

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

На правах рукописи

ЗАЛОМАЕВА ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

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

1.5.5. Физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, доцент
Никитина Екатерина Александровна

Санкт-Петербург

2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Память: классификация, этапы, нарушения	12
1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> модельный объект для изучения процессов памяти .16	16
1.2.1. Подходы к исследованию памяти у дрозофилы	16
1.2.2. Структуры мозга дрозофилы, ответственные за процессы памяти	19
1.3. Нейроны, вовлечённые в процессы памяти.....	22
1.4. Строение и функции LIMK	30
1.5. Роль LIMK1 в нервной системе в норме и при заболеваниях	37
1.6. Роль LIMK1 в процессах памяти	46
1.7. Роль забывания в процессах памяти	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
2.1. Материал исследования.....	55
2.2. Методы исследования.....	56
2.2.1. Система скрещивания Gal4-UAS.....	56
2.2.2. Методика подавления ухаживания.....	59
2.2.3. Молекулярно-генетические методы.....	62
2.3. Статистическая обработка результатов	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	66
3.1. Оценка процессов обучения и забывания у самцов дрозофилы	66
3.1.1. Оценка процессов обучения и забывания у линий, проявляющих полиморфизм в гене <i>limk1</i>	66
3.1.2. Влияние теплового шока на процессы обучения и забывания у линий, проявляющих полиморфизм в гене <i>limk1</i>	70
3.1.3. Оценка процессов обучения и забывания у линий с изменением экспрессии гена <i>limk1</i>	75
3.2. Анализ экспрессии гена <i>limk1</i>	84

3.3. Анализ распределения LIMK1 в разных структурах мозга дрозофилы.....	86
3.4. Обсуждение результатов	98
ВЫВОДЫ	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	111
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ	115
ПРИЛОЖЕНИЕ I.....	141
ПРИЛОЖЕНИЕ II	143
ПРИЛОЖЕНИЕ III	153
ПРИЛОЖЕНИЕ IV	154

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

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 Ras1/кофилин. Ras1 фосфорилирует p21-активируемые киназы (РАК), которые способствуют фосфорилированию LIM-киназы 1 (LIMK1). LIMK1 является ключевым ферментом реорганизации актинового цитоскелета и кодируется геном *limk1* (Bamburg, 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 и задачи исследования

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 приобретенную информацию. Снижение способности к сохранению памяти говорит также о преобладании процессов забывания.

На основании проведенных исследований обосновывается положение о вовлеченности 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 школе-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 и 2 публикации в иных рецензируемых журналах.

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**, С.К. Тураева, Е.А. Никитина, Е.В. Токмачева, С.А. Васильева, Б.Ф. Щеголев, Е.В. Савватеева-Попова // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58. №1. – С. 34-42.

3. Никитина, Е.А. Роль LIM-киназы 1 в процессах памяти / Е.А. Никитина, **Е.С. Заломаева**, А.В. Медведева, А.В. Журавлёв, Е.В. Савватеева-Попова // 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, A.D. Emelin, V.V. Sokurova, E.A. Nikitina, E.V. Savvateeva-Popova // 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**, E.S. Egozova, E.A. Nikitina, E.V. Savvateeva-Popova // 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.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Память: классификация, этапы, нарушения

Одним из основных свойств нервной системы является способность живых существ к научению и запоминанию. Обучение и память можно определить как две стороны одного процесса. Под обучением обычно подразумевают механизм приобретения и фиксации информации, а под памятью – механизмы хранения и извлечения данной информации. Обучение непосредственно предшествует формированию памяти. Благодаря памяти человек может приобретать, сохранять и использовать индивидуальный опыт (Покровский и др., 1997).

Существуют разные классификации памяти. Можно выделить индивидуальную (сохраняющую опыт организма, накопленный в течение жизни) и наследственную, видовую память (сохраняющую опыт биологического вида, накопленный в процессе эволюции). Индивидуальную память также называют эпизодической или автобиографической. Можно также выделить механическую и логически осмысленную память. В зависимости от приложенных усилий выделяют произвольную память, проявляющуюся под действием силы воли, и непроизвольную, возникающую автоматически. В зависимости от длительности сохранения выделяют краткосрочную и долгосрочную память. С психологической точки зрения принято различать образную, словесно-логическую, двигательную и эмоциональную память. Как отдельный тип выделяют семантическую память, представляющую собой набор общих представлений и знаний о мире, его закономерностях и явлениях, а также процедурную память, ответственную за сохранение и автоматизацию моторных когнитивных и перцептивных навыков деятельности. Процедурная память делает возможным приобретение важных навыков таких, как письмо, чтение, езда на велосипеде, игра на музыкальных инструментах и т.д. (Вейн, 1973; Захаров, 2022; Kopelman, 2002; Matthews, 2015; Landin-Romero et al., 2016).

В зависимости от того, по какому каналу поступает информация (т.е. от модальности), различают слуховой, зрительный, моторный и смешанный типы памяти. Чаще всего у людей встречается смешанный тип памяти с некоторым преобладанием одного из этих типов. Кроме того, можно выделить память, связанную с непосредственным восприятием впечатлений, например, с осязанием, обонянием, вкусом. Однако такие типы памяти развиты в меньшей степени за редким исключением. Предполагается, что в основе данных типов памяти лежит степень развития соответствующих зон коры головного мозга (Вейн, 1973).

Снижение памяти является распространённой проблемой. Данный симптом наблюдается при широком спектре неврологических, психиатрических и соматических заболеваний и требует особого внимания. При этом нарушения затрагивают различные типы памяти и по-разному проявляются (Захаров, 2022).

При нарушениях краткосрочной памяти пациенты испытывают трудности в процессе оперативной умственной работы: теряют нить текущей деятельности, а также последовательность ее этапов, забывают запланированные дела. Подобные нарушения наиболее характерны для заболеваний с подкорковым типом когнитивных расстройств, таких как подкорковые нейродегенерации, лейкоэнцефалопатии, хроническая ишемия головного мозга. С нарушениями краткосрочного блока памяти связывают также так называемую неспецифическую забывчивость. Данный симптом сопровождает такие заболевания, как деменция с тельцами Леви, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, хроническая дисметаболическая энцефалопатия, хроническая ишемия мозга (Turner et al., 2002; Baddeley et al., 2012; Matthews, 2015).

Нарушения долгосрочной эпизодической памяти проявляются, например, повторением одного и того же вопроса без возможности запомнить ответ на него. Человек может многократно повторять одно и то же, не помнить свою деятельность в ближайшее время. Подобные нарушения являются самым ранним признаком классической формы болезни Альцгеймера и развиваются в случае локальных повреждений структур гиппокампального комплекса. Считается

также, что при гиппокампальных расстройствах памяти наблюдается нарушение консолидации памяти, то есть перевода информации из краткосрочной памяти в долгосрочную (Kopelman, 2002; Sarazin et al., 2008; Sarazin et al., 2010; Matthews, 2015).

Нарушение семантической памяти может проявляться в прогрессирующей утрате понимания значения существительных, часто в сочетании с нарушением узнавания предметов. Такие нарушения называются амнестической афазией зрительно-предметной агнозией и прозапагнозией и наблюдаются при так называемой семантической деменции – нейродегенеративном заболевании, вызываемым таупатией (болезнью, связанной с ненормальной агрегацией тау-белка. Также подобные нарушения могут наблюдаться на поздних стадиях болезни Альцгеймера (Захаров, 2022; Landin-Romero et al., 2016).

Нарушения процедурной памяти наблюдаются при локальных нарушениях связей между премоторной корой и подкорковыми базальными ганглиями (прежде всего полосатым телом), а также нарушениями мозжечка на развёрнутых стадиях деменции и выражаются в затруднениях выполнения тех или иных действий (Захаров, 2022; Kopelman, 2002).

В основе краткосрочной памяти лежит циркуляция нервных импульсов по нейронным сетям. Циркуляция длится в течение нескольких минут, храня информацию, после чего затухает. Формирование краткосрочной памяти не требует синтеза белка *de novo*, оно обусловлено временными ковалентными модификациями уже синтезированных в клетке белков. При этом происходит синтез цАМФ и активация ионных каналов, определяющих проводимость клеточной мембраны (Покровский и др., 1997; Каминская, Медведева, 2013).

Формирование среднесрочной памяти связано с цАМФ-опосредованной активацией протеинкиназы А, обеспечивающей закрытие K^+ каналов, приводящее к деполяризации мембраны и увеличения поступления ионов Ca^{2+} в клетку. Ионы Ca^{2+} играют важную роль в запуске высвобождения нейромедиатора в синаптическую щель посредством экзоцитоза (Каминская, Медведева, 2013).

Формирование долгосрочной памяти основано на синтезе белка *de novo*. Это связано с активацией транскрипционного фактора CREB (cAMP response element-binding protein), который инициирует транскрипцию генов раннего ответа (*c-fos*) и генов позднего ответа (*cpg15*, *BDNF*). Данные гены необходимы для структурных и функциональных изменений синапса и усиления долговременной связи между нейронами. При этом видоизменяются отростки нейронов: на дендритах возникают дополнительные шипики, а аксоны приобретают новые ветвления (Godenschwege et al., 2004).

Нарушения памяти являются одним из симптомов нейродегенеративных заболеваний, представляющих собой гетерогенную группу фатальных хронических заболеваний нервной системы, которые сопровождаются прогрессирующей гибелью нервных клеток мозга. Гибель нейронов может происходить под действием различных патогенетических факторов, таких как окислительный стресс, накопление токсических белковых агрегатов, внутриклеточный дисбаланс кальция, митохондриальная дисфункция и др. Также определенную роль в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний играет дисфункция возбудимых клеток периферических органов, которые относятся к сердечно-сосудистой или нервно-мышечной системе. Данные заболевания характеризуются высокой социально-экономической значимостью, определяемой высокими показателями заболеваемости, увеличением с годами случаев заболевания с ранним началом, а также значительным снижением социальной и бытовой активности, что отражается на качестве жизни пациентов и их родственников (Угрюмов, 2014; Никитина и др., 2021).

Одной из наиболее фундаментальных задач современной нейронауки является познание того, как мозг участвует в приобретении, хранении и воспроизведении различных форм памяти. Для углубления знаний о механизмах формирования и сохранения памяти, а также для исследования основ ее нарушений требуется привлечение животных моделей. Одним из наиболее адекватных модельных объектов является дрозофила.

1.2. *Drosophila melanogaster* модельный объект для изучения процессов памяти

1.2.1. Подходы к исследованию памяти у дрозофилы

Изучение процессов памяти требует привлечения различных животных моделей, таких как виноградные улитки, пчелы, крысы, шимпанзе и др. Среди их многообразия уникальным объектом является *Drosophila melanogaster*. Данный объект позволяет изучать процессы памяти (обучение и забывание) не только на поведенческом уровне, но и на молекулярно-генетическом. Возможность создания трансгенных линий *D. melanogaster* с изменённой экспрессией генов, вовлечённых в развитие нейродегенераций и нарушений памяти у человека, позволяет использовать данную модель для исследования влияния конкретного гена на развитие заболевания. Кроме того, удобство работы с дрозофилой связано с её коротким жизненным циклом, дешёвым содержанием в лабораторных условиях и отсутствием законодательных ограничений, связанных с работой с животными.

Существует несколько экспериментальных методов формирования памяти у дрозофилы, включая краткосрочную память и зависящую от синтеза белка долгосрочную память, такие как ольфакторное обучение, визуальное обучение в симуляторе полёта, методика подавления ухаживания (Журавлев и др., 2015).

Процесс формирования памяти можно условно подразделить на ряд периодов. Несмотря на то, что изначально классификация этапов формирования памяти у дрозофилы была основана на результатах, полученных при классическом павловском обучении, на современном этапе эта классификация приобрела универсальный характер вне зависимости от объекта и методических способов анализа обучения и памяти (Dubnai et al., 2003).

Первый этап представляет собой формирование немедленной памяти, фиксирующей новую информацию – обучение. Вторым этапом является формирование краткосрочной памяти, которая сохраняется в течение 3-7 минут после обучения. Третий этап определяет среднесрочная память, он длится от 30

минут до 3 часов. Четвертый этап представляет собой долгосрочную память, способную сохраняться более 3-6 часов. Таким образом, каждый из предшествующих этапов является необходимым условием формирования последующих. В то же время формирование краткосрочной и долгосрочной памяти может осуществляться параллельными путями (Tully et al., 1994; Redt-Clouet et al., 2012).

Наиболее широко используемым методом является классическое павловское обучение с отрицательным подкреплением электрошоком, или ольфакторное аверсивное обучение, которое позволило выявить гены, ответственные за различные типы памяти. В основе ольфакторного обучения лежит восприятие запахов. Формирование памяти при таком типе обучения связано с рядом генов, мутации которых могут вызвать снижение или полное исчезновение соответствующих типов памяти (Tully et al., 1994).

Ольфакторное обучение в классической павловской парадигме предполагает несколько тренировочных сессий, в каждую из которых входит:

- а) Условный стимул (запах А) в сочетании с негативным безусловным стимулом (12 импульсов электрического тока). Длительность – 1 минута.
- б) Запах Б без сочетания с безусловным стимулом. Длительность – 1 минута.

От количества тренировочных сессий и наличия между ними промежутков зависит характер формирующейся памяти (Dubnai et al., 2003; McGuire et al., 2005; Журавлев и др., 2015).

Наиболее физиологичным подходом к изучению памяти для дрозофилы является подавление ухаживания. В основе данного метода лежит ухаживание не имеющего опыта полового поведения (наивного) самца за оплодотворённой самкой. Ухаживание у самца регулируется преимущественно ольфакторной и вкусовой сенсорными системами, а инициируется неконтактным образом: визуальными и ольфакторными стимулами. При этом самец выполняет ряд действий: ориентируется по отношению к самке, касается её передними лапками

(происходит вкусовое восприятие кутикулярных феромонов), отводит крыло и производит «брачную песню», дотрагивается до гениталий самок и лижет их (получает дополнительную информацию о феромонах). Поведение самки, а также состав феромонов на кутикуле после спаривания отличается от таковых у девственной самки. Оплодотворенная самка отвергает ухаживания самца, а на её кутикуле присутствует специфический для самцов феромон cVA (цис-вакценилацетат). После неудачного опыта, полученного при ухаживании за оплодотворённой самкой, самец значительно снижает последующее ухаживание за другими самками. При этом память, вырабатываемая методом подавления ухаживания, представлена теми же основными формами, что и при ольфакторном обучении (краткосрочной, среднесрочной и долгосрочной). В обоих случаях разные формы памяти могут формироваться параллельно и независимо друг от друга. Однако преимущество методики подавления ухаживания в том, что она физиологична и естественна, в отличие от метода обучения с негативным подкреплением электрошоком (Siegel, Hall, et al., 1979; Kamyshev et al., 1999; Griffith et al., 2009; Keleman et al., 2012; Журавлёв и др., 2015).

Визуальное обучение в симуляторе полёта относится к ассоциативному обучению. При данном методе обучения муху за торакс прикрепляют к специальному симулятору, который изменяет положение визуального поля в зависимости от движений мухи. Безусловным стимулом является тепловое воздействие, которого муха учится избегать. Безусловный стимул можно также дополнять различными визуальными стимулами определённой формы. Память измеряют как способность избегать стимулы, которые связаны с высокой температурой и подразделяют на три фазы: краткосрочную (чувствительную к анестезии) – 20 минут, устойчивую к анестезии – от 20 минут до 3 часов и зависимую от синтеза белка – более 3 часов (Журавлёв и др., 2015; Siwicki et al., 2003).

Дрозофиле свойственно формирование новых условных рефлексов, их перестройка или даже угасание в ответ на новые условные стимулы. При

многokратном длительном предъявлении условных стимулов, не подкреплённых безусловными, начинается процесс реактивации памяти с её последующей реконсолидацией или исчезновением в зависимости от количества предъявлений условного стимула (Lagasse et al., 2009).

1.2.2. Структуры мозга дрозофилы, ответственные за процессы памяти

Молекулярные механизмы основных форм обучения едины для млекопитающих и высокоразвитых беспозвоночных. Нервная система дрозофилы состоит из сложно устроенного мозга, брюшной нервной цепочки и периферических нервов. Головной мозг дрозофилы представляет собой достаточно высокоорганизованную структуру, обеспечивающую реализацию сложных форм поведенческой активности (Журавлев и др., 2015; Hirth, 2010). Наиболее значимыми структурами, ответственными за обучение и память, являются грибовидные тела и центральный комплекс. Причём грибовидные тела необходимы главным образом для реализации ассоциативного ольфакторного обучения, а центральный комплекс для пространственной ориентации, ухаживания, зрительного и моторного обучения. Центральный комплекс также играет важную роль в поддержании мотивации, в обеспечении координации между направлением и скоростью движений и смещением цели, в стабилизации пейсмейкеров песни ухаживания, а также в быстром переключении от одной поведенческой программы к другой в зависимости от изменения внешних условий (Попов и др., 2004; Журавлев и др., 2015).

В системе нервных центров дрозофилы, которые регулируют процессы ольфакторного обучения и памяти, выделяют ряд морфофункциональных составляющих (Рисунок 1.1). Каждая составляющая соответствует определённому уровню обработки информации.

В антеннах и максиллярных щупиках находятся сгруппированные в кластеры ольфакторные рецепторы, которые посылают отростки в специфические гломерулы антеннальных долей.

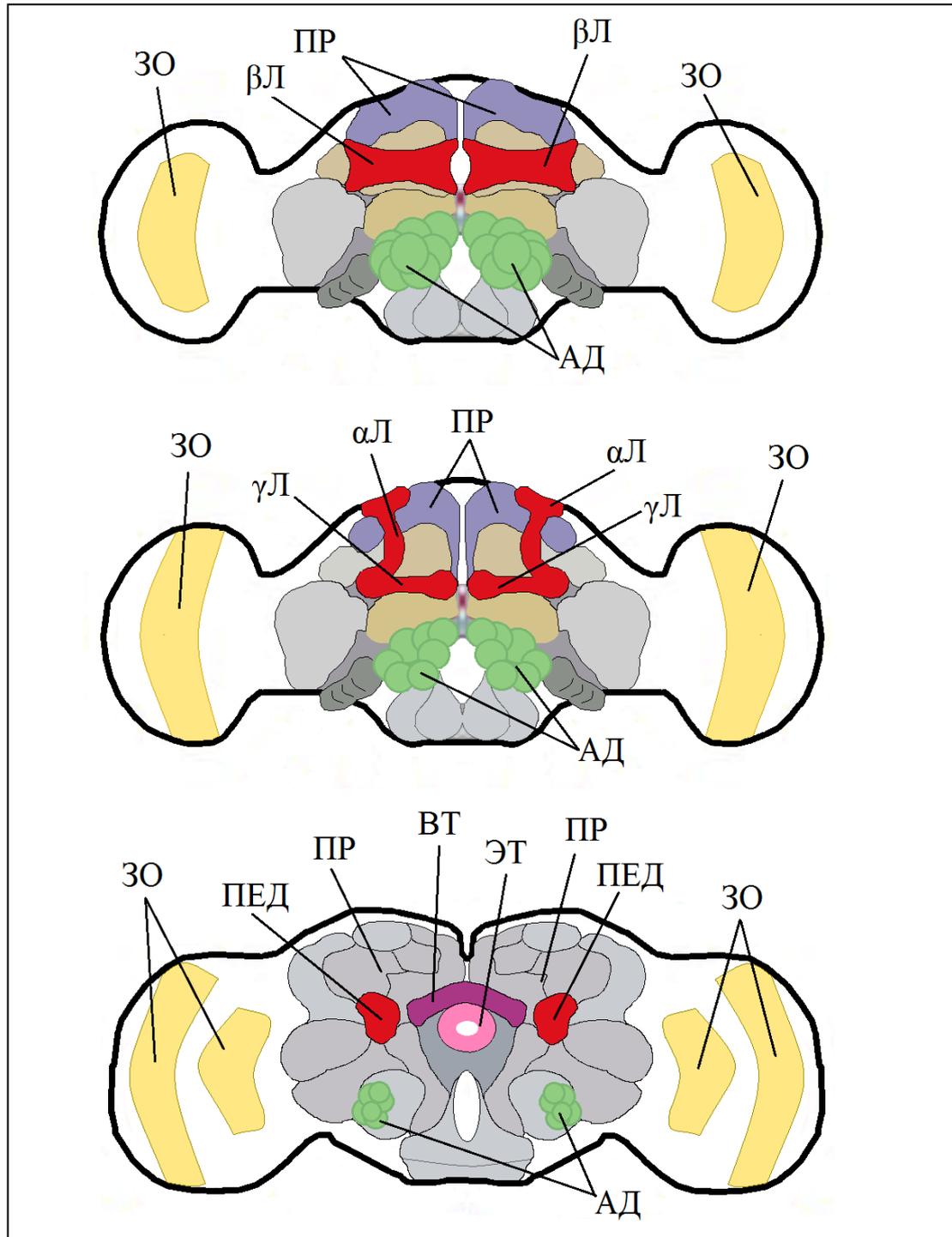


Рисунок 1.1. Схема морфологических структур мозга *D. melanogaster*. АД – антеннальные доли, ZO – зрительная область, ПР – протоцеребрум, αЛ – α лопасти грибовидных тел, βЛ – β лопасти грибовидных тел, γЛ – γ лопасти грибовидных тел, ПЕД – педункулюсы, ВТ – веерообразное тело центрального комплекса, ЭТ – эллипсоидное тело центрального комплекса.

В антеннальных долях отростки ольфакторных рецепторов взаимодействуют с проекционными нейронами и вызывают в них паттерны осциллирующей активности в ответ на специфическое воздействие.

Аксоны проекционных нейронов следуют далее в составе трёх антенноцеребральных трактов: по внутреннему тракту – в каликсы грибовидных тел – в латеральный протоцеребрум – в боковой рог, по среднему и латеральному тракту – в боковой рог. При этом дорсальные отростки внутреннего антенноцеребрального тракта формируют синапсы с дендритами клеток Кеньона, окружающих каликсы. Каждый подтип клеток Кеньона интегрирует входы от проекционных нейронов различных гломерул.

Аксоны клеток Кеньона идут через волокнистый тракт в составе педункулюса и формируют α, α' , β , β' и γ лопасти грибовидных тел. Лопасти грибовидных тел взаимодействуют с дофаминергическими и серотонинергическими нейронами, ответственными за позитивное и негативное подкрепление. Нервные клетки, иннервируемые терминалями клеток Кеньона в лопастях грибовидных тел, проецируются в высшие центры латерального и медиального протоцеребрума. Также протоцеребрум получает прямую иннервацию от антеннальных долей (Журавлёв и др., 2015; Siwicki et al., 2003; McGuire et al., 2005; Perisse et al., 2013).

Процессы обучения и памяти у *D. melanogaster* связаны с функциональной активностью определённых отделов ЦНС. Так, при формировании ольфакторной краткосрочной памяти в областях грибовидных тел регистрируют усиление Ca^{2+} -ответа, при условии наличия в них рецепторов, связанных с G-белками. А в передних парных латеральных нейронах, иннервирующих грибовидные тела, Ca^{2+} -ответ, напротив, уменьшается. Формирование краткосрочной памяти при подавлении ухаживания сопровождается увеличением активности СаМКII (Са²⁺-калмодулинзависимая протеинкиназа II) в грибовидных телах (в основном в лопастях), подглоточном ганглие, латеральном протоцеребруме и центральном комплексе (в эллипсовидном теле и вееровидном теле). Ингибирование СаМКII в антеннальных долях снижает интенсивность ухаживания, не влияя на память и хемосенсорную чувствительность. Формирование ольфакторной среднесрочной памяти требует активности дорсальных парных медиальных нейронов,

иннервирующих грибовидные тела. Данные нейроны реагируют изменением уровня внутриклеточного Ca^{2+} как на условный, так и на безусловный стимул, однако ответ на условный стимул наблюдают лишь в ветвях отростков, иннервирующие α и α' лопасти грибовидных тел. Для формирования ольфакторной долгосрочной памяти необходимы α и α' лопасти грибовидных тел. При этом на разных этапах формирования памяти вовлекаются разные типы нейронов грибовидных тел (Joiner, Griffith, 1999; Pascual, Preat, 2001; Yu et al., 2005; Wang et al., 2008; Liu, Davis, 2009).

Таким образом, основной структурой, ответственной за обучение и память, у дрозофилы являются грибовидные тела – двусторонние структуры мозга, состоящие из примерно 2500 нейронов. Выделяют нейроны, для которых показана высокая степень вовлечённости в процессы обучения и памяти (Chen et al., 2023).

