, а также открывают новые перспективы в разработке терапевтических подходов лечения когнитивных расстройств.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Медведева, А.В. Роль гипоксии в целостности генетического аппарата и формировании памяти у дрозофилы в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания / А.В. Медведева, Е.В. Токмачева, Е.А. Никитина, С.А. Васильева, **Е.С. Заломаева**, Е.В. Савватеева-Попова // Медицинский академический журнал. – 2020. – Т. 20. № 4. – С. 45–54.

2. Медведева, А.В. Роль LIMK1 дофаминовых и серотониновых нейронов в стабильности генома, обучении и памяти у дрозофилы при стрессорной реакции на ослабление геомагнитного поля / А.В. Медведева, А.В.

Реброва, **Е.С. Заломаева** и др. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58. №1. – С. 34-42.

3. Никитина, Е.А. Роль LIM-киназы 1 в процессах памяти / Е.А. Никитина, **Е.С. Заломаева**, А.В. Медведева и др. // Успехи физиологических наук. – 2023. – Т. 54. №4. – С. 36-56.

4. Zhuravlev A.V. LIM-kinase 1 effects on memory abilities and male courtship song in *Drosophila* depend on the neuronal type / A.V. Zhuravlev, **E.S. Zalomaeva**, E.S. Egozova et al. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 27. №3. – С. 250-263.

5. Zhuravlev, A.V. Overexpression of the *limk1* gene in *Drosophila melanogaster* can lead to suppression of courtship memory in males / A.V. Zhuravlev, O.V. Vetrovoy, **E.S. Zalomaeva** et al. // Biochemistry (Moscow). – 2024. – V. 89. № 3. – P.393-406.

Публикации в иных рецензируемых журналах:

1. **Заломаева, Е.С.** Обучение и забывание у *Drosophila melanogaster* при полиморфизме по гену *limk1* / Е.С. Заломаева, В.С. Фалина, А.В. Медведева и др. // Интегративная физиология. – 2021. – Т.2. №3. – С. 318-327.

2. **Заломаева, Е.С.** Влияние изменения экспрессии гена *limk1* в нервной системе на обучение и забывание у *Drosophila melanogaster* / Е.С. Заломаева, Е.С. Егозова, А.В. Медведева, А.В. и др. // Цитология. Т.64. №7. (Материалы VIII молодежной школы-конференции по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института цитологии РАН) – С. 703.