1.3. Нейроны, вовлечённые в процессы памяти

Для обеспечения жизнедеятельности мозг человека содержит около 86 миллиардов нейронов (Herculano-Houzel, 2009). Мозг дрозофилы устроен значительно скромнее: он содержит около 140 тысяч нейронов. Этого количества достаточно для того, чтобы муха могла осуществлять все основные процессы жизнедеятельности, а также реализовывать процессы памяти. В 2024 году международная группа учёных представила полный коннектом взрослой самки *Drosophila melanogaster*. Схема содержит 139255 нейронов. Работа позволила определить в мозге мухи системы, отвечающие за определённые функции: восприятие слуховой информации (брачной песни), принятие решения о том, подходит ли ей брачный партнёр, восприятие и обработка визуальных стимулов (свет, цвет), распознавание движений, навигация, осуществление и прекращение движений, а также сон и консолидация памяти (Dorkenwald et al., 2024).

В реализацию процессов памяти вовлечены многие нейроны, прежде всего дофаминергические, серотонинергические и холинергические.

Исследования нейронной архитектуры грибовидных тел показали, что выходные нейроны являются их основными эффекторами, тогда как специфические кластеры дофаминергических нейронов регулируют активность синаптических контактов грибовидных тел (Aso et al., 2009, 2014a, 2014b). Кроме того, было показано, что клетки Кеньона – основные нейроны грибовидных тел насекомых – управляются примерно 50 классами холинергических нейронов, а ацетилхолин является основным нейротрансмиттером, высвобождаемым клетками Кеньона (Barnstedt et al., 2016).

Считается, что дофамин обеспечивает обучение у множества различных видов, включая вызывающее ольфакторное аверсивное обучение и подавление ухаживания. Многие аспекты поведения самцов дрозофилы во время ухаживания связаны с набором нейронов, которые экспрессируют ген *fruitless (fru)*. Среди них ольфакторные нейроны *Or67d* и нейроны γ лопастей грибовидных тел, которые участвуют в обучении ухаживанию. Исследование Keleman продемонстрировало необходимость дофаминергических нейронов для формирования памяти, к тому же данные нейроны были *fru*⁺. Кроме того, решающее значение в реализации ухаживания имеет синаптическая передача сигнала дофаминергических нейронов класса *aSP13* протоцеребрального переднемедиального кластера, которые иннервируют γ лопасти грибовидных тел. Также было показано, что как в формировании ольфакторной памяти, так и в ее активном стирании у дрозофилы задействованы дофаминергические нейроны грибовидных тел, в частности нейроны *PPL1*. При этом отдельные кластеры нейронов способствуют сохранению памяти, а другие участвуют в ее стирании. По-видимому, это определяется различными типами дофаминовых рецепторов, представленных на поверхности нервных клеток (Keleman et al., 2012; Shuai et al., 2015; Berry et al., 2018).

У человека дофаминергические нейроны локализованы в гипоталамусе, черной субстанции среднего мозга, полосатом теле, вентральной области покрышки среднего мозга, в префронтальной коре головного мозга, и также

играют важную роль в реализации когнитивных процессов, в том числе памяти, внимания и мышления (Циркин и др., 2010).

В дополнение к дофамину, серотонин играет решающую роль в аверсивных воспоминаниях дрозофилы. Серотонин необходим для запоминания места с негативным подкреплением при высокой температуре. Серотонин может иметь решающее значение для ассоциативного обучения насекомых (Sitaraman et al., 2008). Также показано, что серотонин и специфические серотониновые рецепторы необходимы для правильной работы ольфакторной аверсивной памяти (Johnson et al., 2011; Lee et al., 2011). Таким образом, современные данные свидетельствуют о том, что, по крайней мере, для формирования аверсивной ольфакторной памяти у дрозофилы требуется действие как дофамина, так и серотонина (Sitaraman et al., 2012). Серотонинергические нейроны проецируются на большинство областей мозга дрозофилы (Wao et al., 2010).

У человека серотонинергические нейроны играют критическую роль в памяти и когнитивных функциях, а также индуцируют развитие болезни Альцгеймера при недостаточной передаче сигналов в этих нейронах (Schmitt et al., 2006; Vertes et al., 1999; Vostanciklioğlu, 2020). Серотонинергические нейроны человека находятся в основном в дорсальном и срединном ядрах шва и посылают ответвления к большей части головного мозга, включая ствол, таламус, кору и гиппокамп. Серотонин также регулирует ацетилхолин, который участвует в различных аспектах когнитивных функций, включая обучение и память (Ogren et al., 2008; Lee et al., 2011).

Ацетилхолин играет важную роль в функционировании памяти и связан с возрастной деменцией, при которой сильно проявляется нарушение зависящего от гиппокампа обучения (Naam, Yakel, 2017). Холинергические нейроны обнаруживаются по всему мозгу, в частности, в стволе, базальных отделах переднего мозга и полосатом теле и играют важную роль в обучении, памяти и когнитивных процессах (Frahmm et al., 2015; Chen et al., 2022). Холинергические нейроны плотно иннервируют гиппокамп, опосредуя формирование как

эпизодической, так и семантической памяти. Замечено, что у пациентов с деменцией, включая болезнь Альцгеймера, часто проявляется нарушение холинергической системы. Ряд исследований показал атрофию холинергической системы в базальных отделах переднего мозга у пациентов с ранней болезнью Альцгеймера и у лиц с высоким риском развития данного заболевания (Grothe et al., 2010; Grothe et al., 2012; Grothe et al., 2014; Teipel et al., 2014). При этом отмечено не только уменьшение количества холинергических нейронов, но и снижение уровня холинацетилтрансферазы. Холинергическая дисфункция значительно влияет на гиппокамп и его функции – участие в механизмах консолидации памяти и пространственной памяти (Berger-Sweeney et al. 2001; von Linstow Roloff et al. 2007; Naam, Yakel, 2017).

Влияние ацетилхолина на память не всегда является стимулирующим, а зависит от стадии формирования памяти. Формирование памяти состоит из двух этапов: кодирования памяти и консолидации (Hasselmo, 1999). Во время кодирования памяти кора посылает сенсорные входные данные в гиппокамп, тогда как краткосрочная память преобразуется в долгосрочную во время консолидации. (Hasselmo, 1999; Chrobak et al., 2000; Witter et al., 2000). Процессы кодирования и консолидации памяти могут мешать друг другу и поэтому разделены во времени (Hasselmo, 1999; Rasch, Born, 2013; Stickgold, Walker, 2013). Предполагается, что ацетилхолин является важным нейромодулятором, который переключается между двумя режимами формирования памяти. Было высказано предположение, что ацетилхолин способствует кодированию памяти, подавляя при этом процесс консолидации (Hasselmo, 1999). Во время кодирования памяти наблюдается повышение уровня ацетилхолина в гиппокампе, а во время консолидации памяти снижение (Hasselmo, Mc Gaughy, 2004; Naam, Yakel, 2017).

В нервной системе дрозофилы ацетилхолин также играет роль важного химического передатчика. Ацетилхолин является основным нейромедиатором, используемым в сенсорных нейронах, проецирующихся в ЦНС, а также является первичным возбуждающим нейромедиатором и нейромодулятором в ЦНС

(Malloy et al., 2019). Синтез ацетилхолина является неотъемлемой частью развития дрозофилы, поскольку нулевые мутации в генах, кодирующих ферменты ацетилтрансферазу и ацетилхолинэстеразу, участвующие в метаболизме ацетилхолина, приводят к эмбриональной летальности (Buchner, 1991). Также известно, что ацетилхолин играет роль в модуляции нейронных цепей, управляющих передвижением личинок (Song et al., 2007). Холинергические нейроны у дрозофилы обнаружены в структурах, для которых показана вовлечённость в процессы памяти – грибовидных телах (Yasuyama et al., 2002). Некоторые холинергические выходные нейроны грибовидных тел, по-видимому, регулируют зрительную ассоциативную память дрозофилы (Aso et al., 2014b). Кроме того, продемонстрирована роль ацетилхолина в модуляции врождённого иммунного ответа дрозофилы. Подавление синтеза ацетилхолина или его везикулярного транспорта в нейронах снижало активацию гена, кодирующего антимикробный пептид дрозомин у взрослых мух, инфицированных грамположительной бактерией (Giordani 2023). Таким образом, ацетилхолин не только обеспечивает связь в нейрональных синапсах и нервно-мышечных соединениях, действуя как нейромедиатор, но также способен участвовать в модуляции различных физиологических процессов, включая иммунитет.

Формирование обонятельной памяти опосредуется главным образом обонятельной нервной системой (Davis, 2004; Davis, 2005). Дрозофила получает обонятельную информацию через нейроны обонятельных рецепторов, расположенные в усиках и верхнечелюстных щупиках, и передает эту информацию в антеннальные доли по антенному нерву. В них, а также в проекционных нейронах информация о запахе дополнительно обрабатывается локальными интернейронами, а затем передается к дендритам нейронов грибовидных тел и в область мозга, известную как боковой рог. Другие внешние нейроны грибовидных тел включают группы древовидных нейронов V2 и V3 и дорсальные переднелатеральные нейроны (Рисунок 1.2).

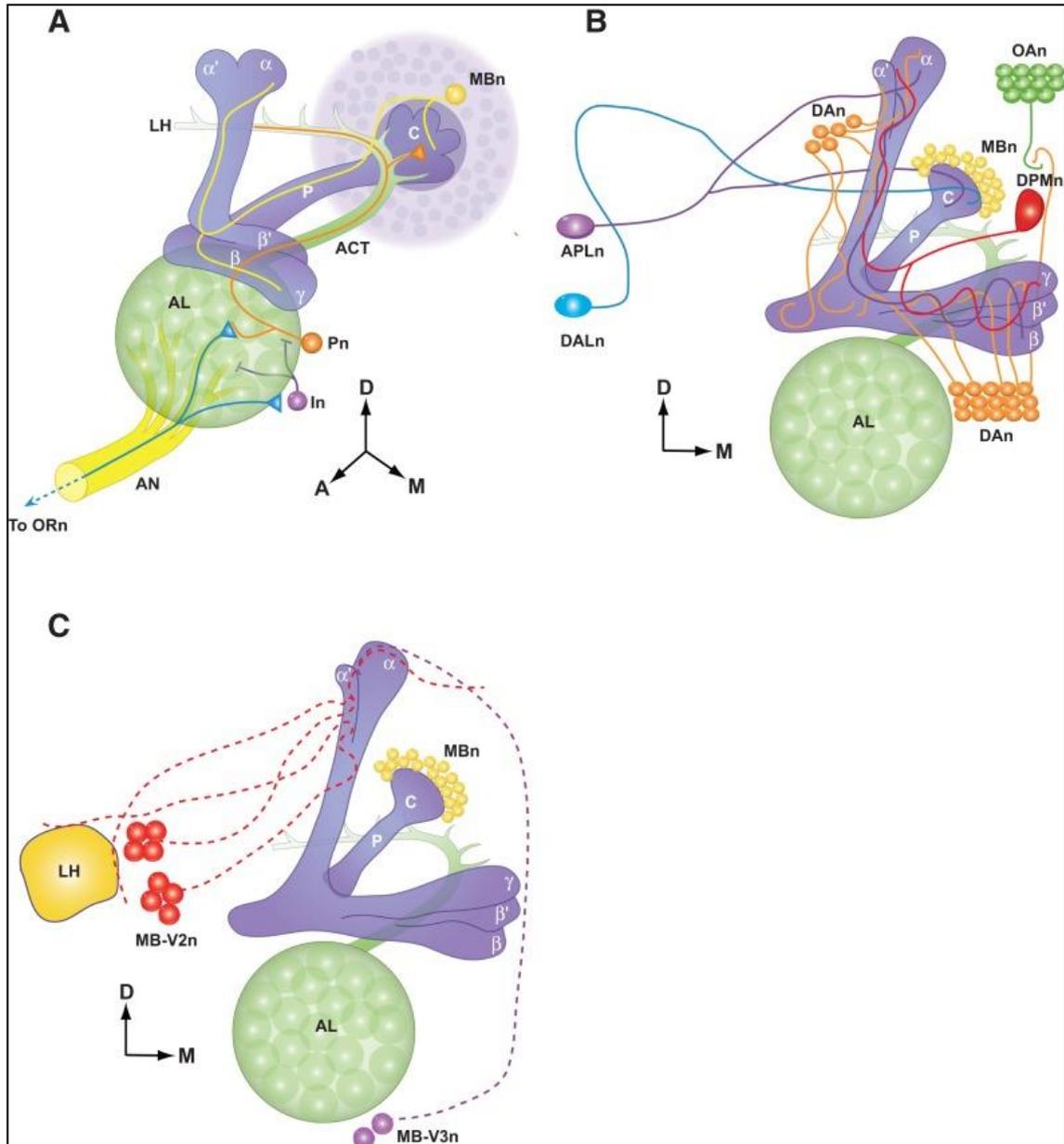


Рисунок 1.2. Обонятельная нервная система дрозофилы. D – дорсальная перспектива, A – передняя перспектива, M – медиальная перспектива. ORn – нейроны обонятельных рецепторов, AL – антеннальные доли, AN – антенный нерв, Pn – проекционные нейроны, In – интернейроны, MBn – нейроны грибовидных тел, C – чашечка грибовидного тела, P – ножка грибовидного тела, α , α' , β , β' , γ – доли грибовидных тел, LH – боковой рог, APLn – передний парный латеральный нейрон, DPMn - дорсальный парный медиальный нейрон, DAn - дофаминергические нейроны, DALn - дорсальные переднелатеральные нейроны, OAn - октопаминаергические нейроны, MB-V2n - древовидный нейрон вентральной доли грибовидного тела 2, MB-V3 - древовидный нейрон вентральной доли грибовидного тела 3. (Güven-Ozkan, Davis, 2014)

Дэвисом в 1993 году впервые была представлена модель того, как нейромодулирующие нейроны, такие как дофаминергические и серотонинергические, могут передавать сигнал безусловного стимула (Davis, 1993). Последующие исследования привели к созданию модели, согласно которой путь безусловного стимула для формирования аверсивной памяти опосредуется рецепторами к дофамину, связанными с G-белком и экспрессируемыми грибовидными телами, а путь безусловного стимула для формирования вкусовой памяти опосредован как связанными с G-белком рецепторами октопамина, так и дофамина, экспрессируемыми грибовидными телами. (Schwaerzel et al., 2003; Kim et al., 2007, 2013). Интеграция совпадений условного и безусловного стимулов в нейронах грибовидных тел происходит, по крайней мере частично, благодаря активности аденилатциклазы (Tomchik, Davis, 2009). Существует несколько типов нейронов грибовидных тел, и информация, представленная ими, дополнительно модифицируется передними парными латеральными нейронами, дорсальными парными медиальными нейронами и подмножествами дофаминергических нейронов. Модель нейронной цепи для интеграции условного и безусловного стимулов в грибовидных телах представлена на рисунке 1.3. Ольфакторная информация (условный стимул) передается на дендриты нейронов грибовидных тел, где она интегрируется с информацией о негативных или позитивных подкреплениях. Информация об условном стимуле модифицируется путем одновременной активации связанного с G-белком октопаминового рецептора из октопаминергических входов в дендриты нейронов грибовидных тел для обучения. Увеличение цАМФ, происходящее за счет стимуляции аденилатциклазы, модифицирует обработку информации об условном стимуле в дендритах нейронов грибовидных тел. Информация, представляющая аверсивный безусловный стимул, модифицируется в нейронах грибовидных тел за счет активации дофаминергических рецепторов на аксонах нейронов грибовидных тел. Входящие сигналы дофаминергических нейронов изменяют информацию об условном стимуле, поступающую одновременно в нейроны грибовидных тел

через активацию аденилатциклазы. Повышенный уровень цАМФ и активация протеинкиназы А модулируют синаптическую продукцию нейронов грибовидных тел в нижележащие двигательные цепи. (Güven-Ozkan, Davis, 2014)

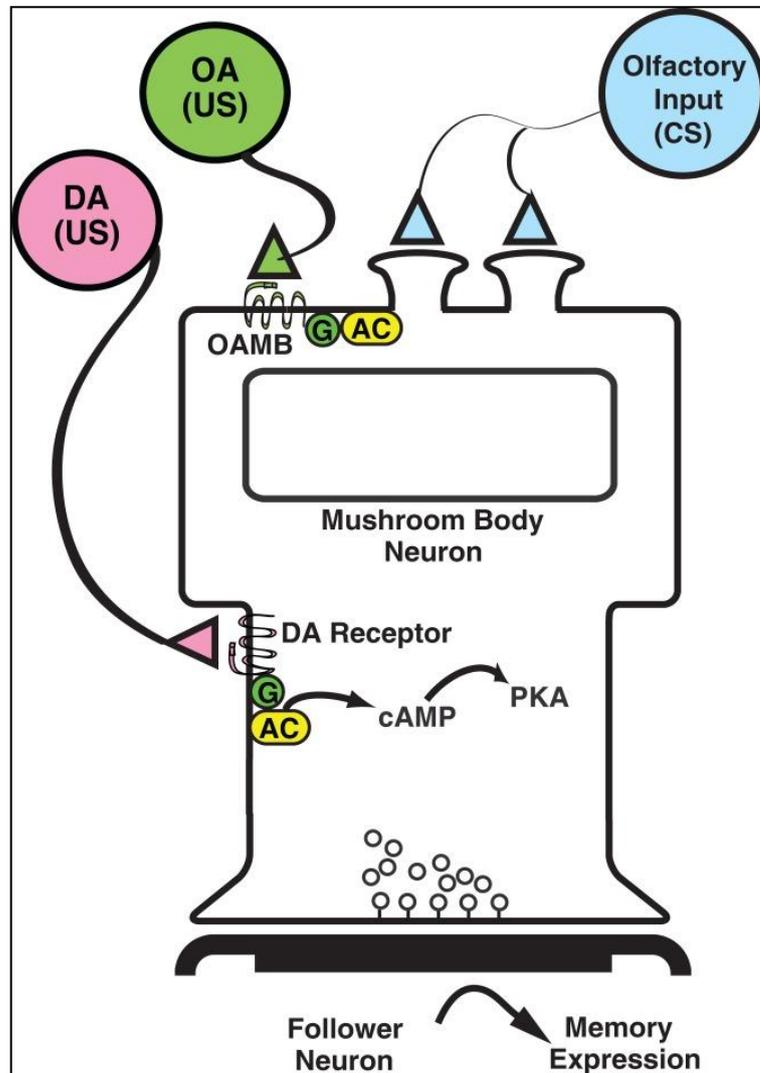


Рисунок 1.3. Нейронная цепь интеграции условного и безусловного стимулов в нейронах грибовидных тел. DA – дофамин, OA – октопамин, US – безусловный стимул, CS – условный стимул, DA Receptor – рецепторы дофамина, OAMB – рецепторы октопамина, G – G-белок, AC – аденилатциклаза. (Güven-Ozkan, Davis, 2014)

Кроме того, вовлечение в процессы памяти у дрозофилы показано для немногочисленного класса нейронов – *fruitless*. Их насчитывается около 1,5 тысяч в головном мозге дрозофилы, и они отвечают за поведение самцов во время ухаживания. Около 300 нейронов γ лопастей грибовидных тел и aSP13 дофаминергических нейронов, расположенные в верхнем медиальном

протоцеребруме, которые регулируют ухаживание и память, относятся к Fru-положительным. (Yu et al., 2010; Liu, et al., 2019). Кроме того, подмножество серотонинергического кластера нейронов *fruitless* совместно экспрессирует фермент, синтезирующий дофамин.

Вовлечение различных типов нейронов в реализацию процессов памяти обусловлено в том числе передачей сигнала через рецепторы, опосредованной малыми ГТФазами. Ключевым ферментом зависимых от малых ГТФаз Ras и Rho сигнальных каскадов ремоделирования актина является LIMK1.

1.4. Строение и функции LIMK1

LIMK1 была открыта в 1994 году одновременно группами Мидзуно (Mizuno et al., 1994) и Бернарда (Bernard et al., 1994) и описана как первая киназа, содержащая LIM домены. LIM – аббревиатура от продуктов генов, где эти домены были впервые обнаружены: Lin-11, Isl-1 и Mec-3. Семейство LIM киназ было расширено на год позже с открытием LIM киназы 2 (LIMK2), которая имеет на 51% сходную последовательность с LIMK1 (Villalonga et al., 2023). LIMK1 и LIMK2 являются киназами с двойственной специфичностью к серин/треонину и тирозину (Manetti, 2011). LIMK1 и LIMK2 кодируются отдельными генами, расположенными у человека на хромосомах 7q11.23 и 22q12.2, соответственно (Okano et al., 1995).

Ген *limk1* высококонсервативен и обнаружен в геноме различных организмов, таких как *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Anopheles gambia*, *Gallusgallus Xenopuslaevis* и многих других (Scott, Olson, 2007; Stanyon, Bernard, 1999). Ген *limk1* человека состоит из 39593 п.н. и включает 17 экзонов. В геноме *D. melanogaster* ген *limk1* (CG1848) локализован в X-хромосоме в районе 11В. Посредством биоинформационного анализа последовательности нуклеотидов гена *limk1* дрозофилы был выявлен 71% гомологии с геном *limk1* человека. Протяженность гена *limk1* дрозофилы составляет 7808 п. н., он включает в себя семь экзонов. Ген *limk1* дрозофилы

расположен в локусе *agnostic*, который обрамлен А/Т-богатыми областями, насыщенными палиндромными последовательностями и короткими нуклеотидными повторами (Медведева и др., 2008). Вышеуказанные структурные особенности обеспечивают данному локусу возможность как для спонтанных перестроек, так и для инсерции мобильных элементов, в том числе и в разных природных популяциях (Edelmann et al., 2001).

Экспрессия LIMK выявлена во всех тканях как в процессе эмбриогенеза, так и у взрослых организмов, но преимущественно регистрируется в нервных тканях (Acevedo et al., 2006; Каминская, Медведева, 2013). LIMK2 сосредоточена в районе эндосом, отсутствует в глии и семенниках (Acevedo et al., 2006). Нейроспецифический фермент LIMK1 аккумулируется в области синапсов (Foletta et al., 2004). Также LIMK1 обнаружена в эпителиально-мезенхимальных клетках млекопитающих, в мезенхимальных клетках, окружающих периферические нервы, в области дорзальной сетчатки, в клетках сердца, легкого и почек (Lindström et al., 2010). Также были богаты LIMK1 конусы роста аксонов и дендритов и перинуклеарные области пирамидных нейронов гиппокампа (Foletta et al., 2004). У *D. melanogaster* LIMK1 преимущественно выявляется в нодулях и эллипсоидном теле центрального комплекса и в зрительных долях головного мозга (Савватеева-Попова и др., 2004).

LIMK1 является нерецепторной серин-треониновой протеинкиназой, ключевым ферментом ремоделирования актина. В состав белка LIMK1 входят два N-концевых LIM-домена, каждый из которых содержит два мотива цинковых пальцев; PDZ-домен (PDZ – аббревиатура от названий трех белков: PSD-95, DLG, ZO-1) и C-концевой киназный домен, способный фосфорилировать серин и треонин, а также тирозин из-за необычного строения (мотив DLNSHN) субдомена VIB каталитического сайта (Okano et al., 1995). Пролин/серин богатый район отделяет домен PDZ от C-концевого киназного домена (Stanyon, Bernard, 1999). Структура LIMK1 человека представлена на рисунке 1.4.

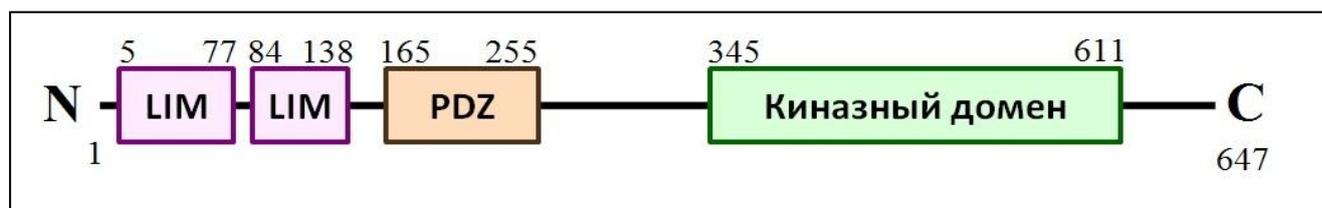


Рисунок 1.4. Схематическая структура LIMK1 человека

На первый взгляд, длинный неструктурированный линкер между PDZ и C-концевым киназным доменом (около 70 остатков) указывает на то, что N- и C-концы физически не взаимодействуют. Однако есть сообщения, демонстрирующие это взаимодействие (Hiraoka et al., 1996). LIM-домены часто встречаются в виде тандемов (Alvarez-Castelao, Schuman, 2015) и обеспечивают белок-белковые взаимодействия (Nagata et al. 1999). Кроме того, они способны связываться с C-концевым киназным доменом, негативно регулируя киназную активность (Edwards, Gill, 1999; Nagata et al., 1999; Prunier et al., 2017). PDZ-домен также участвует в белок-белковых взаимодействиях и содержит два обогащенных лейцином мотива ядерного экспорта (nuclearexport signals, NES), необходимые для ядерно-цитоплазматического транспорта, при их мутационном повреждении происходит накопление LIMK1 в ядре (Gorovoy et al., 2005). Известно, что домены PDZ объединяют комплексы динамической передачи сигналов, как описано для PICK1 и PSD-95 (Erlendsson et al., 2019; Rademacher et al., 2019). Белки, содержащие PDZ-домен, являются ключевыми молекулами в организации постсинаптической области в нейромышечных контактах (Rivlin et al., 2004). C-концевой киназный домен содержит мотив ядерной локализации – NLS (nuclear localization signal), последовательность для перемещения из цитоплазмы в ядро (Yang and Mizuno, 1999). За счет этого LIMK1 быстро меняет свою локализацию в ответ на стрессорные воздействия. Следует отметить, что актин также имеет два NES-мотива и способен перемещаться из ядра в цитоплазму. Обратное движение осуществляется за счет объединения актина с кофилином, у которого имеется NLS-мотив (Wada et al., 1998). После этого свободный актин перемещается за счет NES-сигнала в цитоплазму.

LIMK1 в клетке представлена несколькими изоформами. У человека известно 4 изоформы - полноразмерный белок (647 аминокислот, а.к.) и короткие изоформы (613 и 633 а.к.), у которых уменьшен первый N-концевой LIM домен; а также редкая нефункциональная изоформа длиной 305 а.к. У дрозофилы известно 5 изоформ – А (1240 а.к.), С (1257 а.к.), D (1052 а.к.), E (1235 а.к.), F (1043 а.к.). Наиболее значимыми являются С и D изоформы, различающиеся по функциональной активности (Рисунок 1.5). С-изоформа представляет собой полноразмерный белок, а D-изоформа несколько укорочена (отсутствуют LIM и PDZ-домены) и обладает более высокой киназной активностью, поскольку LIM-домены ингибируют киназный домен (Nagata et al., 1999).

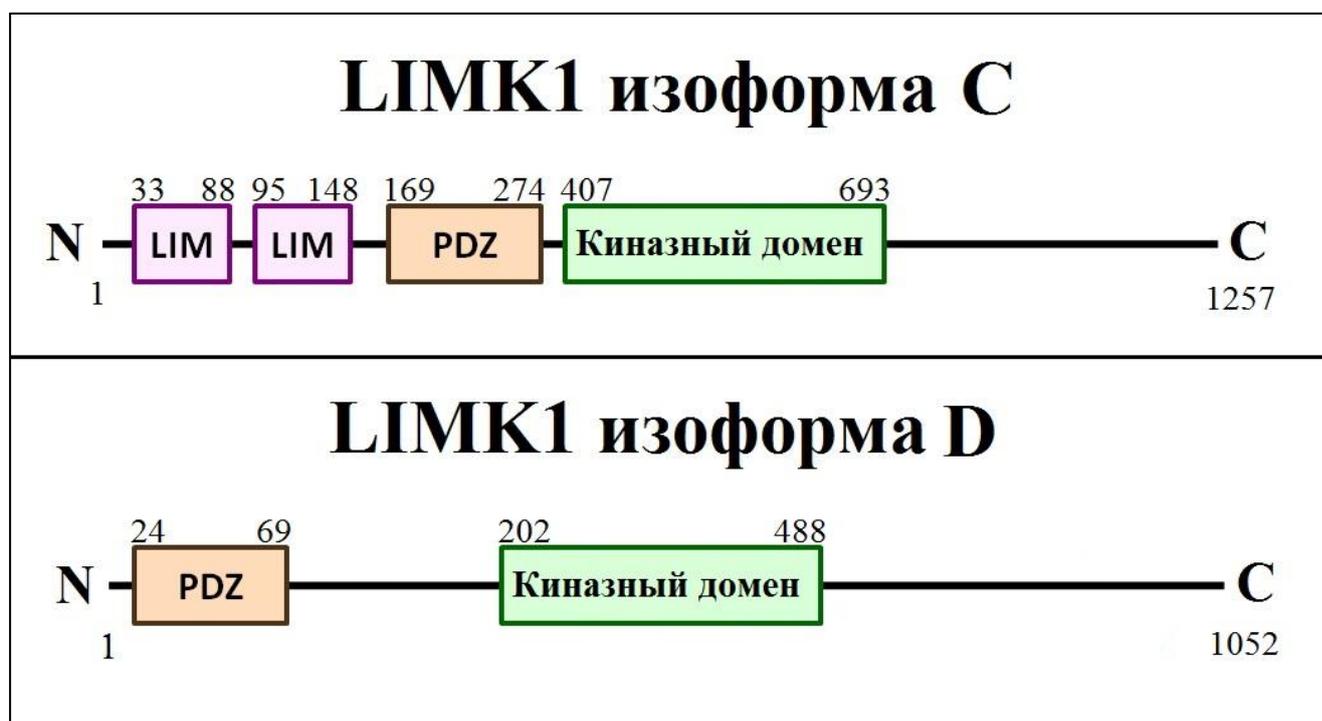


Рисунок 1.5. Схематическая структура С и D изоформ LIMK1 *Drosophila melanogaster*

Наиболее широко характеризруемыми субстратами LIMK1 являются три формы кофилинов: кофилин 1 (немышечный кофилин), кофилин 2 (мышечный кофилин) и дестрин (актин-деполимеризирующий фактор). Каждый из трех белков может иметь различные биохимические свойства, влияющие на регуляцию динамики актина в определенных типах клеток, однако их часто обобщенно называют кофилином. Основной функцией белков данного семейства является

регуляция структуры актинового цитоскелета клетки, а также сборки и разборки актиновых филаментов (Ковалева и др., 2019). Также в качестве субстратов LIMK1 можно выделить ядерные транскрипционные факторы CREB (cAMP response element-binding protein) и Nurr1 (Nuclear receptor related-1 protein) (Scott and Olson, 2007). Кроме того, был описан тримерный комплекс между LIMK1 и Orb2 и Tob, вовлеченных в формирование долгосрочной памяти. Orb2 дрозофилы связывает РНК и регулирует трансляцию, Tob индуцирует олигомеризацию Orb2. Недавно показано, что LIMK1 фосфорилирует Tob, затем ассоциируется с ним для фосфорилирования Orb2, приводя к его стабилизации и олигомеризации. Описываемая олигомеризация Orb2 играет важную роль в долгосрочной памяти (Wang et al., 2018; Kozlov et al., 2023).

LIMK1 играет центральную роль в регуляции цитоскелета актина путем фосфорилирования кофилина по серину-3, ослабляя его актин-связывающую, расщепляющую и деполимеризующую активность. Поскольку ремоделирование цитоскелета играет жизненно важную роль в жизни клетки, LIMK1 вовлечена в реализацию многих физиологических процессов, включая миграцию клеток, клеточный цикл, апоптоз и дифференциацию нейронов (Mizuno, 2013; Wang and Townes-Anderson, 2016).

Ремоделирование актинового цитоскелета тесно связано с динамикой микротрубочек, которые не только определяют внутриклеточную локализацию органелл и их перемещение в цитоплазме в процессе функционирования, но и являются компонентами сигнальной трансдукции (Gundersen and Cook, 1999). Микротрубочки представляют собой цилиндрические полимеры, построенные из гетеродимеров α - и β -тубулина. Эти тубулиновые полимеры стохастически переключаются между полимеризацией и деполимеризацией. Динамика микротрубочек необходима для успешного завершения всех этапов развития нейронов. (Cuberos et al., 2015) Агенты, разрушающие микротрубочки, стимулируют быструю сборку актиновых филаментов и фокальную адгезию. Именно LIMK1 координирует разборку микротрубочек и полимеризацию

актиновых филаментов, влияет на динамику микротрубочек в интерфазных клетках и организацию митотического веретена (Prunier et al., 2017). Ингибирование активности LIMK1 во время митоза вызывает активацию кофилина и приводит к задержке перехода от метафазы к анафазе и неправильному расположению веретена (Mao et al., 2019). LIMK1 связывается с тубулином посредством PDZ домена (Gorovoy et al., 2005). Динамика микротрубочек регулируется двумя группами белков: стабилизирующие (microtubule-associated proteins MAPs, tau) и дестабилизирующие (stathmin, SCG10 (superior cervical ganglia 10)). Кроме прямого участия LIMK1 в реорганизации микротрубочек, возможно и опосредованное действие через фосфорилирование этих белков. LIMK1 опосредует стрессорную реакцию клетки, что выражается в появлении стресс-фибрилл, деассоциации микротрубочек и изменении морфологии клетки (Gromov and Celis, 1991).

LIMK1 является частью сигнального каскада: рецепторы - малые ГТФазы – актиновый цитоскелет (Рисунок 1.6). Данный каскад характерен для организмов разного филогенетического уровня. Семейство малых ГТФаз состоит из двух подсемейств: Rac и Rho. Переходя из активного (ГТФ-связанного) в неактивное (ГДФ-связанное) состояние, малые ГТФазы Rac подсемейства контролируют широкий спектр клеточных процессов, включая пролиферацию и дифференцировку клеток, поэтому их мутационные нарушения способствуют онкогенезу. Члены Rho подсемейства посредством переключения неактивного (ГДФ-связанное) в активное (ГТФ-связанное) состояние регулируют структуру актинового цитоскелета, транскрипцию генов и пролиферацию. Подобно многим другим киназам, фосфорилирование в районе петли активации киназного домена LIMK1 приводит к ее активации. Этот процесс начинается с активации NMDAR и AMPAR при участии малых ГТФаз Rho подсемейства (ROCK1 и ROCK2) и Rac подсемейства (p21 activated kinases, PAK1, PAK2 и PAK4), а также MRCK α (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase α) посредством прямого

фосфорилирования Thr508 (Edwards and Gill, 1999; Maekawa et al., 1999; Dan et al., 2001; Sumi et al., 2001; Misra et al., 2005).

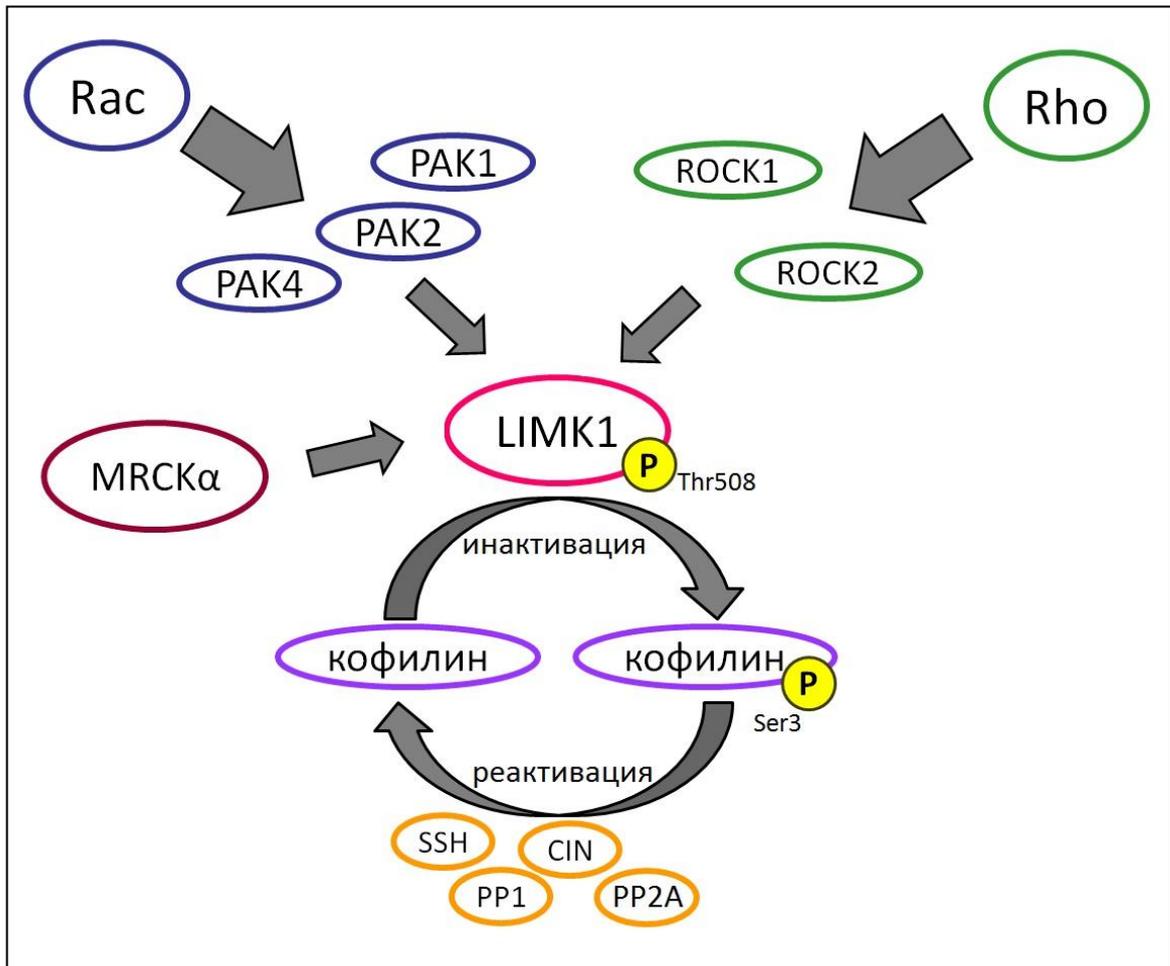


Рисунок 1.6. Сигнальный каскад рецепторы - малые ГТФазы – актиновый цитоскелет

У млекопитающих ход клеточного цикла управляется формированием, активацией и инактивацией серии циклин-циклин-зависимых киназ (cyclin-cyclin-dependent kinase, cyclin-Cdk). Активность cyclin-Cdk, в свою очередь, регулируется позитивно или негативно с помощью фосфорилирования. При позитивной регуляции cyclin-Cdk управляет продвижением клеточного цикла, в то время как ингибиторные белки осуществляют задержку клеточного цикла, присоединяясь к cyclin-Cdk комплексу. Ингибитор p57Kip2 подсоединяется к N-концу LIMK1 с двумя LIM-доменами. Таким образом, p57Kip2 осуществляет одновременный контроль протекания клеточного цикла и локализации LIMK1, то есть сопрягает прохождение клеткой клеточного цикла с динамикой актинового цитоскелета (Yokoo et al., 2003).

Миграция клеток необходима для многочисленных физиологических процессов, таких как эмбриогенез, развитие нейронов, иммунный ответ и регенерация. Характеристика LIMK1 как киназы, фосфорилирующей кофилин, указывает на ее роль в осуществлении миграции клеток (Yang et al., 1998). Участие LIMK1 в реорганизации микротрубочек является еще одним способом ее вовлечения в миграцию клеток (Gorovoy et al., 2005). Поскольку регуляция клеточной миграции нарушена при раке, сбой таковой регуляции, опосредованной LIMK1, может приводить к онкогенезу (You et al., 2015). Действительно, многие ингибиторы активности LIMK1 изменяют процессы миграции клеток (Berabez et al., 2022).

LIMK1 принимает участие в регуляции внутриклеточного транспорта белков к аппарату Гольджи, стимулируя реорганизацию актиновых филаментов. Это показано для развивающихся нейронов (Rosso et al., 2004) и клеток почки (Salvarezza et al., 2009).

Идентификация факторов транскрипции CREB и Nurr1 в качестве субстратов LIMK1 позволяет предположить участие LIMK1 в регуляции транскрипции. В случае CREB, который регулирует экспрессию цАМФ-зависимых генов, активация LIMK1 фактором роста фибробластов в клетках-предшественниках гиппокампа приводила к увеличению фосфорилирования CREB и CREB-опосредованной промоторной активности (Yang et al., 2004). Анализ Nurr1-связывающихся белков из CSM14.1 мезенцефалических нейронов выявил фосфорилирование Nurr1 LIMK1, что приводило к снижению транскрипционной активности (Sacchetti et al., 2006).

1.5. Роль LIMK1 в нервной системе в норме и при заболеваниях

Функционирование нервной системы тесно связано с передачей сигнала через рецепторы нервных клеток, сигнальная функция которых также связана с малыми ГТФазами, являющимися G-белками метаботропных рецепторов (Tantama et al., 2012). В синаптической фракции мозга ГТФаза Rho A

ассоциируется с глутаматными рецепторами в плазматической мембране шипиков дендритов. Активация ионотропных рецепторов, в частности NMDAR, стимулирует транслокацию Rho A на метаботропные глутаматные рецепторы, что влияет на форму шипиков дендритов, а, следовательно, на синаптическую эффективность и процессы формирования памяти (Schubert et al., 2006). С активностью глутаматных рецепторов, в частности NMDAR, связаны не только Rho A ГТФаза, но и другие представители Rho семейства. Активация Rac1 и Cdc42 способствует полимеризации актина, увеличению сложности ветвления дендритов, стимулирует формирование шипиков. Активность Rho ГТФаз модифицируется факторами обмена гуаниновых нуклеотидов и белков, активирующих ГТФазы, изменяющих активность Rho мишени (Shi et al., 2009).

LIMK1 играет важную роль в обеспечении такого важного свойства нервной системы, как пластичность – способность к адекватным перестройкам функциональной организации мозга в ответ на значимые изменения внешних и внутренних факторов. Высокую степень пластичности нервной системы обеспечивает реорганизация актинового цитоскелета (Ковалева и др., 2019). Цитоскелет нейронов представлен преимущественно актиновыми филаментами и микротрубочками. При этом важно учитывать, что актин может находиться либо в мономерной (G-актин), либо полимеризованной (F-актин) форме. F-актиновые филаменты, составляющие основу актинового цитоскелета, могут объединяться вместе или образовывать разветвленную сеть, включающую также многочисленные вспомогательные белки, контролирующие ее динамику и механику. Динамическое равновесие G-актин / F-актин крайне важно для обеспечения подвижности конусов роста, разрастания нейритов и наведения аксонов. В зрелых нейронах актин способствует формированию синапсов (Cuberos et al., 2015).

Ключевым регулятором динамики актина является кофилин. При низких концентрациях кофилин способствует разборке F-актина путем увеличения диссоциации до мономерного G-актина. F-актин осуществляет контроль над

изменением морфологии шипиков. Инактивация кофилина способствует снижению обучения и вызывает тяжелые поведенческие аномалии. LIMK1 способствует инаktivации кофилина при долговременной потенциации. Следовательно, дефект синтеза LIMK1 увеличивает активность кофилина, изменяет морфологию и плотность шипиков, нарушая синаптическую пластичность (Ковалева и др., 2019; Vorovac et al., 2018). Избыточная экспрессия конститутивно неактивной формы кофилина в культурах клеток гиппокампа приводит к образованию более зрелых шипиков и их повышенной плотности, тогда как сверхэкспрессия конститутивно активной формы кофилина индуцирует образование незрелых шипиков (Shi et al., 2009). Недавние исследования показали, что снижение уровня LIMK1, кофилина-1, фосфокофилина и β -актина в мозге, а также образование актин-кофилиновых палочек коррелируют с уменьшением ветвления дендритов, значительной потерей дендритных шипиков, нарушением их морфологии в корковых нейронах головного мозга мышей с церебральной малярией (Simhadri et al., 2017).

Велика роль динамики актинового цитоскелета в функционировании рецепторов. Факторы роста нейрегулины напрямую взаимодействуют с LIMK1 и стимулируют ErbB (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog) рецепторы, влияя на активность NMDAR через ремоделирование актинового цитоскелета (Gu et al., 2005). F-актин является существенным компонентом цитоскелета в постсинаптической плотности (postsynaptic density, PSD) глутаматергического синапса. Показана связь PSD-95 с актиновыми фибриллами цитоскелета (Blanpied et al., 2008). Постсинаптическая плотность играет не только структурную, но и регуляторную функцию, облегчая кластеризацию и интернализацию рецепторов. Так как ErbB и NMDA рецепторы колокализуются в PSD, то ремоделирование актинового цитоскелета, активированное одним из рецепторов, сказывается на работе другого. Таким образом, целостность актинового цитоскелета обеспечивает функционирование NMDAR (Gu et al., 2005). В свою очередь, активация NMDAR и AMPAR, стимулируя ток кальция в клетку, также приводит

к деполимеризации F-актина, опосредованной протеинкиназой C (PKC) (Cristofanilli and Akopian, 2006).

Синаптическое перемещение рецепторов AMPA (AMPA) имеет решающее значение как для долгосрочной потенциации (long-term potentiation, LTP), так и для долгосрочной депрессии (long-term depression, LTD), т.е. усиления либо ослабления синаптической передачи между нейронами, рассматриваемых как клеточные механизмы памяти (Malinow, Malenka, 2002). Было обнаружено, что кофилин опосредует динамику актина в постсинаптическом транспорте AMPAR после индукции LTP (Gu et al., 2010). Более того, подвижность AMPAR требует активности кофилина во время угасания памяти, фосфорилирование кофилина вызывает его нарушение (Wang et al., 2013). Следовательно, оптимальная активность кофилина важна для опосредования структурных и функциональных изменений синаптической пластичности.

Формирование нейритов, незрелых отростков, возникающих из тела нейронной клетки, является уникальным и важным этапом нейрогенеза. Развитие и функции мозга в значительной степени зависят от образования нейритов, для чего требуется множество сигналов роста, рецепторных стимулов и сложное взаимодействие между внутриклеточными и внеклеточными сигналами (Nampe et al., 2021).

У развивающихся мышей, нокаутированных по *limk1*, наблюдаются нарушения пролиферации и миграции нейронов, а также апоптоза, что говорит о вовлеченности LIMK1 в эти процессы и ее важной роли в эмбриональном развитии мозга (Мао et al., 2019). LIMK1 также важна для Nogo-A сигнального пути. Nogo-A является ингибитором роста аксонов в ЦНС взрослых после травм и регулирует прогрессирующее ограничение пластичности во время развития. В ЦНС взрослого организма Nogo-A в основном обнаруживается в олигодендроцитах и миелине, но также присутствует в нейронах гиппокампа и обонятельной системы. Nogo-66, ингибиторный фрагмент Nogo-A, вовлечен в регуляцию кофилина в конусе роста и аксонах нейронов за счет быстрой

активации LIMK1, приводящей к ингибированию кофилина (Cuberos et al., 2015). Показано, что расширение нейритов нейронов гиппокампа усиливается экспрессией LIMK1 и подавляется блокадой активации LIMK1 (Lee-Hoeflich et al., 2004; Rosso et al., 2004; Yang et al., 2004). Эти наблюдения указывают на то, что LIMK1 стимулирует удлинение нейритов посредством фосфорилирования кофилина. Напротив, сверхэкспрессия LIMK1 в куриных DRG-нейронах подавляет подвижность и растяжение конусов роста (Endo et al., 2003). Это позволяет предположить, что LIMK1 может действовать как негативный регулятор роста нейритов, ингибируя активность ADF/кофилина (Endo et al., 2007).

Одно из самых ранних исследований, выявляющих участие LIMK1 в регуляции шипиков дендритов, было проведено Менгом с коллегами в 2002 г. У взрослых нокаутированных по гену *limk1* мышей наблюдаются нарушения морфологии шипиков дендритов в пирамидных нейронах гиппокампа – они длиннее и тоньше. В норме соотношение диаметра головки к шейному отделу шипиков дендритов больше двух, а у нокаутированных по гену *limk1* мышей - от 1 до 2. Уровень фосфокофилина у таких мышей выше. В соответствии с этим, несмотря на одинаковую плотность синапсов, постсинаптическое уплотнение у нокаутированных мышей редуцировано, что приводит к изменению структуры нейронов и ЛТР. На уровне поведения эти нарушения приводят к увеличению подвижности особей и редукции пространственного обучения, нокаутированных по гену *limk1* мышей (Meng et al., 2002). Недавние исследования с использованием нокадауна коротких РНК показали, что LIMK1, а именно пальмитирование LIMK1 по цистеину 7/8, играет важную роль в ремоделировании актина и образовании шипиков. Кроме того, хроническое снижение уровня LIMK1 приводило к элиминации шипиков и снижению их плотности приблизительно на 40% (George et al., 2015). Аналогичные изменения шипиков наблюдаются у мышей, нокаутированных по PAK1/3, вовлеченным в регуляцию LIMK1 (Huang 2011). Кроме того, у PAK2 гетерозиготных мышей

выявлено снижение плотности шипиков на 30%, сопровождающееся падением уровня LIMK1 и нарушением полимеризации актина в коре и гиппокампе (Wang et al., 2018). Эти данные свидетельствуют о том, что малые ГТФазы РАК вовлечены в регуляцию дендритных шипиков через LIMK1-зависимые механизмы. Другой активатор LIMK1, ROCK2, также может регулировать дендритные шипики через LIMK1 и кофилин. Мыши, нокаутированные по гену ROCK2, демонстрировали пониженную синаптическую плотность (на 30%), увеличенную длину шипиков (на 40%), связанные с нарушением ремоделирования актина и снижением фосфорилирования кофилина (Zhou et al., 2009). РАК/ROCK-LIMK1-кофилин сигнальный путь может представлять собой ключевой механизм регулирования дендритных шипиков.

Помимо постсинаптической, LIMK1 также участвует и в пресинаптической регуляции. Мыши, нокаутированные по гену *limk1*, продемонстрировали усиление синаптической депрессии в ответ на интенсивную нейрональную активность и увеличение частоты миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (mEPSC) (Meng et al., 2002). В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что дефекты ROCK2 и РАК также влияли на экзоцитоз синаптических везикул (Meng et al., 2005; Asrar et al., 2009; Huang et al., 2011).

Ремоделирование актина с формированием шипиков дендритов является характерной чертой начальных этапов пластичности LTP на уровне созревания синапсов и их ремоделирования (Yang et al., 2004; Cingolani and Goda, 2008). Таким образом, LIMK1 является ключевой молекулой в обеспечении взаимосвязи актинового и тубулинового цитоскелета в клетке и оказывается на перекрестке многих регуляторных путей (Gorovoy et al., 2005). LIMK1 играет роль в долгосрочной потенциации (LTP) и долгосрочной депрессии (LTD). А эти формы синаптической пластичности являются ключевыми механизмами обучения и памяти (Bliss, Collingridge, 1993; Kandel et al., 2014).

Основой обучения и памяти служит синаптическая пластичность нервной системы. Для поддержания пластичности необходима реорганизация актинового

цитоскелета. Как было сказано ранее, LIMK 1 играет ключевую роль в регуляции актинового цитоскелета, и, следовательно, обеспечении пластичности нервной системы, посредством фосфорилирования и инактивации кофилина.

Учитывая важнейшую роль LIMK1 в обеспечении функционирования нервной системы, логично предположить ее вовлеченность в развитие неврологических патологий. Известно, что LIMK1 играет существенную роль в расстройствах нервного развития, возникающих из-за аномалий, проявляющихся в процессе развития центральной нервной системы. В некоторых случаях эти синдромы вызваны генетическими аномалиями, ведущими к синтезу нефункционального или дисфункционального белка. LIMK1 вовлечена в развитие таких заболеваний нервной системы, как несиндромальная умственная отсталость и синдром Уильямса – Борейна.

Несиндромальная умственная отсталость определяется нарушением когнитивных способностей, влияющим на адаптивное функционирование в тех областях, которые определяют способность управлять повседневными задачами. Эти симптомы должны появиться в период развития. Умственная отсталость классифицируется как несиндромальная, когда интеллектуальный уровень является единственным клиническим проявлением, или как синдромальная, когда она связана с другими аномалиями, такими как дисморфические особенности или метаболические дефекты. Как известно, LIMK1 участвует в росте нейритов и морфогенезе шипиков дендритов. LIMK1 содержит дополнительный концевой домен, ингибирующий фосфатазу 1 (PP1i). Секвенирование домена PP1i показало редкую миссенс-мутацию p.S668P, связанную с развитием заболевания. Также было показано, что LIMK1 ингибирует рост нейритов, а мутация p.S668P отменяет этот эффект (Cuberos et al., 2015; Tastet et al., 2019).

Синдром Уильямса-Борейна, или, как чаще его называют, синдром Уильямса, сочетает в себе множество различных проявлений: нарушения развития, разные сердечно-сосудистые патологии, гиперактивность, нарушения моторной координации, эльфоидные черты лица и когнитивные особенности, в

частности дефект зрительно-пространственного ориентирования, повышенную общительность и музыкальную одаренность. К возникновению синдрома приводит делеция протяженностью 1500 т.п.н. в районе 7q11.23, специфическая архитектура которого предрасполагает к неравной рекомбинации. В делецию попадает около 20 генов, и ген, кодирующий LIMK1 - один из них. Гемизиготность по гену *limk1* вызывает когнитивные нарушения.

Для большого количества НДЗ (а также при прионных болезнях) было показано участие таких факторов «актинового каскада», как актин и кофилин, при образовании цитоплазматических включений (с редким представительством в ядре) (Minamide et al., 2000). Гранулы комплекса актин-кофилин, главным образом, встречаются среди пациентов с заболеваниями Альцгеймера, Хаттингтона и Паркинсона (Bamburg et al., 2010; Munsie, Truant, 2012) но также сопутствуют и другим заболеваниям, сопровождающимся нейродегенерацией, включая болезнь Пика (Singhrao, 2013), болезнь Крейтсфельдт-Якоба (Martinez-Saez et al., 2012), болезнь куру (Field et al., 1969), скрэпи (Field et al., 1972), а также хронический алкоголизм (Laas and Nagel, 1994), диабет (Sima and Hinton, 1983), рак (Fu et al., 1975) и мышечную атрофию (Fisher et al., 1972).

Особая роль LIMK1 отводится при болезни Альцгеймера. Болезнь Альцгеймера является прогрессирующим нейродегенеративным расстройством и наиболее распространенной формой деменции, на долю которой приходится 65% всех случаев деменции. Два патологических признака характерны для мозга при болезни Альцгеймера, а именно накопление старческих бляшек, состоящих из амилоидного β -пептида ($A\beta$) и нейрофибриллярных клубков/нейропильных нитей, состоящих из гиперфосфорилированного Тау-белка. $A\beta$ - это пептид, полученный из предшественника амилоидного- β белка ($A\beta PP$) путем двух последовательных протеолитических расщеплений BACE1 (β -секретаза) и пресенилинового комплекса (γ -секретаза). Нейрофибриллярные клубки и нейропильные нити представляют собой внутриклеточные включения, главным образом состоящие из ассоциированного с микротрубочками Тау-белка в гиперфосфорилированной

форме, которые ультраструктурно идентифицируются как парные спиральные нити (Kang, Woo, 2019).

Накопление олигомеров $A\beta$ воздействует на различные поверхностные рецепторы, влияя на несколько сигнальных каскадов, включая активацию НАДФН-оксидазы. НАДФН-опосредованная генерация активных форм кислорода способствует окислению белка 14-3-3, тем самым высвобождая и активируя Sling shot protein phosphatase 1 (SSH1). Каркасный белок RanBP9 (Ran9) стабилизирует и способствует SSH1-опосредованному дефосфорилированию и активации кофилина. Чрезмерная активация кофилина может затем привести к нескольким последствиям (Kang, Woo, 2019) (Рисунок 1.7):

1. Образованию кофилин-актиновых пучков, потенциально препятствующих аксональному транспорту и приводящих к синаптической дисфункции.
2. Формированию митохондриальной дисфункции в результате перемещения кофилина в митохондрии и взаимодействия с p53 и Drp1 белками.
3. Повреждению синапсов за счёт потери дребрина (постсинаптического актин-стабилизирующего белка) и PSD95 в результате разборки кофилином F-актина и увеличения его динамики.
4. Дестабилизации микротрубочек в результате вытеснения тау-белка из них активированным кофилином с помощью MARK-опосредованного фосфорилирования тау-белка по Ser262 (MARK – киназа, регулирующая сродство с микротрубочками).
5. Развитию таупатии за счёт гиперфосфорилирования вытесненного из микротрубочек тау-белка кофилином.
6. В то же время $A\beta$ способен воздействовать на поверхностные рецепторы, либо активируя, либо ингибируя передачу сигналов Ras-Рак, тем самым усиливая или ограничивая LIMK1-опосредованную инактивацию / фосфорилирование кофилина, соответственно. Ингибирование LIMK1 приводит к SSH1-опосредованной активации кофилина, тогда как чрезмерная активация LIMK1 способствует инактивации кофилина, что может привести к недостаточной

динамике актина и синаптической ригидности. Баланс между р-кофилином и кофилином кажется решающим для динамики актина и для регулирования многих процессов, особенно нейронных функций (Kang, Woo, 2019).

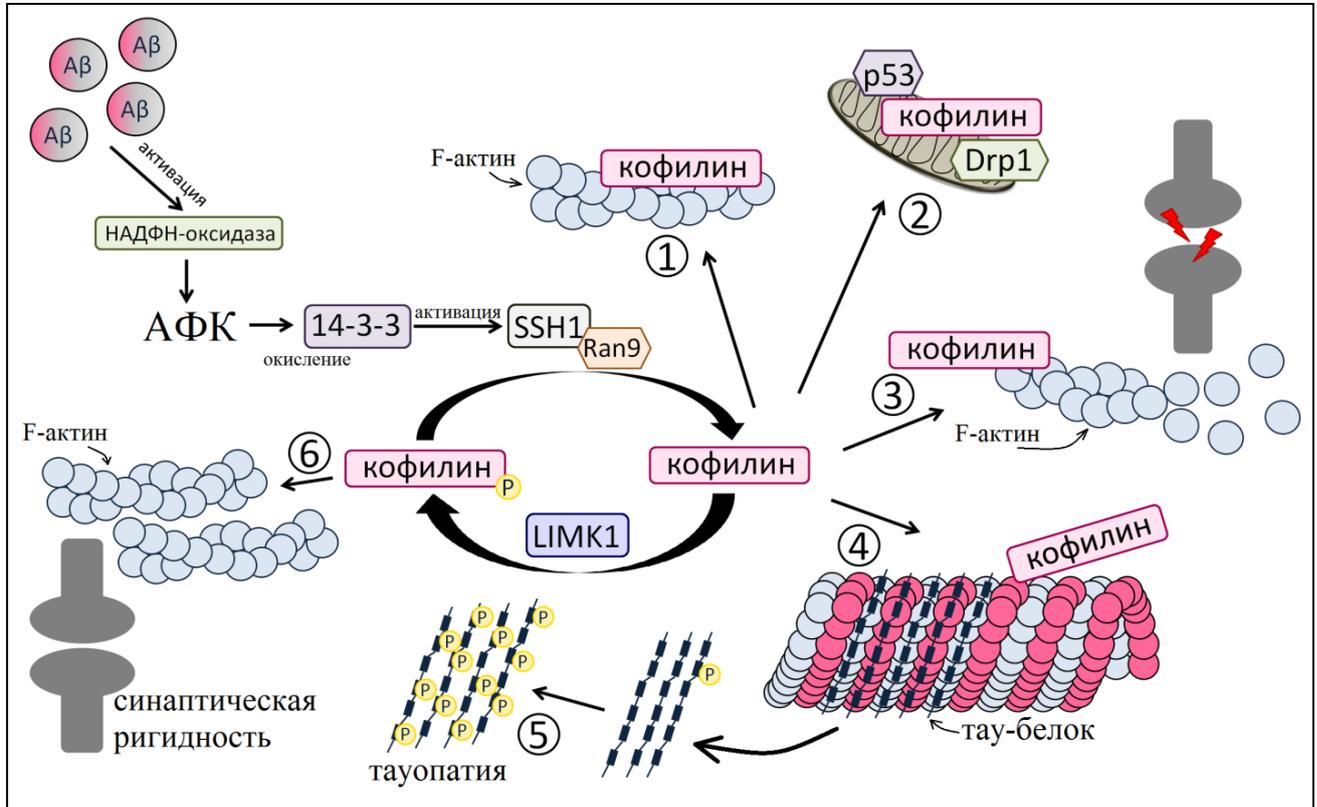


Рисунок 1.7. Активация и инактивация кофилина при болезни Альцгеймера.

Участие LIMK1 в этиопатогенезе заболеваний, характеризующихся прогрессирующей потерей памяти, предопределяет необходимость изучения механизмов ее вовлеченности в реализацию процессов памяти.

1.6. Роль LIMK1 в процессах памяти

С момента первоначального постулата Сантьяго Рамона-и-Кахаля более 100 лет назад считается, что память сохраняется за счет устойчивых изменений связей между нейронами (Konorski, 1948; Hebb, 1949; Dudai, 1989; Bliss and Collingridge, 1993; Kandel, 2001;). Подход Хебба, связывавший в единой модели краткосрочную память, основанную на реверберации в нейронных ансамблях, с долгосрочной памятью, основанной на синаптической пластичности в нейронах тех же ансамблей, оказался особенно востребованным (Берлов, Никитина, 2021).

Тем не менее период полураспада белков, ответственных за такие изменения, относительно короткий (Alvarez-Castelao, 2015). Следовательно, считается, что эти модификации синаптической эффективности вызваны долгосрочными функциональными и структурными изменениями, влекущими за собой как образование синапсов *de novo*, так и их созревание (Bosch and Hayashi, 2012). Предполагается, что такая пластичность опирается на дендритные шипики.

LIMK1, по-видимому, играет двойственную роль в регуляции LTP: 1) регуляция ранней фазы LTP посредством AMPAR и увеличения плотности шипиков, обусловленного реорганизацией актина; 2) регуляция поздней фазы LTP посредством синтеза белка *de novo* по CREB-зависимым механизмам (Ben Zablah et al., 2021). Примечательно, что эффект актин-деполимеризующих лекарственных средств, таких как цитохалазин-D, усиливавших раннюю фазу LTP у мышей дикого типа, был ослаблен у нокаутированных по гену LIMK1 мышей (Meng et al., 2002). В 2015 г. Тодоровский с соавторами показали (Todorovski et al., 2015), что у нокаутированных по гену LIMK1 мышей резко нарушена долгосрочная память, но не краткосрочная, и выявлены дефекты поздней фазы LTP, необходимой именно для формирования долгосрочной памяти. Нарушения долгосрочной памяти у таких мышей могли компенсироваться фармакологической коррекцией активности CREB (Todorovski et al., 2015). CREB как фактор транскрипции, регулирующий гены, ответственные за пролиферацию, дифференцировку и выживание клеток, имеет решающее значение для формирования долгосрочной памяти.

Транскрипционный фактор CREB, присоединяясь к консервативному CRE мотиву (cAMP-responsive element), действует на гены, чувствительные к стимуляции цАМФ. CREB, опосредуя сигналы факторов роста, контролирует пролиферацию и дифференцировку нервных клеток. CREB-зависимая индукция экспрессии генов необходима для процессов обучения и памяти у позвоночных и беспозвоночных (Kida, 2012). При этом происходит специфическое взаимодействие LIMK1 и CREB, что приводит к стимулированию транскрипции

генов. LIMK1 фосфорилирует транскрипционный фактор CREB, тем самым вызывая активацию CREB-зависимых промоторов генов, принимающих участие в формировании долгосрочной памяти, таких как *c-fos*, *zif/268*, *somatostatin* и *bdnf*. Опосредованное LIMK1 фосфорилирование CREB осуществляется через Rac/Cdc42 и PAK1 сигнальный каскад, что модулирует работу множества сигнальных путей с участием PKC, Ca²⁺/калмодулин-зависимой CaMKII, Rac-зависимой p105 киназы, p90rsk и Rsk2 (Yang et al., 2004). Интересно, что поздняя, но не ранняя, фаза LTP была нарушена у мышей, нокаутированных по PAK3, при этом наблюдалось снижение фосфорилирования CREB без изменения фосфорилирования кофилина (Meng et al., 2005). Эти результаты показывают, что PAK3-LIMK1-CREB сигнальный путь играет роль в регуляции поздней фазы LTP. Содержание pCREB в аксонах значимо для преобразования экстраклеточных сигналов, и pCREB можно рассматривать в качестве маркера активности LIMK1 в нейритах, оценивая вклад LIMK1 в обеспечение нейрональной пластичности.

Вовлеченность LIMK1 в обеспечение синаптической пластичности предполагает ее участие в процессах памяти, что подтверждается многими исследованиями. При изучении условной реакции страха у мышей обнаружено, что ингибирование LIMK1, влекущее за собой деполимеризацию актиновых филаментов, вызывает нарушение как консолидации, так и реконсолидации памяти (Medina et al., 2020). Медина с соавторами полагают (Medina et al., 2020), что точная регуляция LIMK1 является ключевым фактором повторной стабилизации долгосрочных воспоминаний о страхе у мышей, а динамика актина играет критическую роль в процессах угасания памяти (путем нарушения или усиления поведенческих реакций). Также введение ингибитора LIMK1 в гиппокамп мешало приобретению, консолидации, извлечению и реконсолидации воспоминаний о страхе, не влияя на угасание памяти (Lunardi et al., 2017). Экспрессия LIMK1 в возбуждающих нейронах гиппокампа у трансгенных AβPP/PS1 мышей увеличивает фосфорилирование кофилина (т. е. снижает его активность), устраняет нарушения LTP и приводит к улучшению социальной

памяти (Zhang et al., 2021). У мышей, нокаутированных по *limk1*, наблюдается усиленная реакция страха при условном рефлексе страха и нарушение пространственного обучения (Meng et al., 2002). Кроме того, у нокаутированных по *limk1* мышей нарушены долгосрочная пространственная память и память о страхе (Todorovski et al., 2015), что согласуется с ролью LIMK1 в поздней фазе LTP. В других формах памяти могут играть роль иные механизмы, включая LTD и пластичность шипиков.

Мутационная модель нейрокогнитивной патологии (геномного заболевания синдрома Вильямса – Бойрена), зависимой от экспрессии гена LIMK1, у дрозофилы – мутант *agn^{ts3}* – впервые создана в лаборатории нейрогенетики ИФ РАН. Специфическое свойство ДНК-последовательности *agn^{ts3}* – вставка транспозона семейства Tc1/mariner наряду с А/Т-богатой инсерцией 28 п.н. в 1 интроне гена для LIMK1, что влияет на распределение нуклеосом и связывание транскрипционных факторов. Общий уровень экспрессии микроРНК, так же, как и уровень микроРНК-биомаркеров неврологических заболеваний человека, резко снижен у *agn^{ts3}*, что вероятно обуславливает множественные физиологические проявления мутации, в том числе нарушения когнитивных процессов - обучения и памяти. Новая стратегия терапии нейропсихических болезней человека подразумевает контроль 3D архитектуры хроматина ядра нервных клеток, так как каждый пациент имеет свой структурный вариант последовательности ДНК с инсерциями и делециями (INDELS), эти районы несут транспозоны семейства Tc1/mariner, что вызывает изменение сайтов связывания микро-РНК, маркеров болезней Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона и делеционно-дупликационных синдромов со множественными, в том числе когнитивными, проявлениями. В линиях природных популяций *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R* и мутантной линии *agn^{ts3}* по результатам секвенирования выявлен полиморфизм по гену *limk1*, локуса *agnostic* (X-хромосома, 11В). Для каждой линии характерно специфическое распределение однонуклеотидных замен, коротких инсерций и делеций (Savvateeva-Popova et al., 2017). Ген обрамлен протяженными АТ-богатыми

повторами, поэтому, возможно, именно негомологичным кроссинговером обусловлен высокий полиморфизм спонтанных и мутантных аллелей этого гена (Медведева и др., 2008). Обнаруженный полиморфизм имеет своим следствием когнитивные дисфункции, выявляемые в парадигме подавления ухаживания.

1.7. Роль забывания в процессах памяти

Познание механизмов формирования памяти является актуальной проблемой нейробиологии уже более полувека. Однако только в последние годы на первый план выходит стремление понять, какую роль в становлении и сохранении памяти играет активное забывание (Medina, 2018). Независимо от филогенетического уровня организма наблюдается консервативный в эволюции феномен: приобретение информации, или обучение, имеет своей противоположностью забывание. Поэтому врожденное забывание может быть «вызываемым по умолчанию» состоянием мозга, которое постоянно приводит к «стиранию памяти» — состоянию, конкурирующему с процессами консолидации памяти. Эти процессы независимы и контролируются разными сигнальными каскадами: обучение и консолидация памяти — цАМФ (сАМР)-зависимым, компонентами которого являются CREB, С/ЕВР, активное забывание — каскадом ремоделирования актина для структурных изменений нейронов и синапсов: малая ГТФаза Ras1 — LIMK1 (ключевой фермент ремоделирования актина LIM-киназа 1) — фосфорилируемый ею кофилин (Davis, Zhong, 2017).

У дрозофилы Ras1 опосредует как минимум четыре типа активного забывания разных видов памяти, формируемых при ольфакторном обучении с негативным подкреплением: 1) забывание, внутренне присущее мозгу; 2) забывание, индуцированное интерференцией (приобретением новой информации) или конкуренцией процессов, ведущих к воспроизведению памяти; 3) забывание следов памяти и 4) забывание, активируемое обучением на ранее неподкрепляемый стимул. Но поскольку сохранение памяти является результатом обоих процессов — обучения и забывания, — возникает конфликт традиционных

и новых представлений: как понять, что является причиной «когнитивной патологии» — дефект обучения и консолидации или же дефектность активного врожденного механизма забывания. Кроме того, невозможность активировать Ras1-зависимое забывание приводит к поведенческой ригидности у мутантов по генам риска возникновения аутизма. Изменения функций (активное или неактивное состояние) LIMK1 или же кофилина вызывают целый ряд нейропатологий, известных как «интеллектуальные проблемы» (Zamboni et al., 2018).

Недавние исследования на дрозофиле способствовали смещению и пересмотру фокуса внимания: акцент теперь делается не на приобретении памяти, т.е. обучении и консолидации, а на непосредственном вычленении звеньев молекулярной и клеточной биологии активного забывания. Согласно исследованиям, биологические процессы в большинстве своем реализуются при действии биохимических путей, специально предназначенных для синтеза или деградации (Davis, Zhong, 2017). Примеры таких противодействующих процессов это: митоз для порождения новых клеток и программируемая клеточная смерть, синтез и деградация белков, фосфорилирование и дефосфорилирование. Следуя этой логике, наряду с путями, ведущими к приобретению памяти, должны существовать пути ее стирания. Та же логика применима и к гомеостазу биологических систем. Эти факты служат основой для признания того, что забывание — это активный процесс, осуществляемый с вовлечением иных биологических путей, нежели тех, что задействованы при приобретении и консолидации памяти. То есть внутреннее забывание — это механизм гомеостаза для возвращения мозга к его исходному состоянию. В литературе выделяют следующие типы забывания: пассивное забывание (происходит само по себе с ходом времени), забывание, обусловленное интерференцией (ему способствует конкуренция со вновь возникающими стимулами при обучении), забывание, мотивированное желанием забыть неприятный предшествующий опыт и

забывание, при котором извлечение некоего аспекта памяти подавляет иные ее аспекты (Davis, Zhong, 2017).

Хороший пример необходимости и ценности забывания, стирания памяти иллюстрируют две линии дрозофилы, *rovers* и *sitters*. *Rovers*, в отличие от аллельного варианта мутации *sitters*, не сидят на месте и очень активно исследуют окружающую среду в поисках пищи (личинки). Мухи *rovers* демонстрируют очень прочное обратное забывание, вызванное обучением, тогда так у мух *sitters* оно подавлено (Reaume et al., 2011). Этот повышенный уровень забывания у *rovers* может отражать увеличенную способность обновлять память для применения более гибких стратегий поиска еды. Это породило предположение, что адаптивное забывание может быть свойством или признаком креативных индивидов, позволяющим быстро переключаться с воплощения безуспешных идей на более успешные (Forthmann et al., 2019).

С использованием метода павловского обучения дрозофилы с негативным подкреплением электрошоком была показана ключевая роль в процессах активного забывания такого компонента актин-ремоделирующего каскада, как Rac1 (Shuai et al., 2011; Dong et al., 2016). Данный белок также участвует в активном забывании у млекопитающих (Liu et al., 2016), что указывает на эволюционную консервативность механизма и возможность экстраполировать на человека данные, полученные на дрозофиле. Rac1 является одним из активаторов LIMK1, ингибирующей кофилин. Активация кофилина препятствует стиранию памяти (Cervantes-Sandoval et al., 2016). Таким образом, актин-деполимеризующий каскад напрямую задействован в активном забывании у дрозофилы при ольфакторном обучении с подкреплением электрошоком.

Rac1-зависимое забывание является эволюционно консервативным, присутствуя как у беспозвоночных, так и у позвоночных. Так, у аплизии обучение с легким напоминанием восстанавливает долгосрочную память при сенситизации (Patel et al., 2018).

Кроме того, уровень активации Rac1, регулируя полимеризацию актина, влияет на распространение конусов роста ламеллоподий развивающихся нейронов и определяет размер и форму синаптических шипиков взрослых нейронов. Поэтому он влияет на забывание, зависимое от нейрогенеза. Это основано на данных о том, что в течение жизни млекопитающих к зубчатой извилине гиппокампа постоянно добавляются новые нейроны с интенсивностью, модулируемой стимулами от окружающей среды (обогащенная или бедная), физической активности, и других внешних факторов. Нейрогенез ремоделирует нервные сети гиппокампа, что служит механизмом стирания следов памяти (Ghosh, 2019).

Многие нейрологические дефекты мозга нарушают когнитивные функции, вызывая интеллектуальные проблемы расстройств аутистического спектра, болезнь Альцгеймера и др. (Humble et al., 2019). И хотя при каждом отдельном расстройстве наблюдается уникальная картина патофизиологии, при всех заболеваниях наблюдаются нарушения структуры и функций синапсов (Qu et al., 2019). Согласно современным представлениям, большую роль играет активное забывание. И поскольку оно контролируется каскадом ремоделирования актина, ключевым ферментом которого является LIMK1, важно изучать роль данного фермента не только в процессах обучения, но и в процессах забывания.

На сегодняшний день существует значительное количество исследований, посвящённых изучению молекулярно-генетических и физиологических механизмов формирования, обработки, сохранения и потери памяти. Особую роль в исследованиях занимают причины и механизмы различных нарушений, лежащих в основе возникновения и развития заболеваний. В последние годы фокус внимания всё больше смещается на изучение роли забывания в процессах формирования и сохранения памяти. Несмотря на то, что за процессы приобретения памяти и активного забывания ответственны разные каскады,

можно найти ключевые точки их пересечения. Таким связующим звеном является LIMK1 – фермент, играющий центральную роль в регуляции актинового цитоскелета и, как следствие, в обеспечении синаптической пластичности, необходимой для обучения и памяти.

Нарушения памяти лежат в основе множества различных заболеваний, отдельную группу среди которых составляют НДЗ. Они оказывают значимую нагрузку на систему здравоохранения и социального обеспечения, и экономику общества в целом. Прогрессирующее течение нейродегенеративных заболеваний способствует инвалидизации пациентов, приводя к необходимости постоянного ухода. На сегодняшний день не найдено методов лечения или лекарств, которые бы смогли остановить развитие патологии. Даже поддержание пациента в ясном состоянии сознания на поздних стадиях заболевания представляется практически невозможным. В связи с этим поиск путей целенаправленного терапевтического воздействия на белки и гены, вовлеченные в развитие патологий с когнитивными нарушениями, и создания лекарственных препаратов для облегчения состояния больных подобными недугами является чрезвычайно важной задачей.

В этом контексте представляется крайне востребованным изучение узловых моментов пересечений биохимических и нервных сетей, обеспечивающих реализацию процессов памяти. LIMK1 представляет собой сложный многофункциональный белок, принимающий участие во множестве процессов, происходящих в организме посредством различных каскадов. Нарушения синтеза LIMK1 может приводить к серьезным нарушениям. Формирование памяти и забывание служат основой поведенческой пластичности. Для детального понимания роли LIMK1 в реализации процессов обучения и памяти необходимы животные модели, дающие возможность изучения этих процессов одновременно в физиологическом и генетическом контексте. С этой точки зрения уникальным инструментом в руках экспериментатора является дрозофила, позволяющая осуществлять комплексные исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

В работе использовали следующие линии *Drosophila melanogaster* из биоколлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (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* (1 – 38,9) 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, что было описано в ранее проведенном исследовании (Каминская, 2012). Подробная информация об особенностях структурной организации гена *limk1* у мух данных линий представлена в Приложении I.

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 26294 в коллекции BSDC, США).
- 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 9116 в коллекции BSDC, США).

- 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 36303 в коллекции BSDC, США).

- 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 6794 в коллекции BSDC, США).

- 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 6793 в коллекции BSDC, США).

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

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

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

2.2. Методы исследования

2.2.1. Система скрещивания Gal4-UAS

Для подавления и активации экспрессии гена *limk1* использовали систему скрещивания GAL4-UAS. Данная система позволяет избирательно изменить экспрессию любого гена в определенном типе клеток. Линии, несущие

рекомбинантный ген транскрипционного активатора Gal4, скрещивали с линиями, имеющими регуляторную последовательность (энхансер) UAS. При связывании Gal4 с UAS запускается транскрипция трансгенного элемента (гена X) (Рисунок 2.1). Геном X может являться *limk1* (для активации экспрессии гена) или ген интерферирующей РНК (для подавления экспрессии гена). Тканеспецифичность гена X обеспечивается постановкой гена активатора Gal4 под управление промоторами генов, экспрессирующихся конститутивно в интересующих нейронах дрозофилы. Таким образом, используя разные тканеспецифичные драйверы Gal4, можно экспрессировать одну и ту же последовательность UAS в разных тканях (Brand, Perrimon, 1993).

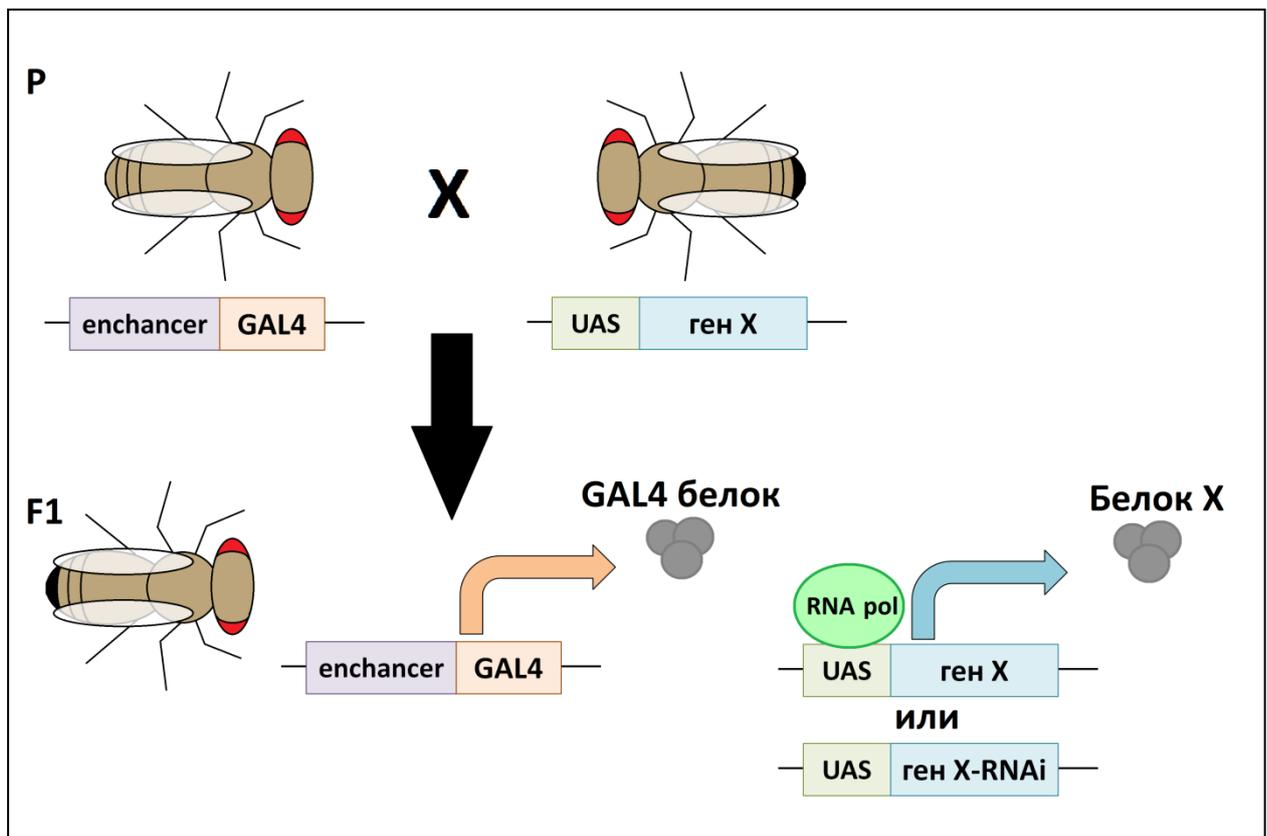


Рисунок 2.1. Схема системы Gal4-UAS

Таким образом, были проведены следующие скрещивания:

1. Подавление гена *limk1* в нервной системе (♀ 6794 x ♂ 26294).

P: ♀ P{w[+mC]=nrv2-GAL4.S}8 P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}eg[T10] x ♂ P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02063}attP2

F1: ♀, ♂ P{w[+mC]=nrv2-GAL4.S}8 P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}eg[T10]+

2. Активация гена *limk1* в нервной системе (♀6794 x ♂9116).

P: ♀ P{w[+mC]=nrv2-GAL4.S}8 P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}eg[T10] x ♂
P{w[+mC]=UAS-LIMK1.T:Ivir\HA1}M6

F1: ♀,♂ P{w[+mC]=nrv2-GAL4.S}8 P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}eg[T10]+

3. Контроль: без изменения экспрессии *limk1* в нервной системе (♀6794 x ♂36306)

P: ♀ P{w[+mC]=nrv2-GAL4.S}8 P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}eg[T10] x ♂
P{y[+t7.7]=CaryP}attP2

F1: ♀,♂ P{w[+mC]=nrv2-GAL4.S}8 P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}eg[T10]+

4. Подавление гена *limk1* в холинергических нейронах (♀6793 x ♂26294).

P: ♀ P{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4}19BP{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}Myo31DF[T2] x
♂ P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02063}attP2

F1: ♀,♂ P{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4}19BP{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}
Myo31DF[T2]+

5. Активация гена *limk1* в холинергических нейронах (♀6793 x ♂9116).

P: ♀ P{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4}19BP{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}Myo31DF[T2] x
♂ P{w[+mC]=UAS-LIMK1.T:Ivir\HA1}M6

F1: ♀,♂ P{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4}19BP{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}
Myo31DF[T2]+

6. Контроль: без изменения экспрессии *limk1* в холинергических нейронах (♀6793 x ♂36306).

P: ♀ P{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4}19BP{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}Myo31DF[T2] x
♂ P{y[+t7.7]=CaryP}attP2

F1: ♀,♂ P{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4}19BP{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}
Myo31DF[T2]+

7. Подавление гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах (♀7009 x ♂26294).

P: ♀ P{w[+mC]=Ddc-GAL4.L}Lmpt[4.36] x ♂ P{y[+t7.7] v[+t1.8]=
TRiP.JF02063}attP2

F1: ♀,♂ P{w[+mC]=Ddc-GAL4.L}Lmpt[4.36]+

8. Активация гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах (♀7009 x ♂9116).

P: ♀ P{w[+mC]=Ddc-GAL4.L}Lmpt[4.36] x ♂ P{w[+mC]=UAS-LIMK1.T:Ivir\HA1}M6

F1: ♀,♂ P{w[+mC]=Ddc-GAL4.L}Lmpt[4.36]+

9. Контроль: без изменения экспрессии *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах (♀7009 x ♂36306).

P: ♀ P{w[+mC]=Ddc-GAL4.L}Lmpt[4.36] x ♂ P{y[+t7.7]=CaryP}attP2

F1: ♀,♂ P{w[+mC]=Ddc-GAL4.L}Lmpt[4.36]+

10. Подавление гена *limk1* в нейронах *fruitless* (♀30027 x ♂26294).

P: ♀ P{w[+mW.hs]=GawB}fru[NP0021] x ♂ P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02063}attP2

F1: ♀,♂ P{w[+mW.hs]=GawB}fru[NP0021]+

11. Активация гена *limk1* в нейронах *fruitless* (♀30027 x ♂9116).

P: ♀ P{w[+mW.hs]=GawB}fru[NP0021] x ♂ P{w[+mC]=UAS-LIMK1.T:Ivir\HA1}M6

F1: ♀,♂ P{w[+mW.hs]=GawB}fru[NP0021]+

12. Контроль: без изменения экспрессии *limk1* в нейронах *fruitless* (♀30027 x ♂36306).

P: ♀ P{w[+mW.hs]=GawB}fru[NP0021] x ♂ P{y[+t7.7]=CaryP}attP2

F1: ♀,♂ P{w[+mW.hs]=GawB}fru[NP0021]+

2.2.2. Методика подавления ухаживания

В качестве экспериментального подхода для анализа процессов обучения и забывания у дрозофилы использовали методику подавления ухаживания, основанную на половом поведении самцов. Ухаживание самца дрозофилы представляет собой комплекс определенных действий, направленных на оплодотворение самки: ориентация, преследование, вибрации крыла в покое и на

бегу, попытка копуляции. Запуск элементов полового поведения осуществляется зрительным образом самки, а также испускаемыми ею феромонами. Феромоны могут как стимулировать ухаживание (афродизиаки), так и подавлять его (антиафродизиаки). Известно, что оплодотворенная и девственная самки отличаются испускаемыми феромонами, а также поведением. Оплодотворенная самка несёт на своей кутикуле специфический для самцов феромон cVA (цис-вакценилацетат), отсутствующий у девственных самок, а также активно отвергает ухаживания самца. Отсутствие успеха при ухаживании за оплодотворенной самкой в значительной степени подавляет последующее ухаживание самца за самками. (Siegel, Hall, 1979; Kamyshev et al., 1999; Keleman et al., 2012).

Вылупившихся девственных насекомых исследуемых линий сортировали по полу без использования наркоза. Самцов, используемых в эксперименте, содержали индивидуально на изюмно-дрожжевой среде в стандартных условиях. Объектами ухаживания самцов всех исследуемых линий были оплодотворенные самки линии дикого типа *Canton-S* в возрасте пяти суток. Выбор данного объекта в качестве стандарта обусловлен отсутствием существенных генетических нарушений, отсутствием нарушений формирования кратко- и долгосрочной памяти, а также необходимостью создания однородных условий эксперимента. Тренировку и тестирование проводили в специальных экспериментальных камерах из оргстекла диаметром 15 мм, высотой 5 мм.

Для тренировки пятисуточного девственного самца исследуемой линии помещали в экспериментальную камеру вместе с оплодотворённой самкой *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 300с, фиксируя при помощи специальной программы время начала и окончания отдельных элементов (Камышев et al., 1999). Элементы могли быть связаны с ухаживанием (ориентация, преследование, вибрация, попытка копуляции), или не связаны с ним (активность, прининг, покой).

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

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

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

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

Индекс ухаживания (ИУ) высчитывали как время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах от общего времени наблюдения. (Камышев и др., 1999; Kamyshev et al., 1999; Sokal, Rohlf, 1995).

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 не менее 20 пар мух. Для расшифровки и анализа данных использовали специально разработанные компьютерные программы (автор программ - Н.Г. Камышев).

Эксперимент проводили в три этапа. На первом этапе провели анализ ИО линий, характеризующихся полиморфизмом по гену *limk1 Canton-S, Berlin, Oregon-R*, а также мутантной линии *agn^{ts3}*. На втором этапе провели анализ ИО у тех же линий при воздействии тепловым шоком. Тепловое воздействие проводили в водяном 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.

2.2.3. Молекулярно-генетические методы

Метод выделения РНК из *Drosophila melanogaster*

Пятисуточных самцов гомогенизировали в 300 мкл TRI реагента (MRC, TR 118). Гомогенат центрифугировали, супернатант переносили в новую пробирку. К супернатанту добавляли этанол 96% в пропорции 1:1. РНК выделяли на колонках Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, R2050), с обработкой ДНКазой I на колонках, согласно протоколу фирмы-производителя. Смесь супернатанта с этанолом центрифугировали (12000 об/мин, 1 мин, 22°C) с использованием колонки. Колонку промывали RNA Wash Buffer с последующим центрифугированием (12000 об/мин, 1 мин, 22°C). Добавляли смесь ДНКазы I (5 мкл) и DNA Direction Buffer (75мкл) и выдерживали 15 минут при комнатной температуре. Колонку дважды промывали RNA PreWash (400 мкл) с последующим центрифугированием (12000 об/мин, 1 мин, 22°C). Добавляли RNA Wash Buffer (700 мкл), центрифугировали (12000 об/мин, 2 мин, 22°C). РНК смывали с колонок в эппендорф водой, свободной от ДНКаз и РНКаз (30 мкл) с последующим центрифугированием (14000 об/мин, 2 мин, 22°C).

Определение концентрации РНК проводили на спектрофотометре BioPhotometer (Eppendorf®) при длине волны 260нм.

Синтез кДНК по матрице РНК при обратной транскрипции

Для синтеза кДНК использовали обратную транскриптазу MMLV (Evrogen, SK021). В стерильной пробирке объёмом 0,2 мл смешивали 1 мкг РНК и 1 мкл random primer. Пробирку прогревали 2 минуты при 70°C, затем переносили в лёд. К смеси добавляли 5x буфер для синтеза первой цепи (4 мкл), смесь dNTP (10 мМ, 2 мкл), дитиотреитол (20 мМ, 2 мкл), ингибитор РНКаз (0,5 мкл), MMLV

ревертазу (1 мкл) и стерильную воду, свободную от РНКаз до итогового объёма смеси 20,5 мкл. Реакционную смесь инкубировали с использованием системы Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystem™) в течение 70 минут. Образец хранили при температуре -70°C.

Метод полимеразной цепной реакции

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с помощью смеси qPCRmix-HS (Evrogen, PK156L), с использованием системы StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). В каждом эксперименте проводили по пять повторностей. Эндогенным контролем служили кДНК рибосомального белка дрозофилы *rpl32* и фактора элонгации EF1 alpha2. Последовательности праймеров *limk1* брали из базы данных FlyPrimerBank (PP12636, <http://www.flyrnai.org/flyprimerbank>). Последователи праймеров указаны в Таблице 2.1.

Таблица 2.1. Последовательности праймеров

Ген	Прямой	Обратный
<i>rpl32</i>	5'-TATGCTAAGCTGTGCGCACAAATGGC-3'	5'-GTTCTGCATGAGCAGGACCTCCA-3'
<i>EF1 α2</i>	5'-GCCGTGGGTTTGTGATCAGTT-3'	5'-GATCTTCTCCTTGCCCATCC-3'
<i>limk1</i>	5'-GTGAACGGCACACCAGTTAGT-3'	5'-ACTTGCACCGGATCATGCTC-3'

ПЦР проводили по следующей схеме:

1. 1 цикл (95 °C, 5 мин).
2. 40 циклов (95 °C – 20 сек, 58/60 °C – 20 сек, 72 °C – 20 сек, 77/78 °C – 15 сек).
3. Анализ кривой плавления (95 °C – 15 сек, 60 °C – 1 мин, 60-95 °C (Δ 0.3 °C, 15 сек).

Иммунофлуоресцентное окрашивание мозга дрозофилы

Самцов 5-7-дневного возраста подвергали холодовой анестезии и прикрепляли булавками к желатиновой подложке в чашке Петри. Мозги извлекали в буфере PBS (рН 7,5) с помощью острого пинцета (Merck, T4412), накапливали в том же буфере на холоде, и затем фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS в

течение 1 часа при комнатной температуре. Антитела разводили в 0,2% TBStween в соотношении 1:200. Инкубацию проводили при 4 °C в течение 3 дней с первичными антителами и в течение 1 суток со вторичными. Мозги заключали в среду Vectashield, содержащей DAPI (Vector laboratories, H-1200-10).

В работе использовали следующие антитела:

1. 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).

2. Первичные антитела кролика к GFP (Abcam, ab290), вторичные антитела козы к антителам кролика, Alexa Fluor 633 (Invitrogen, A21071).

3. 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).

Анализ распределения белка в головном мозге дрозофилы при помощи конфокальной микроскопии

Мозг сканировали фронтально с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (LSM 710 Carl Zeiss; ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук). В каждом эксперименте проводили по три повторности. Сканирование выполняли с использованием объектива X63 на разной глубине (z-шаг 2 мкм). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения Fiji. Структуры мозга визуально наносили на карту с помощью онлайн-атласа мозга дрозофилы (Virtual Fly Brain). Для измерения среднего уровня LIMK1 внутри структур мозга, среднюю интенсивность сигнала анализировали в трех небольших квадратных областях (~10 × 10 мкм) внутри каждой структуры. Полученные средние значения нормализовали к средней интенсивности структуры для каждого мозга. При подготовке рисунков для каждого оптического среза использовали функцию автоконтраста.

2.3. Статистическая обработка результатов

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 $\leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оценка процессов обучения и забывания у самцов дрозофилы

3.1.1. 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* выявили 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.

В контексте исследования, проведенного в парадигме подавления ухаживания, важно учитывать уровень активности ухаживания. Графики, иллюстрирующие индексы ухаживания, приведены в Приложении II. Индексы ухаживания самцов всех исследуемых линий характеризуются высокими значениями, за исключением мух с изменением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах. При этом следует отметить, что ИО, используемый для количественной оценки результатов обучения, непосредственно не зависит от интенсивности ухаживания (Никитина и др., 2002; Никитина, 2023; Zatssepina et al., 2021).

В результате исследования было выявлено, что, как показано на рисунке 3.1, у линии *Canton-S* показатели ИО достоверно не изменяются на протяжении всего исследуемого периода, однако мы можем наблюдать их снижение с течением времени.

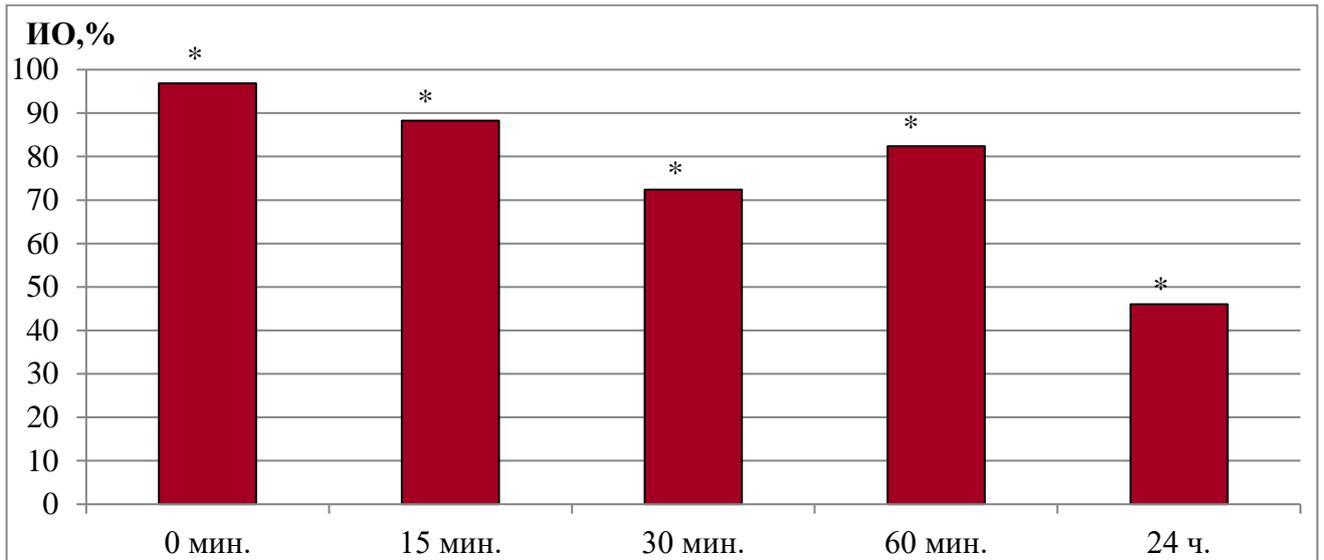


Рисунок 3.1. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - ИО достоверно отличается от 0 ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Как показано на рисунке 3.2, у линии *Berlin* наблюдаются достаточно существенные отличия от *Canton-S* во временной динамике ИО: через 15 мин, 60 мин и 24 часа ИО достоверно ниже, чем у *Canton-S* ($p \leq 0,05$).

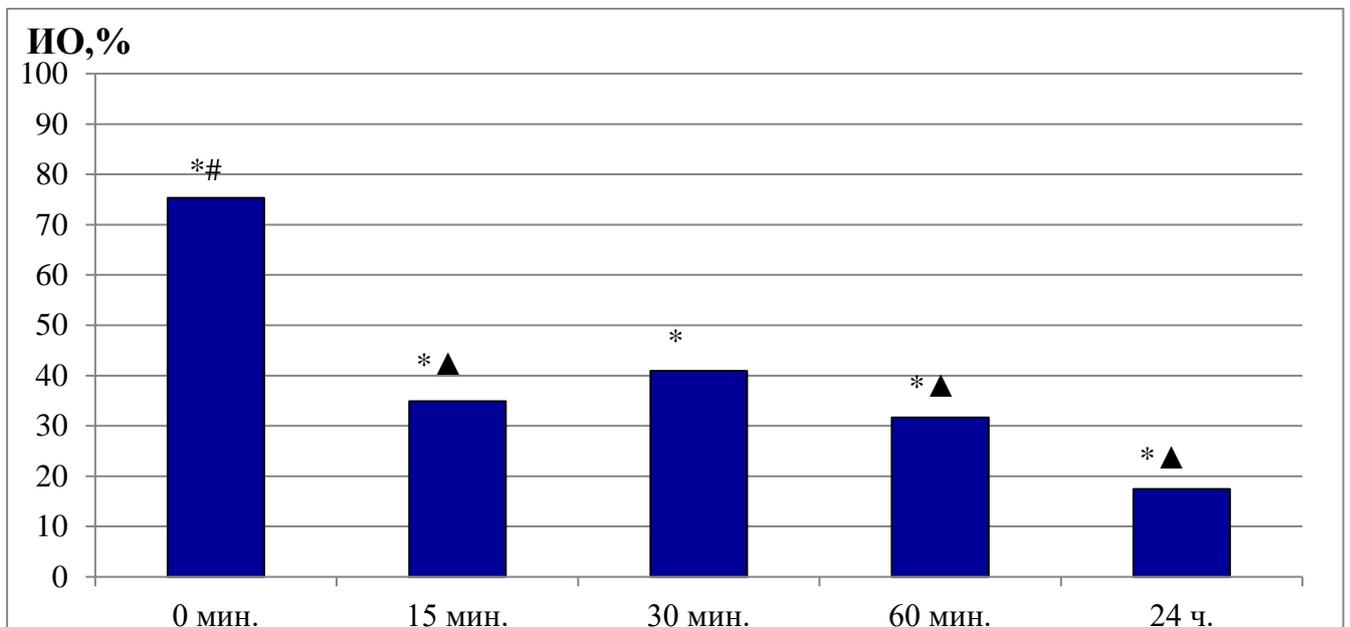


Рисунок 3.2. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Berlin*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от 0, ▲ - достоверно отличается от *Canton-S*, # - достоверно отличается от 24ч ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Как показано на рисунке 3.3, у линии *Oregon-R* ИО низкие на всех временных интервалах и достоверно отличаются от ИО линии *Canton-S*. При этом с течением времени разница между двумя линиями достоверно увеличивается ($p \leq 0,05$).

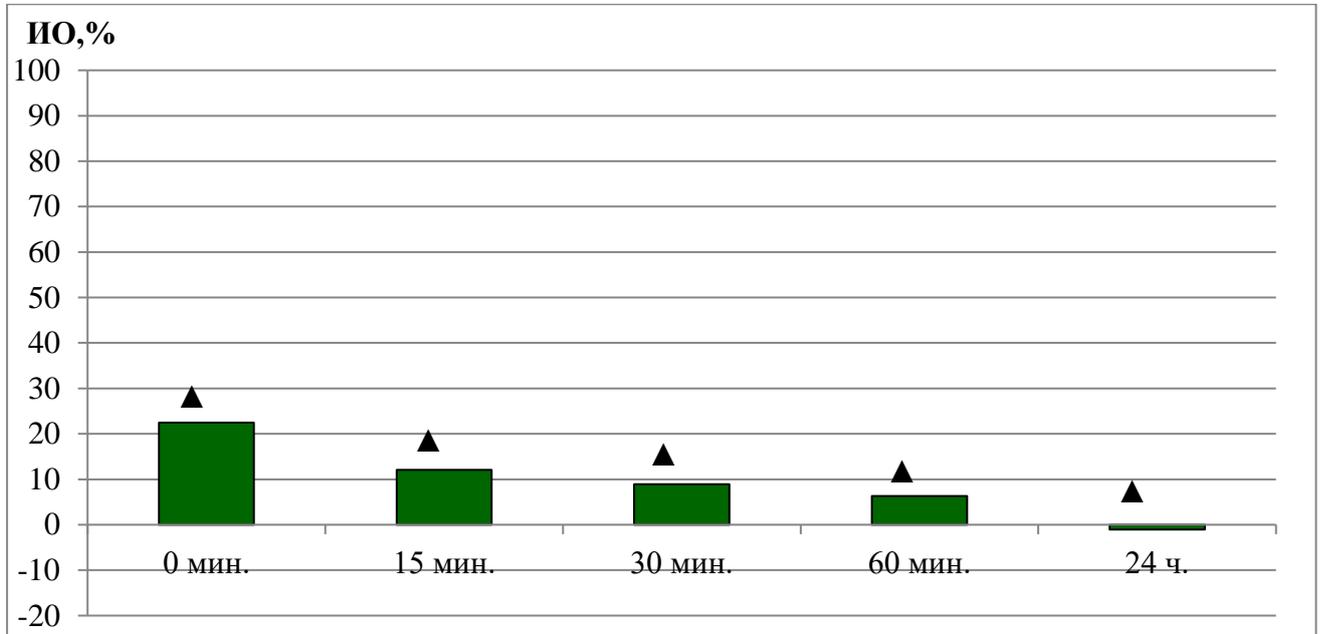


Рисунок 3.3. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Oregon-R*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %.

▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

ИО у мух линии *agn^{ts3}* достоверно ниже ИО линии *Canton-S* на всех исследуемых временных интервалах ($p \leq 0,05$) (Рисунок 3.4).

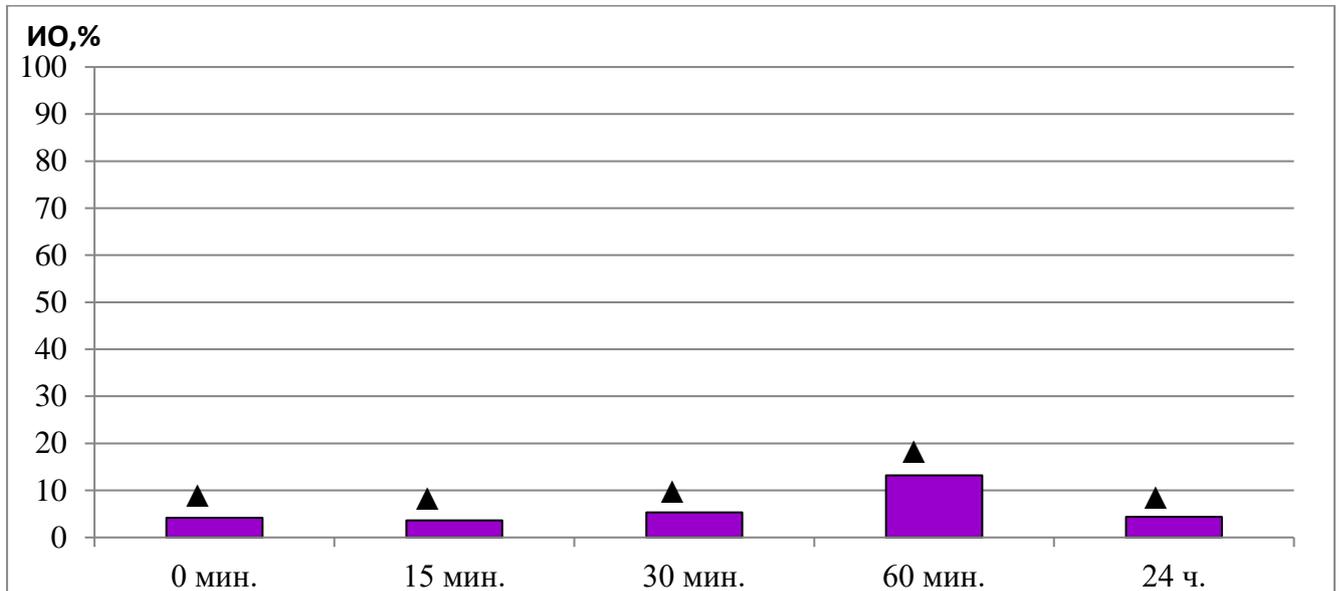


Рисунок 3.4. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линии *agn^{ts3}*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. ▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Для оценки активности процессов забывания необходимо учитывать скорость снижения ИО на некотором временном интервале после тренировки. На рисунке 3.5 видно, что сразу после тренировки ИО мух линий *Canton-S* и *Berlin* близки, однако спустя 15 минут кривая ИО *Berlin* лежит ниже, чем для *Canton-S*. Таким образом, забывание у линии *Berlin* интенсивно при краткосрочной памяти, а у линии *Canton-S* при среднесрочной. Динамика ИО *Oregon-R* и *agn^{ts3}* слабо выражена. ИО сохраняются на протяжении исследуемого периода времени на относительно постоянном низком уровне.

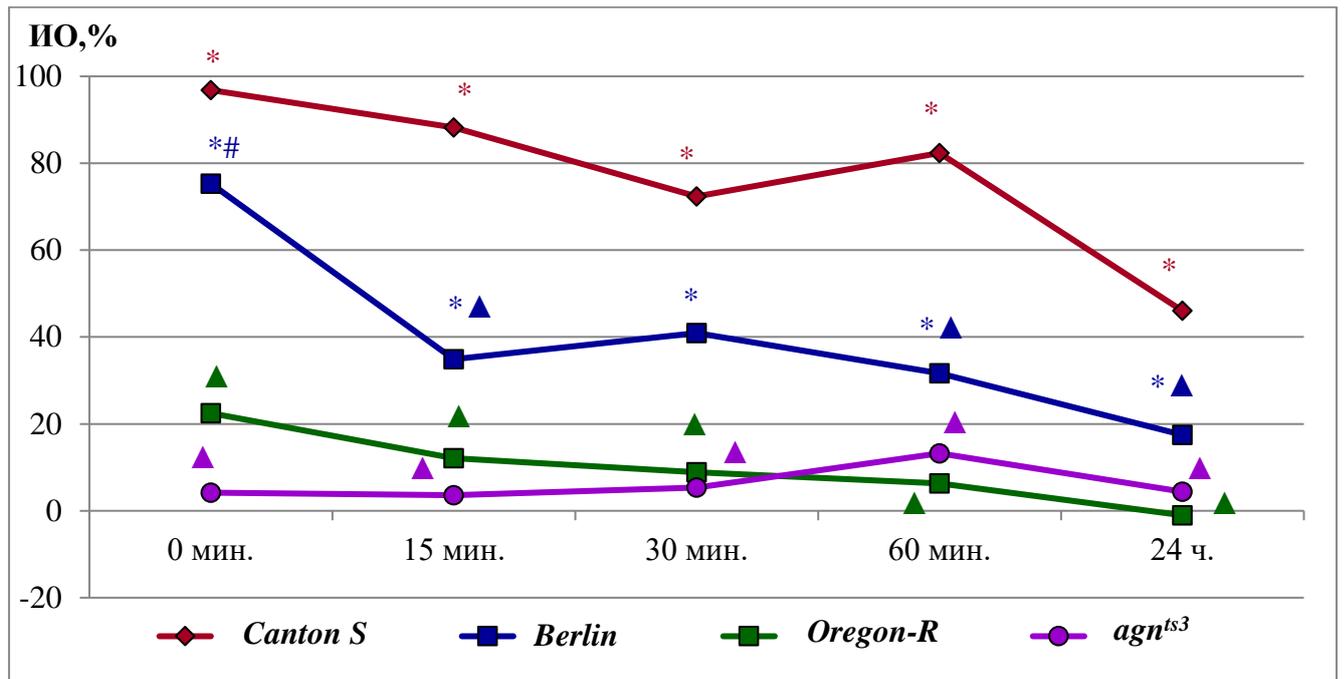


Рисунок 3.5. Динамика индексов обучения *Drosophila melanogaster* линий, проявляющих полиморфизм в гене *limk1*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от 0, ▲ - достоверно отличается от Canton-S, # - достоверно отличается от 24ч ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Таким образом, реализация процессов обучения и формирования памяти, а также динамика забывания может быть обусловлена полиморфизмом по гену *limk1* (Никитина и др., 2023). При этом важно, характерно ли это только для интактного контроля, и приведет ли действие стресса к изменению протекания когнитивных процессов.

3.1.2. 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 ($p \leq 0,05$) (Рисунок 3.6).

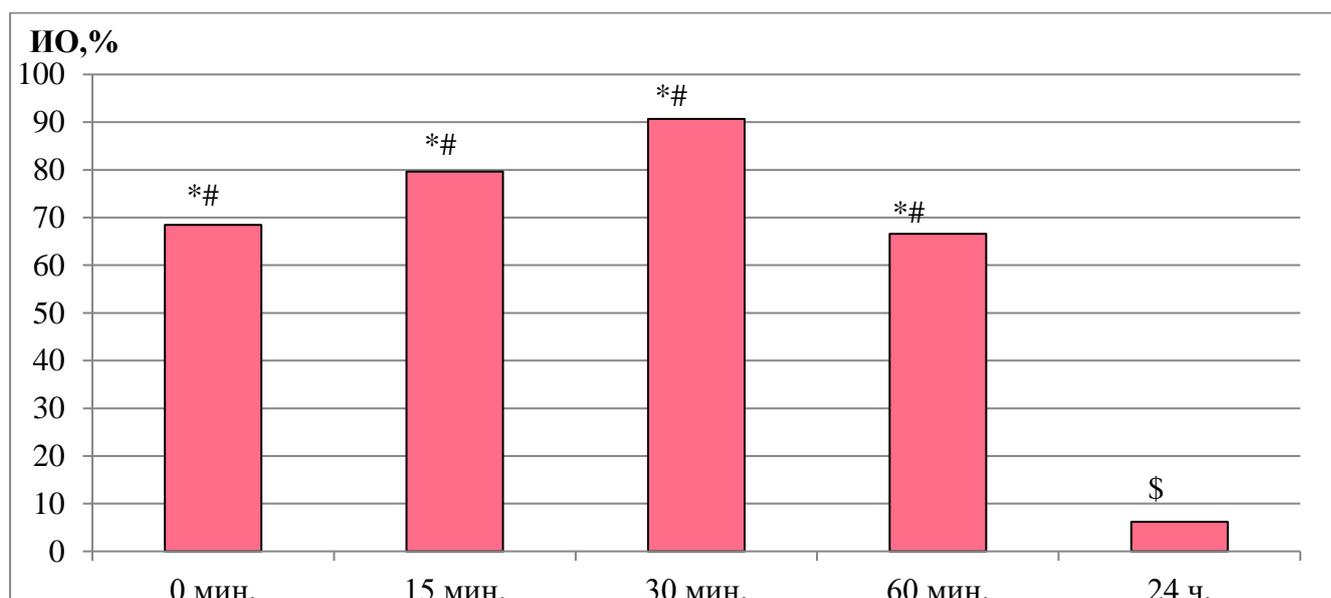


Рисунок 3.6. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S* при воздействии тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от 0, # - достоверно отличается от 24ч, \$ - достоверно отличается от интактного контроля ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

У мух линии *Berlin* также спустя 24 часа после тренировки ИО достоверно снижается по сравнению с тестом сразу после тренировки ($p \leq 0,05$) (Рисунок 3.7). Однако в целом действие теплового шока на линию *Berlin* устраняет отличия ИО данной линии от *Canton-S*.

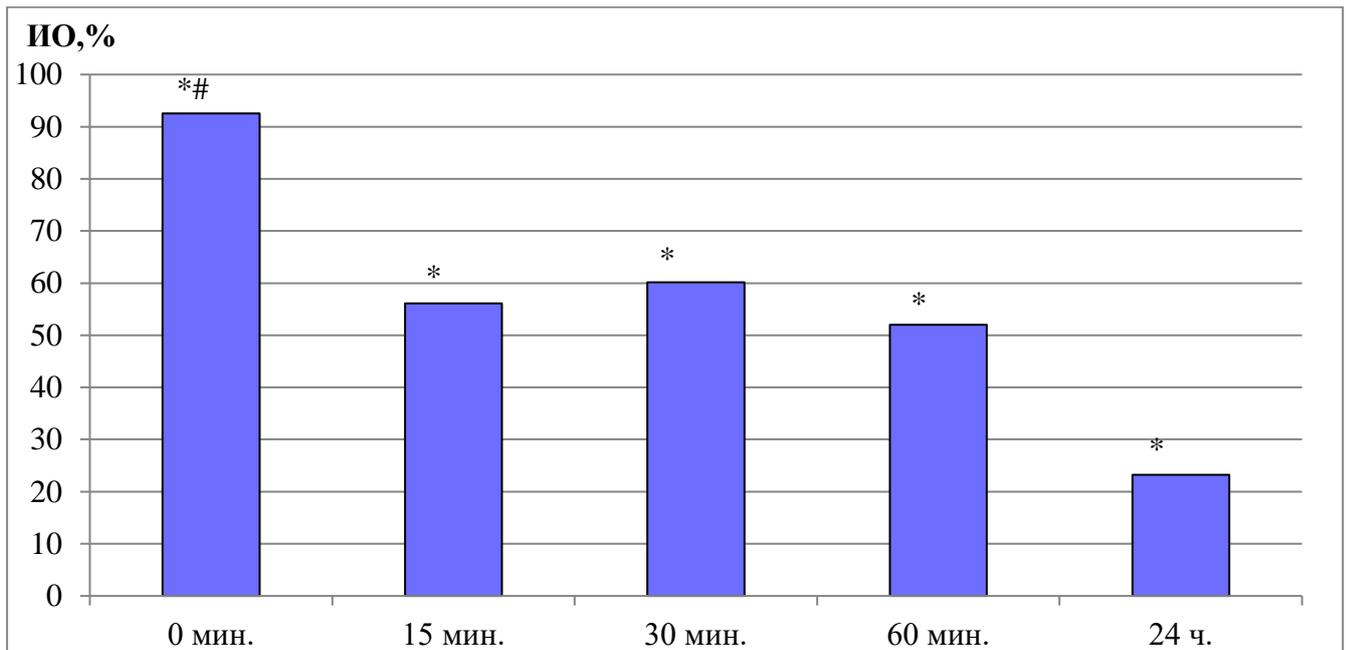


Рисунок 3.7. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Berlin* при воздействии тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от 0, # - достоверно отличается от 24ч, ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Тепловой шок устраняет отличия ИО мух линии *Oregon-R* от *Canton-S* только через 24 часа. На всех временных интервалах ИО остались на невысоком уровне, как и в интактном контроле (Рисунок 3.8). Таким образом, можно говорить о том, что эта линия неспособна как к обучению, так и формированию краткосрочной и среднесрочной памяти, как в норме, так и при действии тепловым шоком, что согласуется с ранними исследованиями (Каминская и др., 2015).

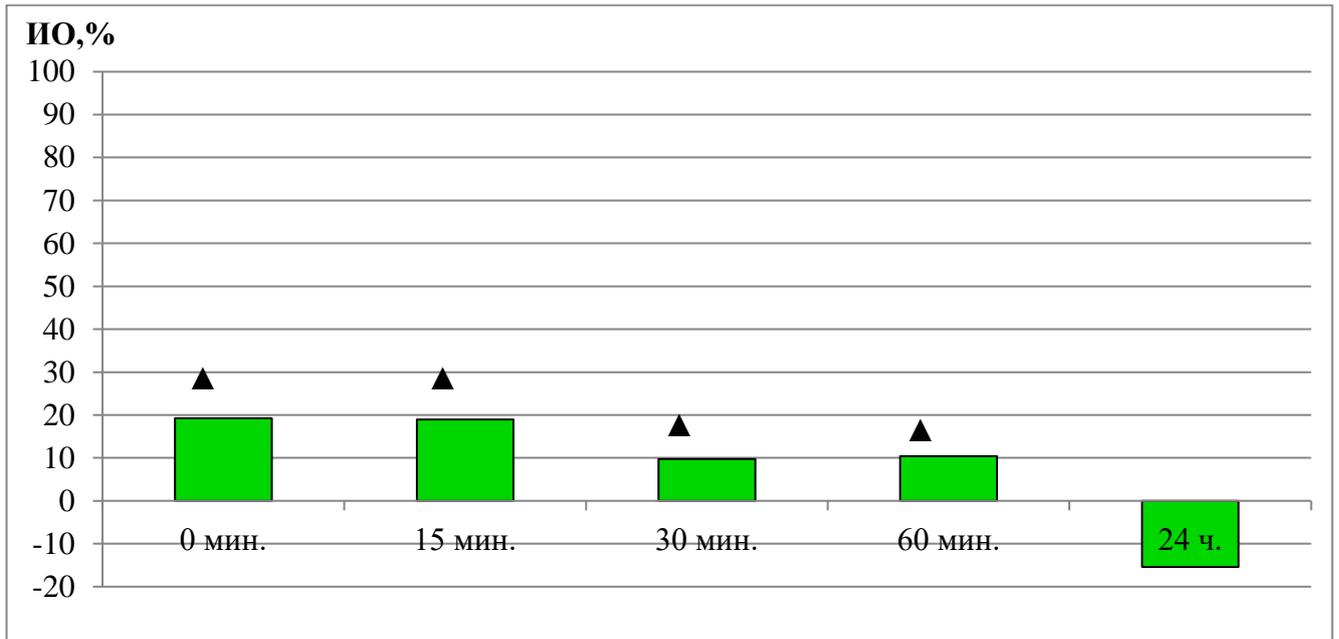


Рисунок 3.8. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Oregon-R* при воздействии тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. ▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Как видно из рисунка 3.9, тепловой шок восстанавливает у мутанта *agn^{ts3}* уровень ИО, присущий в норме линии *Canton-S*.

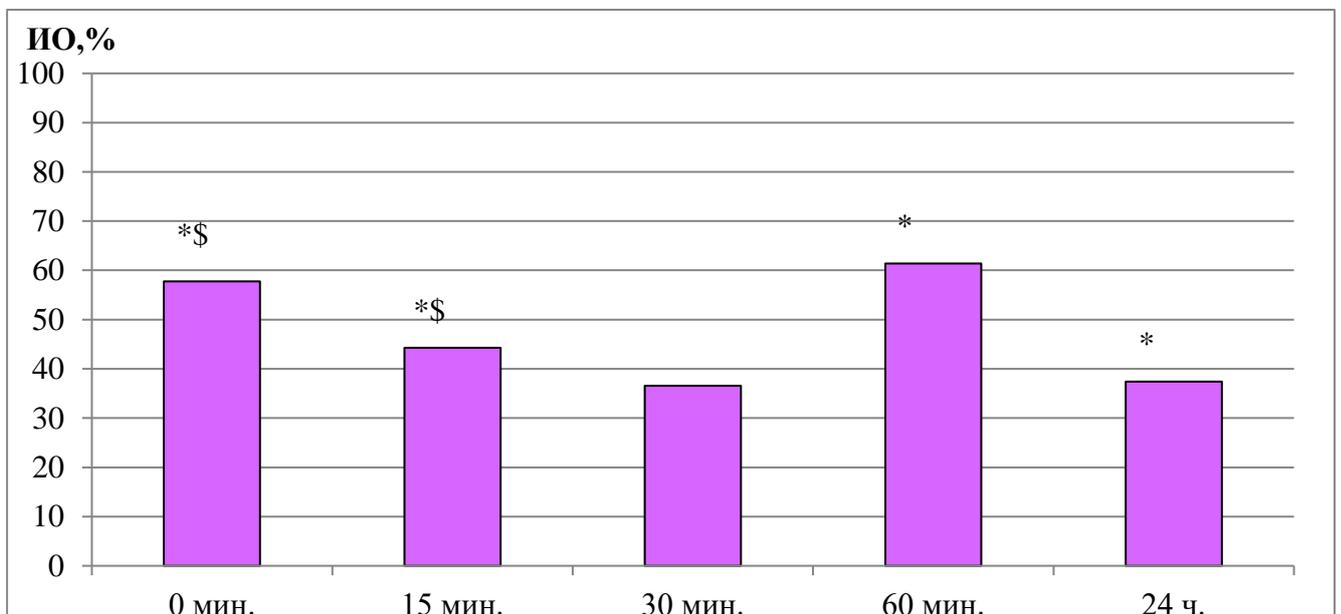


Рисунок 3.9. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линии *agn^{ts3}* при воздействии тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от 0, \$ - достоверно отличается от интактного контроля ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Также тепловой шок оказывает влияние и на динамику изменения памяти, как видно из рисунка 3.10. 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 (Никитина и др., 2023).

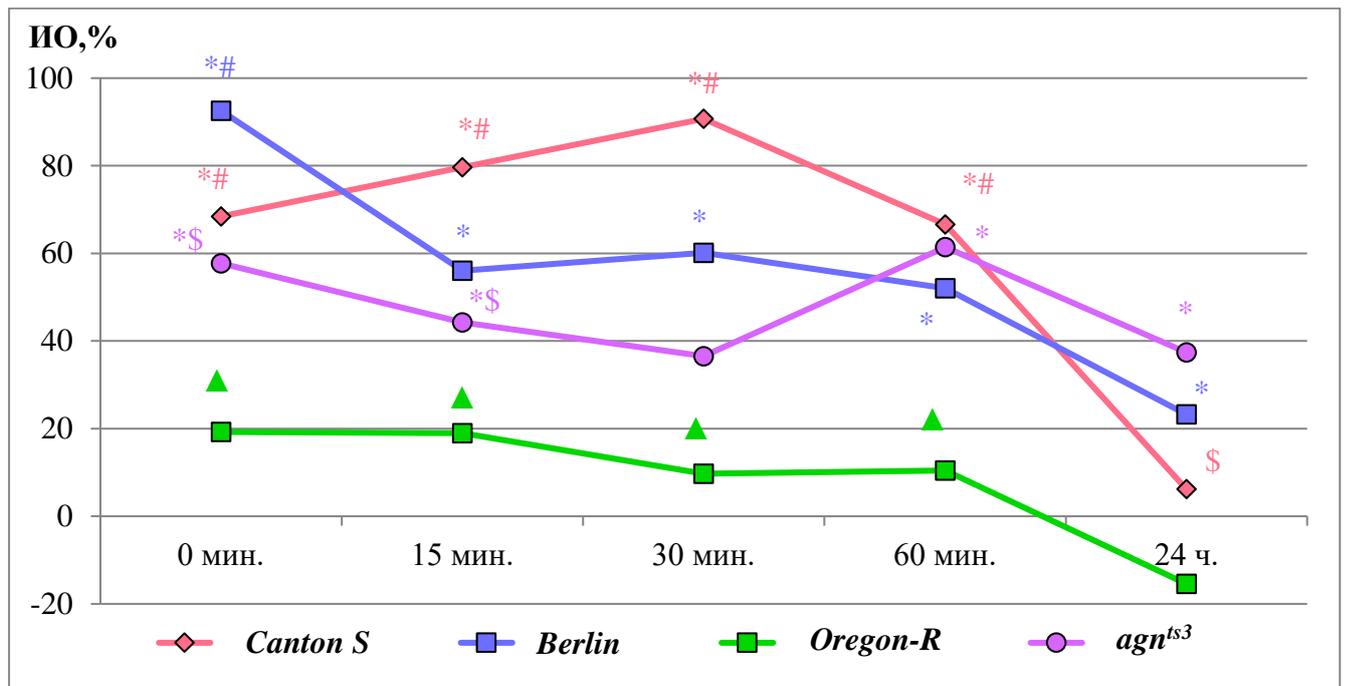


Рисунок 3.10. Динамика индексов обучения *Drosophila melanogaster* линий, проявляющих полиморфизм в гене *limk1* при воздействии тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от 0, ▲ - достоверно отличается от *Canton-S*, # - достоверно отличается от 24ч, \$ - 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).

3.1.3. 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. Так, например, у линии *agn^{ts3}* количество D- и C-изоформ LIMK1 было в 3 раза выше, чем таковое у линии *Canton-S*, а также была явно снижена способность к обучению по сравнению с *Canton-S*. При этом баланс двух изоформ у *agn^{ts3}* сопоставим с таковым у *Canton-S*, в отличие от линии *Berlin*, для которой было выявлено 5-кратное увеличение, и линии *Oregon-R*, для которой было выявлено 5-кратное уменьшение соотношения изоформ относительно *Canton-S*. У линии *Berlin* была снижена эффективность ухаживания. Также у линии *Berlin* наблюдали увеличение количества D- и C-изоформ LIMK1 в сравнении с *Canton-S*. У линии *Oregon-R* количество D- изоформы было достоверно ниже, чем у *Canton-S*, а количество C-изоформы было сопоставимо с таковым у *agn^{ts3}*, и у мух данной линии также наблюдали нарушения памяти (Каминская и др., 2011; Каминская и др., 2015).

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*. Для проверки отсутствия неспецифической экспрессии генов, находящихся под контролем регуляторной последовательности UAS, провели дополнительные скрещивания линий, содержащих энхансер UAS (36303, 26294 и 9116) с линией дикого типа *Canton-S*. Анализ ИО мух, полученных в результате дополнительных контрольных скрещиваний (Приложение III) не выявил таковой неспецифической экспрессии.

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 (Рисунок 3.11). 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 (Рисунок 3.12). 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 (Рисунок 3.11). Активация также интенсифицирует забывание: спустя 30 минут после тренировки ИО достоверно отличается от контроля и от линии с подавлением *limk1*.

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).

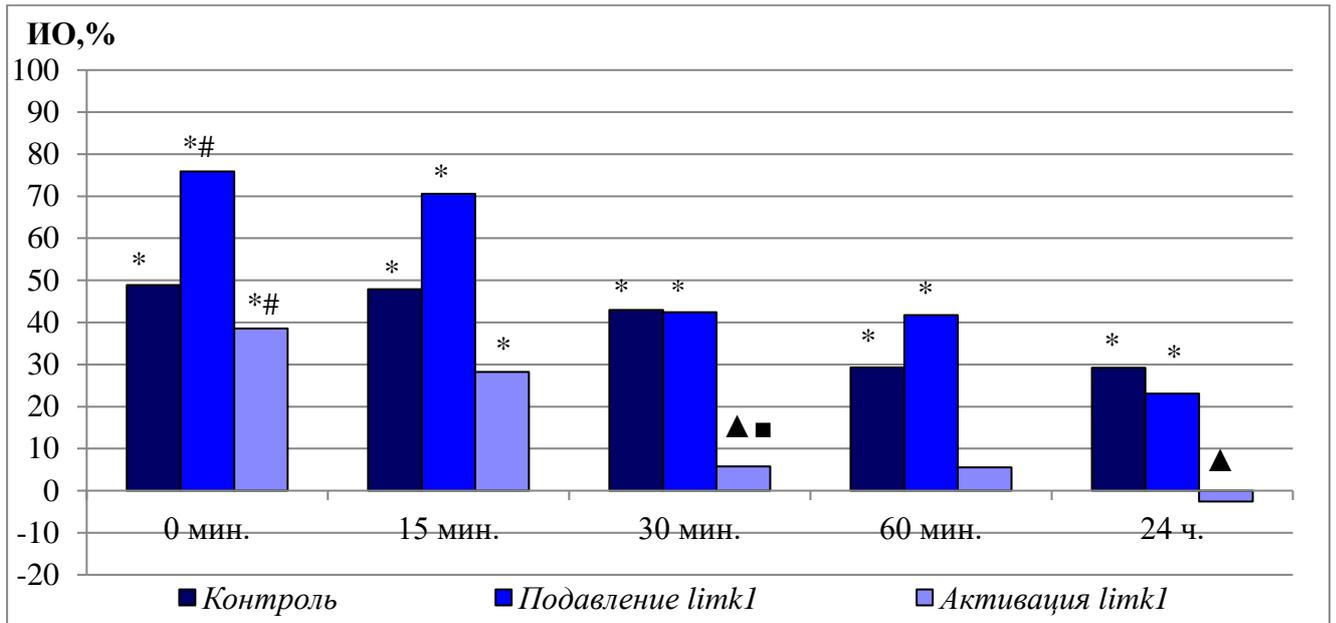


Рисунок 3.11. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, # - достоверно отличается от 24ч, ▲ - достоверно отличается от контроля, ■ - достоверно отличается от линии с подавлением *limk1* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

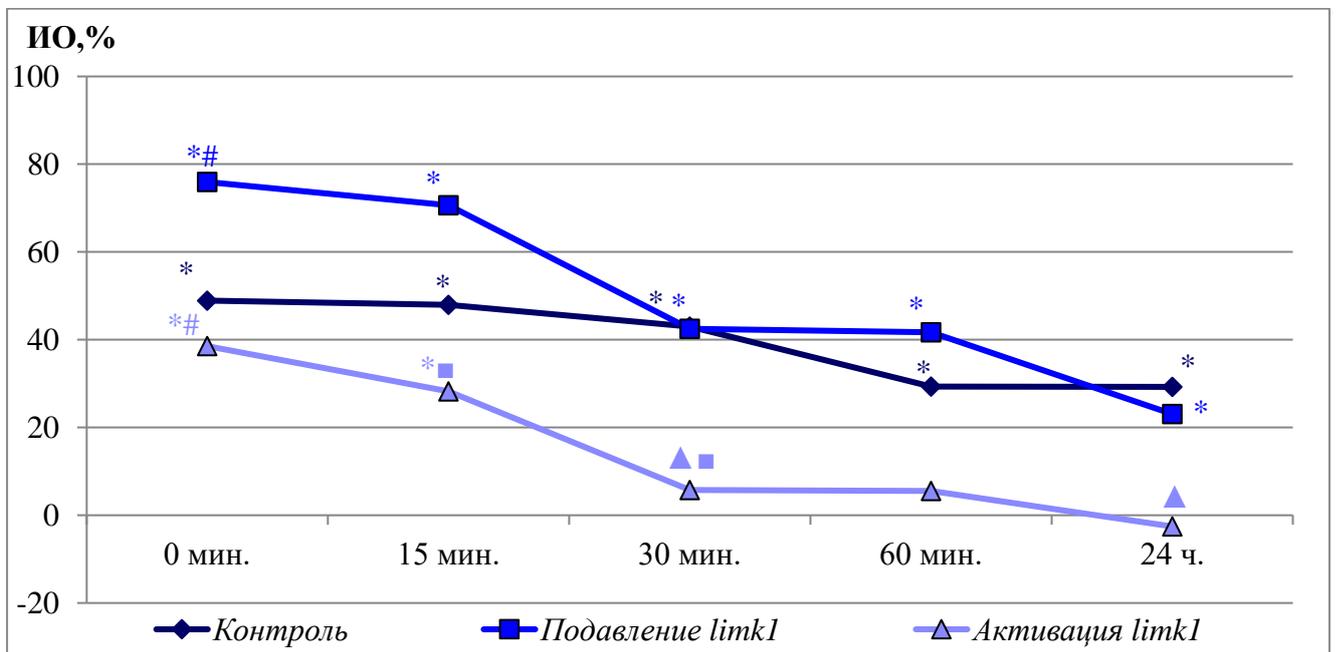


Рисунок 3.12. Динамика индексов обучения *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, # - достоверно отличается от 24ч, ▲ - достоверно 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 (Рисунок 3.13). 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 (Рисунок 3.14). Ацетилхолин может оказывать двоякое 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.

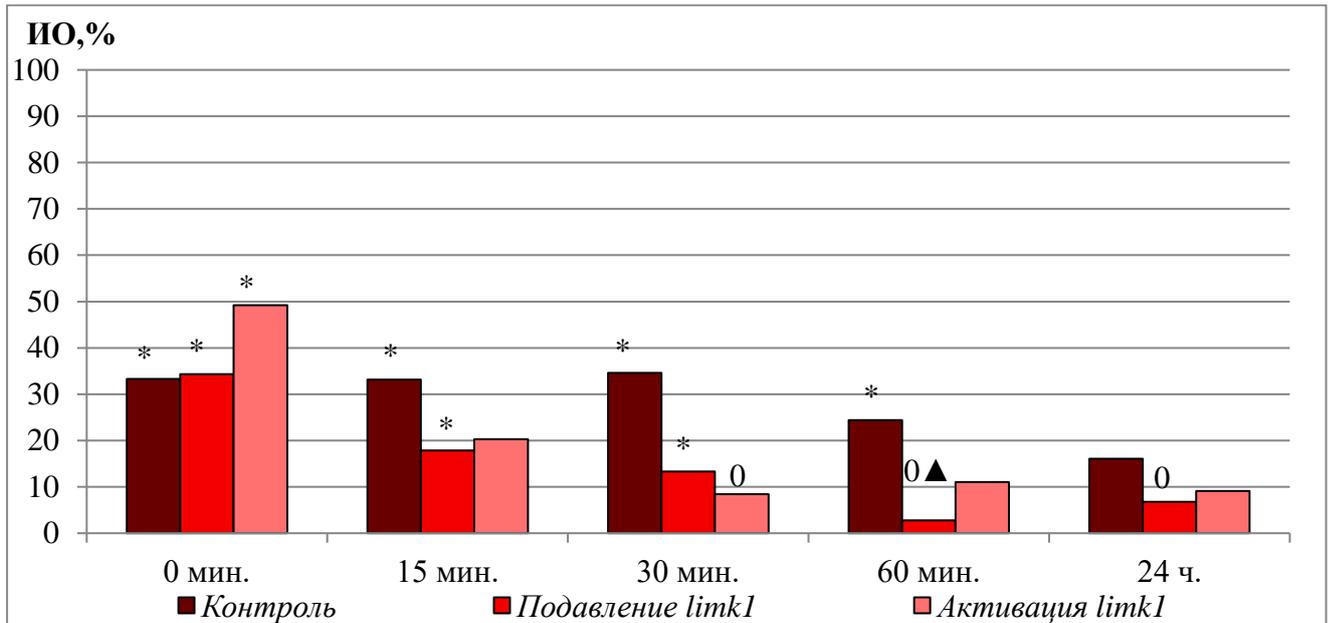


Рисунок 3.13. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, 0 - достоверно отличается от 0 мин, ▲ - достоверно отличается от контроля ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

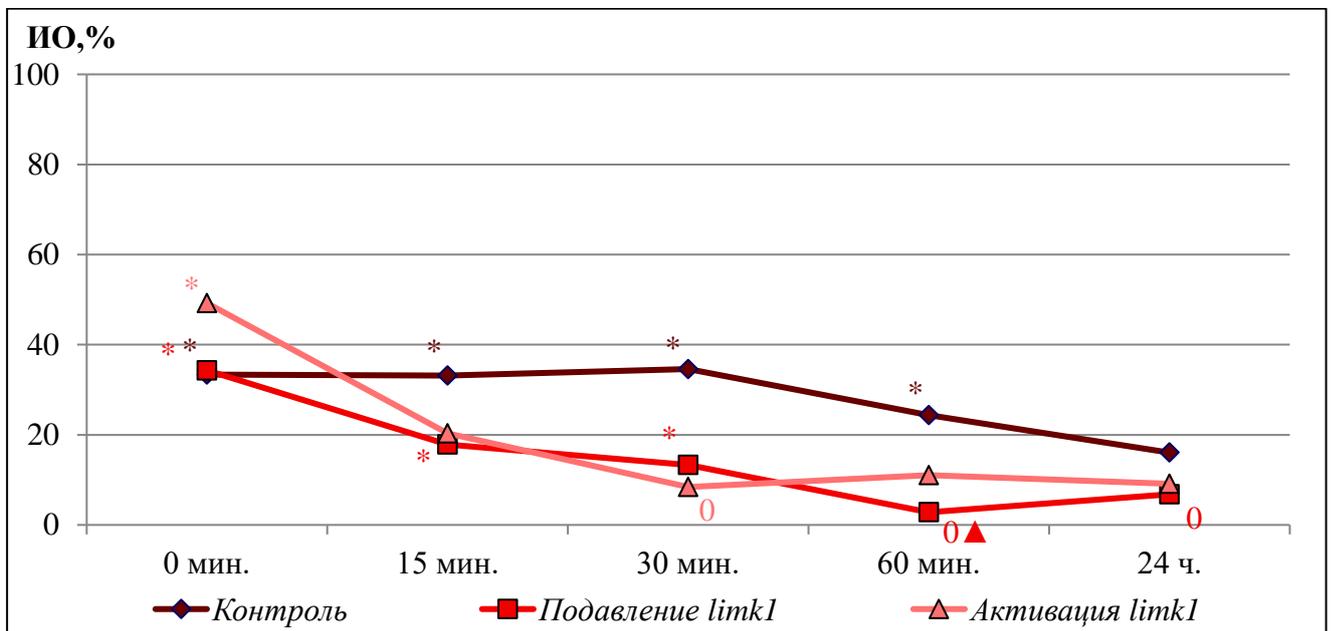


Рисунок 3.14. Динамика индексов обучения *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, 0 - достоверно отличается от 0 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 (Рисунок 3.15). 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 (Медведева и др., 2022).

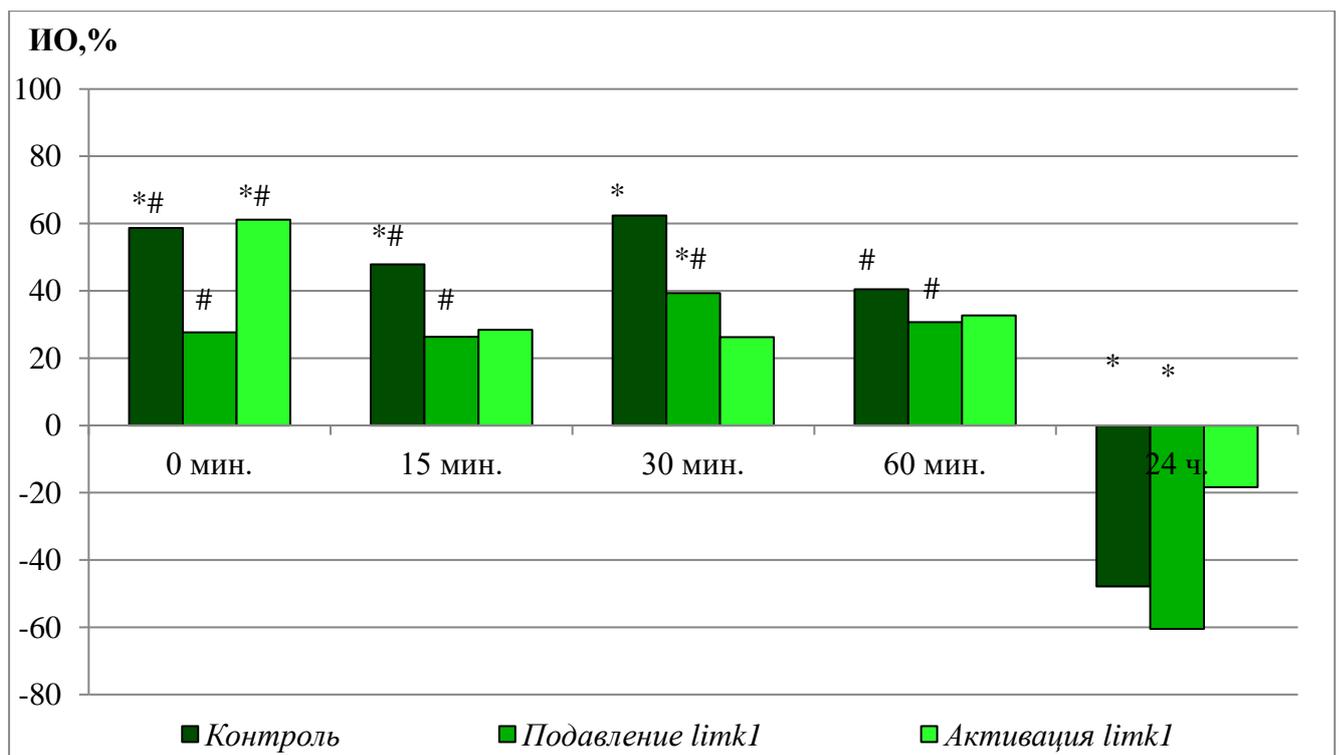


Рисунок 3.15. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, # - достоверно отличается от 24ч ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

Кривые забывания у мух всех трёх линий демонстрируют сходный характер (Рисунок 3.16). На протяжении 60 мин ИО сохраняется на относительно постоянном уровне, а через 24 ч после тренировки приобретает отрицательные значения.

Поскольку дофамин и серотонин являются важными нейромедиаторами для реализации процессов памяти, не удивительно 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).

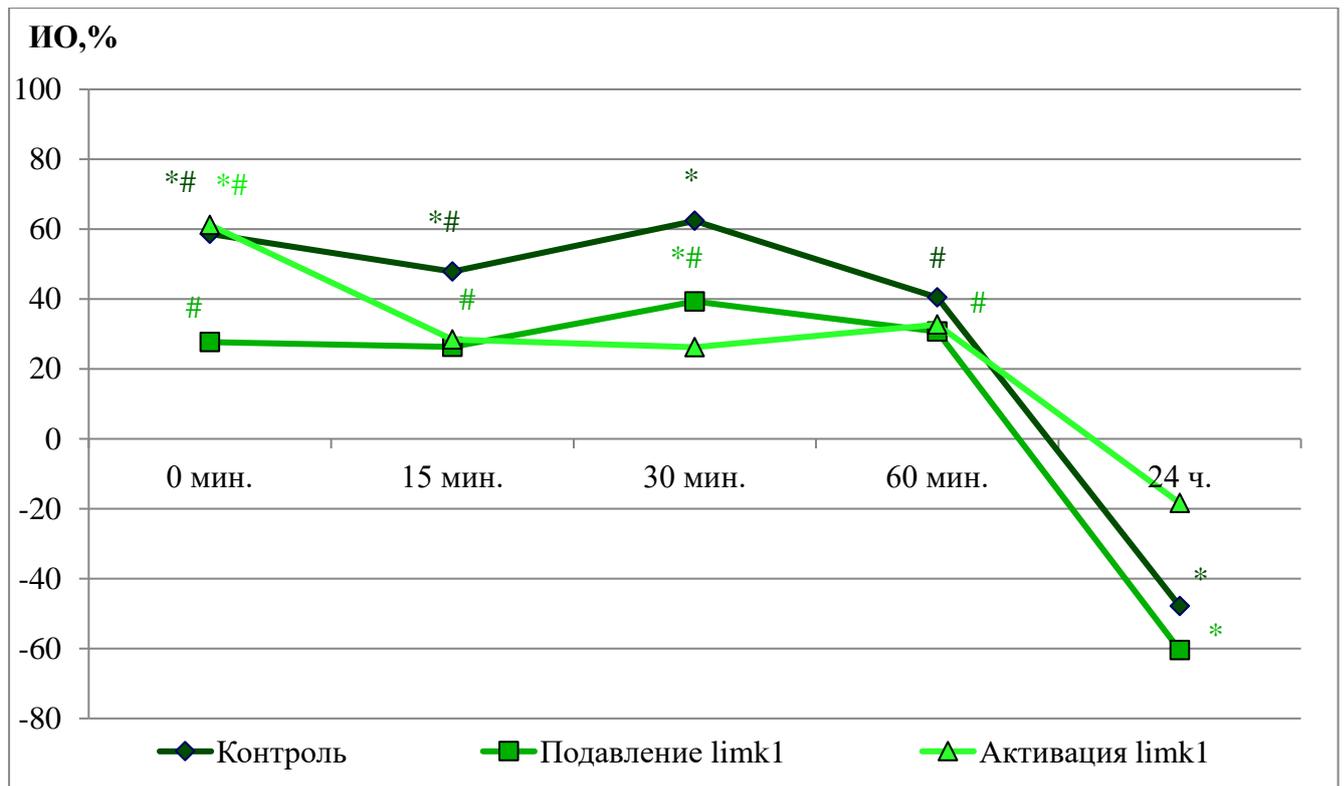


Рисунок 3.16. Динамика индексов обучения *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, #- достоверно 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 (Рисунки 3.17, 3.18). 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.

Нейроны *fruitless* регулируют поведение самцов во время ухаживания (Peng et al., 2021). После изменения экспрессии гена *limk1* активность ухаживания оставалась на высоком уровне (Приложение II), при этом наблюдали снижение интенсивности процессов забывания.

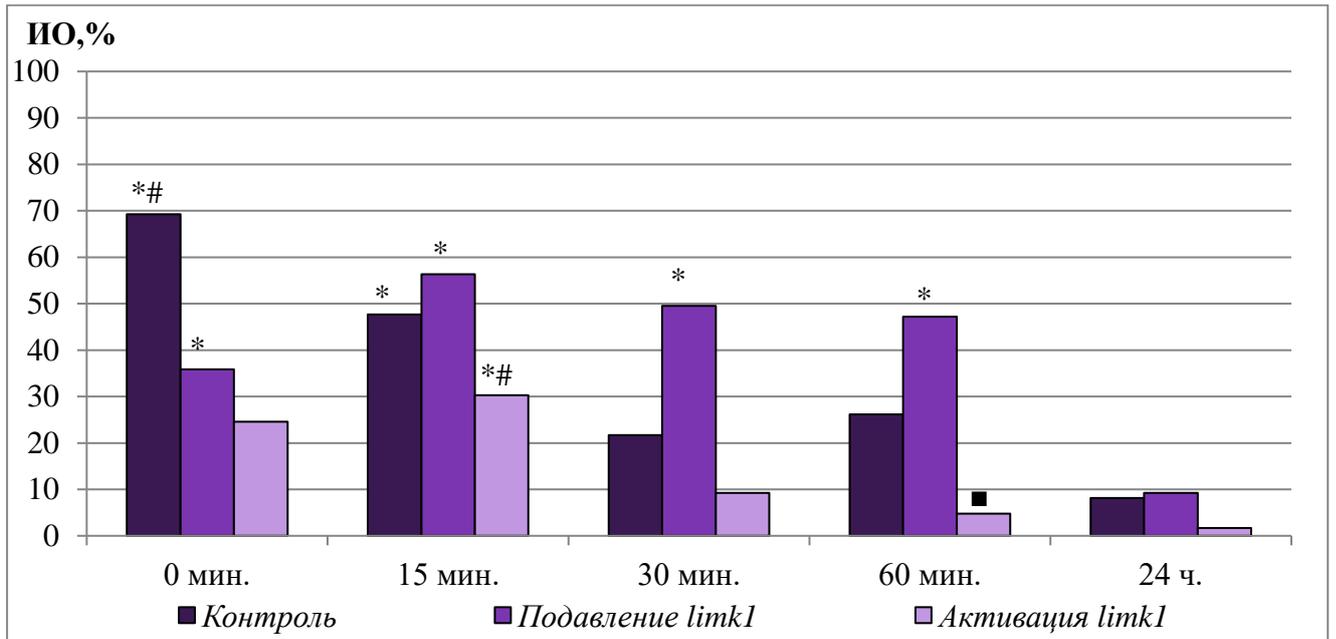


Рисунок 3.17. Индексы обучения *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, #- достоверно отличается от 24ч, ■ - достоверно отличается от линии с подавлением *limk1* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

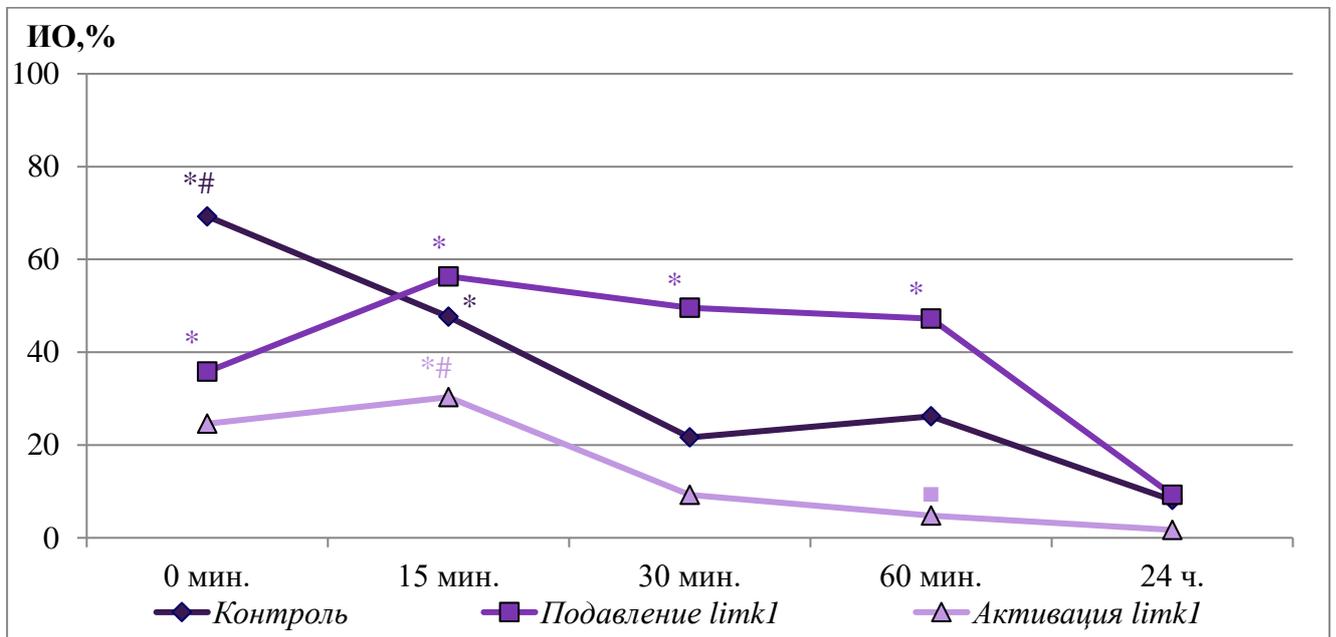


Рисунок 3.18. Динамика индексов обучения *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от нуля, #- достоверно отличается от 24ч, ■ - 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 (Zhuravlev et al., 2023, 2024).

3.2. Анализ экспрессии гена *limk1*

На рисунке 3.19 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.

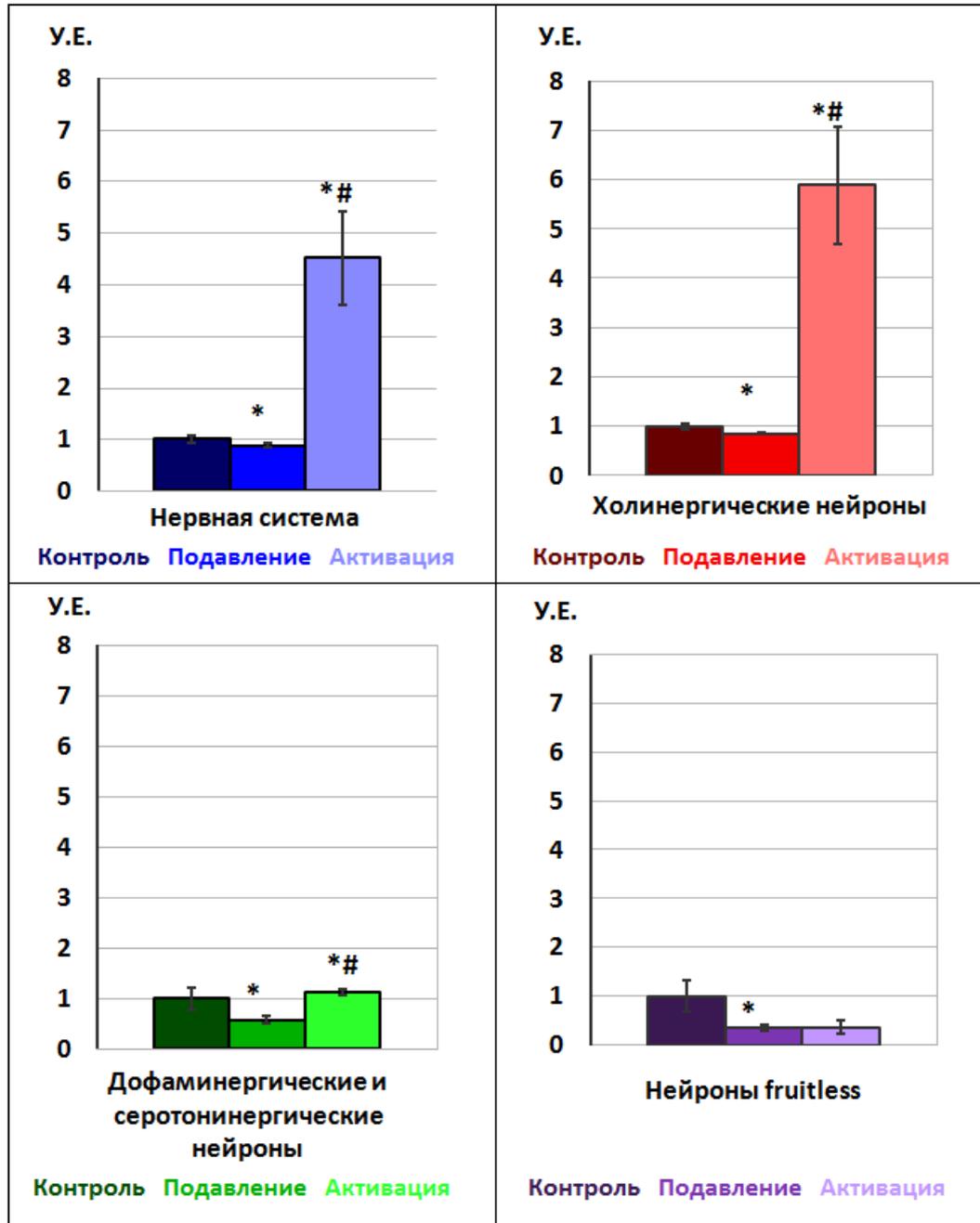


Рисунок 3.19. Сравнительный уровень РНК *limk1* в теле самцов дрозофилы линий GAL4-UAS с нейроспецифической регуляцией активности гена *limk1*. * - достоверно отличается от контроля, # - достоверно отличается от линии с подавлением *limk1* ($p \leq 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

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

3.3. 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. Известно, что LIMK1 локализуется как в телах нейронов, так и в глиальных клетках. Часть LIMK1-обогащенных клеточных тяжей окаймляет структуры нейропиля, в числе которых антеннальные доли, грибовидные тела, центральный комплекс, протоцеребрум и др. LIMK1 также содержится в области некоторых проводящих трактов, таких как большая комиссура в районе центрального комплекса и тракты, связывающие ганглии зрительных долей. (Никитина, 2015; Hartenstein, 2011; Savvateeva-Popova et al., 2000) 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.

Сравнение интенсивности флуоресценции в структурах мозга линии без изменения экспрессии *limk1* в нервной системе показало, что максимальные различия выявлены для β лопастей грибовидных тел и педункулюсов, а минимальные - для антеннальных долей. Анализ распределения белка LIMK1 в структурах мозга линии с подавлением экспрессии *limk1* в нервной системе выявил, что максимальные различия обнаружены для антеннальных долей и протоцеребруме, а минимальные - для α лопастей грибовидных тел и педункулюсов. Сопоставление интенсивности флуоресценции в структурах мозга линии с активацией экспрессии *limk1* в нервной системе показало, что максимальные различия выявлены для эллипсоидного тела и педункулюсов, а минимальные - для α , β и γ лопастей грибовидных тел (Таблица 1 в Приложении IV).

Распределение LIMK1 в мозге имаго дрозофилы с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе представлено на рисунке 3.20.

Сравнительный анализ распределения белка LIMK1 в аналогичных структурах мозга у линии с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе показал, что у линии с подавлением *limk1* интенсивность флуоресценции в протоцеребрах, γ лопастях грибовидных тел и эллипсоидном теле была достоверно ниже, чем в контроле (Рисунок 3.21). У линии с активацией интенсивность флуоресценции в β лопастях грибовидных тел была достоверно выше, чем в контроле и у линии с подавлением. Других достоверных отличий не было выявлено.

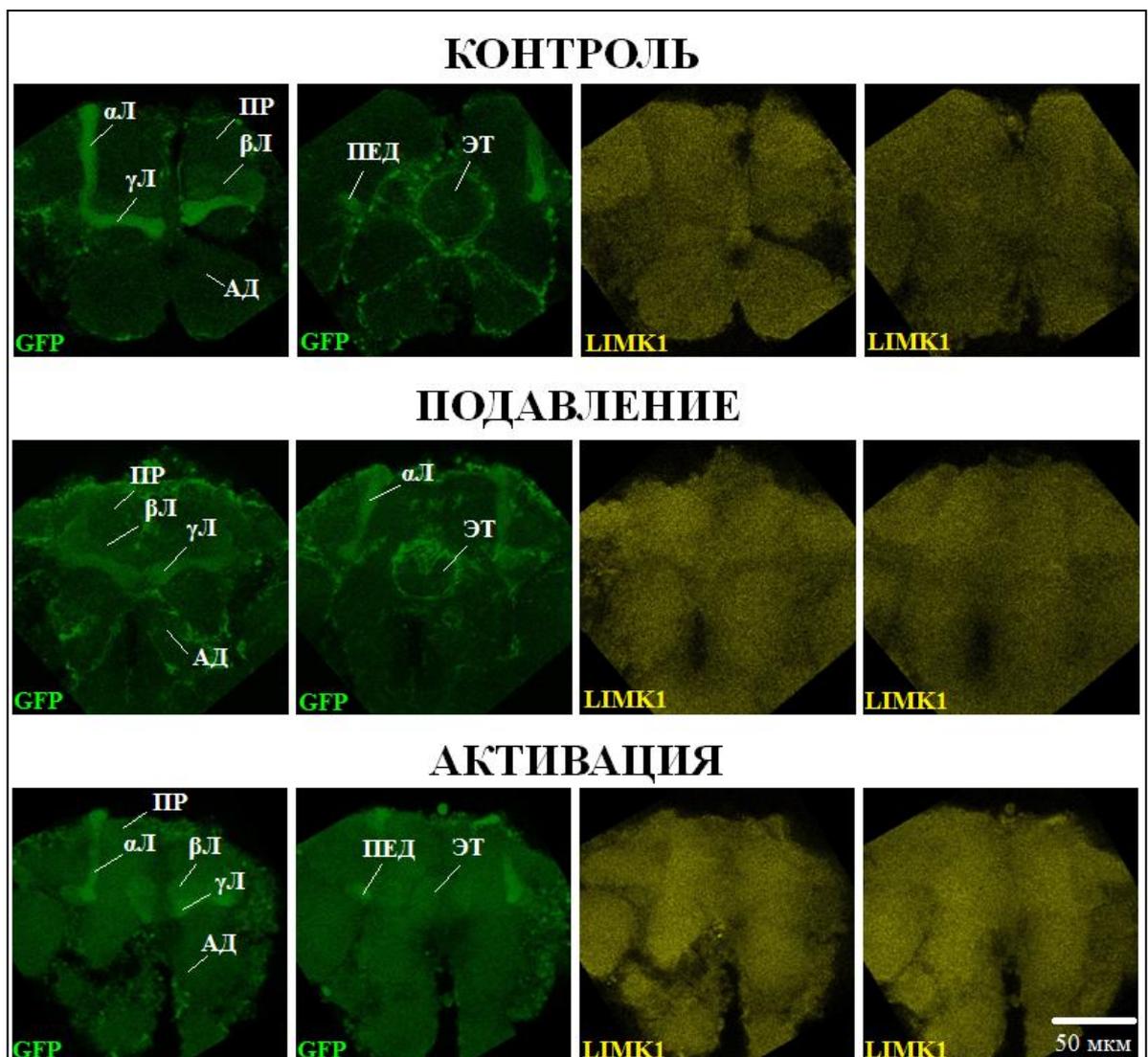


Рисунок 3.20. Распределение LIMK1 в мозге имаго дрозофилы с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе. Зеленый цвет – GFP, жёлтый цвет – LIMK1. АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γ Л – γ лопасти грибовидных тел, β Л – β лопасти грибовидных тел, α Л – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПЕД – педункулоусы.

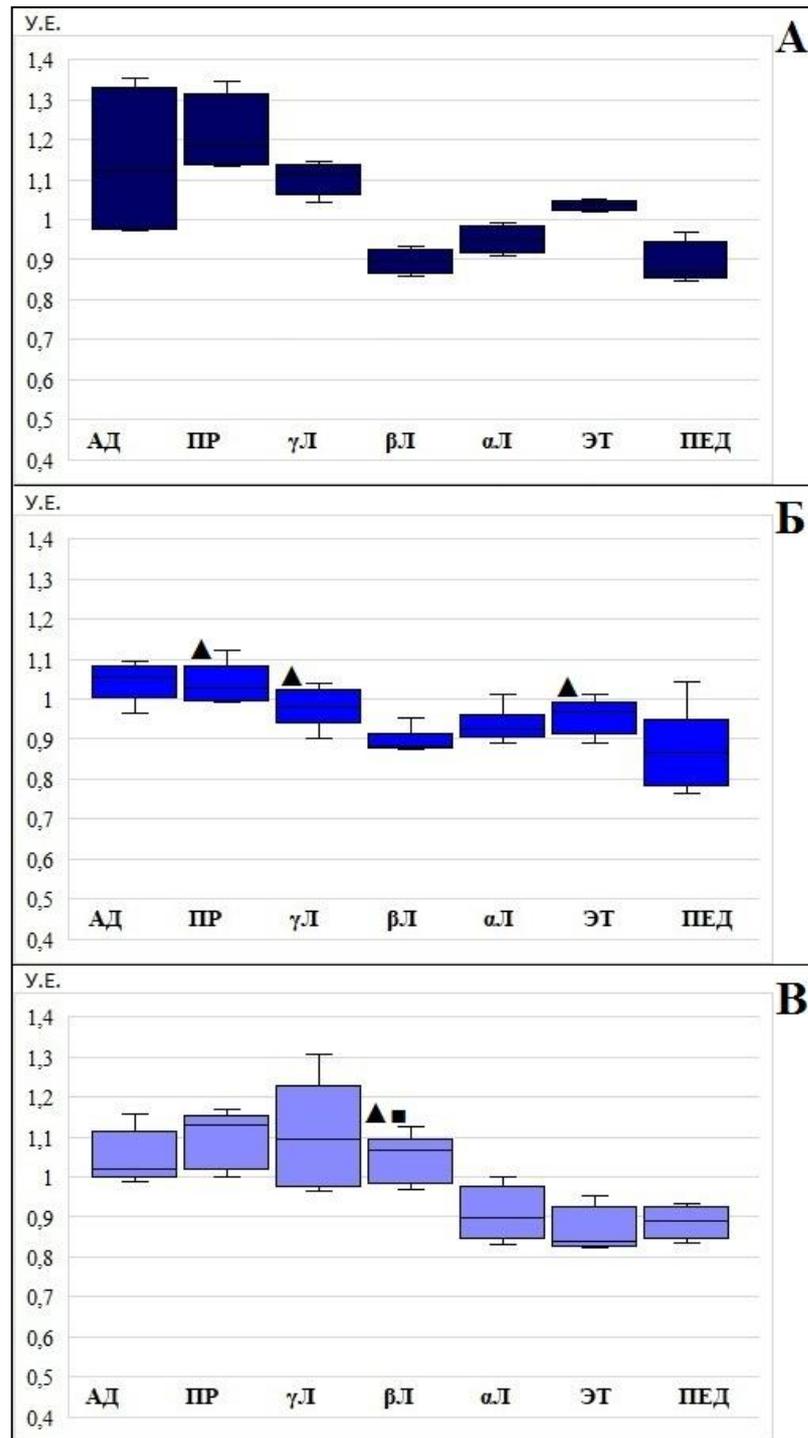


Рисунок 3.21. Анализ распределения LIMK1 в различных структурах мозга *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе. А – контроль, Б – подавление, В – активация. АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γ Л – γ лопасти грибовидных тел, β Л – β лопасти грибовидных тел, α Л – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПЕД – педункулы. \blacktriangle - достоверно отличается от контроля, \blacksquare - достоверно отличается от подавления *limk1* ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Сравнение интенсивности флуоресценции в структурах мозга линии без изменения экспрессии *limk1* в холинергических нейронах показало, что максимальные различия выявлены для антеннальных долей, β лопастей грибовидных тел и эллипсоидного тела, а минимальные - для γ лопастей грибовидных тел и протоцеребрумов. Анализ распределения белка LIMK1 в структурах мозга линии с подавлением экспрессии *limk1* в холинергических нейронах выявил, что максимальные различия обнаружены для эллипсоидного тела, а минимальные - для α лопастей грибовидных тел. Сопоставление интенсивности флуоресценции в структурах мозга линии с активацией экспрессии *limk1* в холинергических нейронах показало, что максимальные различия выявлены для антеннальных долей, а минимальные - для протоцеребрума и педункулюсов (Таблица 2 в Приложении IV).

Распределение LIMK1 в мозгу имаго дрозофилы с изменением экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах представлено на рисунке 3.22

Сравнительный анализ распределения белка LIMK1 в аналогичных структурах мозга у линии 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 (Рисунок 3.23). Других достоверных отличий не было выявлено.

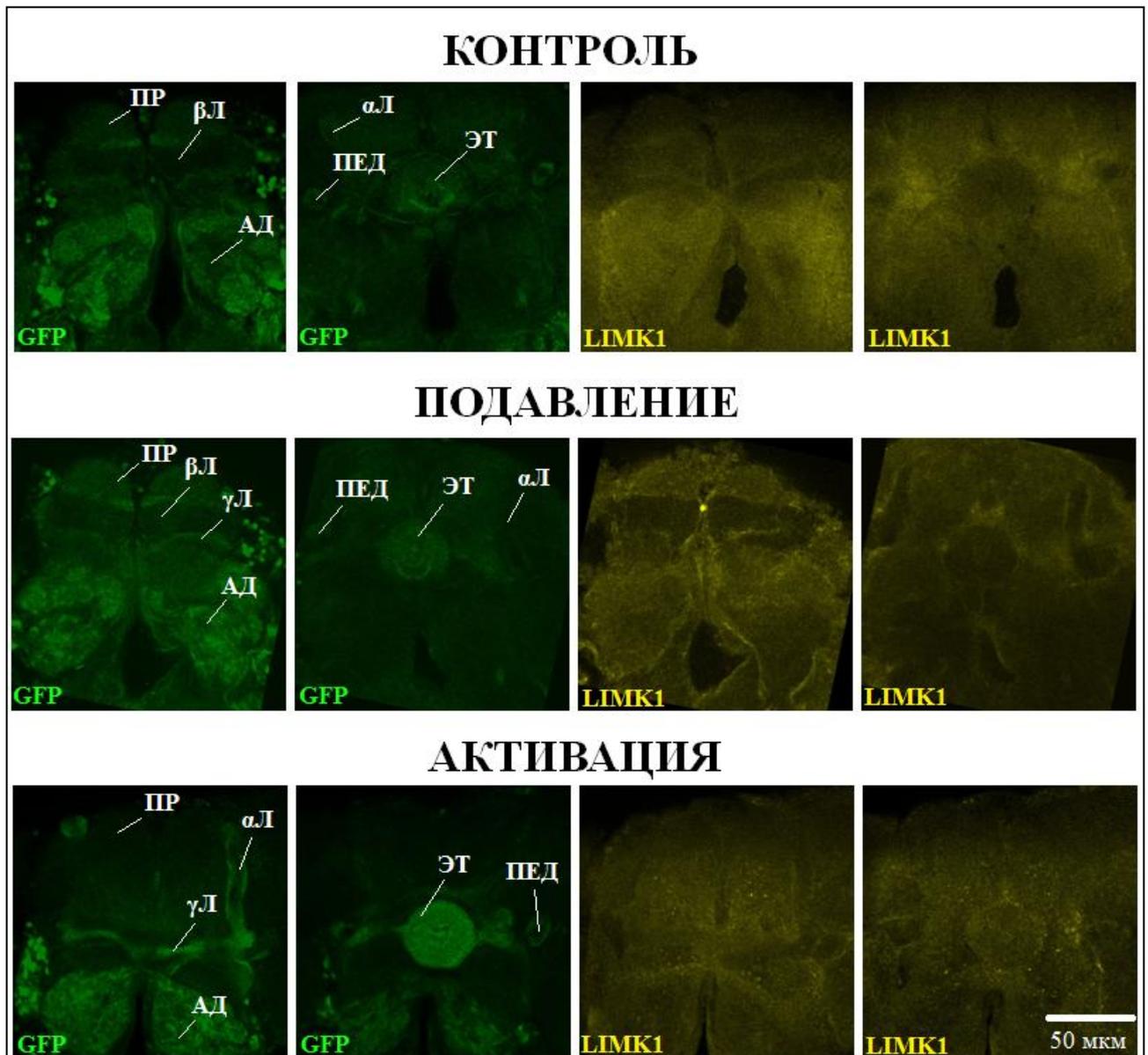


Рисунок 3.22. Распределение LIMK1 в мозге имаго дрозофилы с изменением экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах. Зеленый цвет – GFP, жёлтый цвет – LIMK1. АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γ Л – γ лопасти грибовидных тел, β Л – β лопасти грибовидных тел, α Л – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПЕД – педункулюсы.

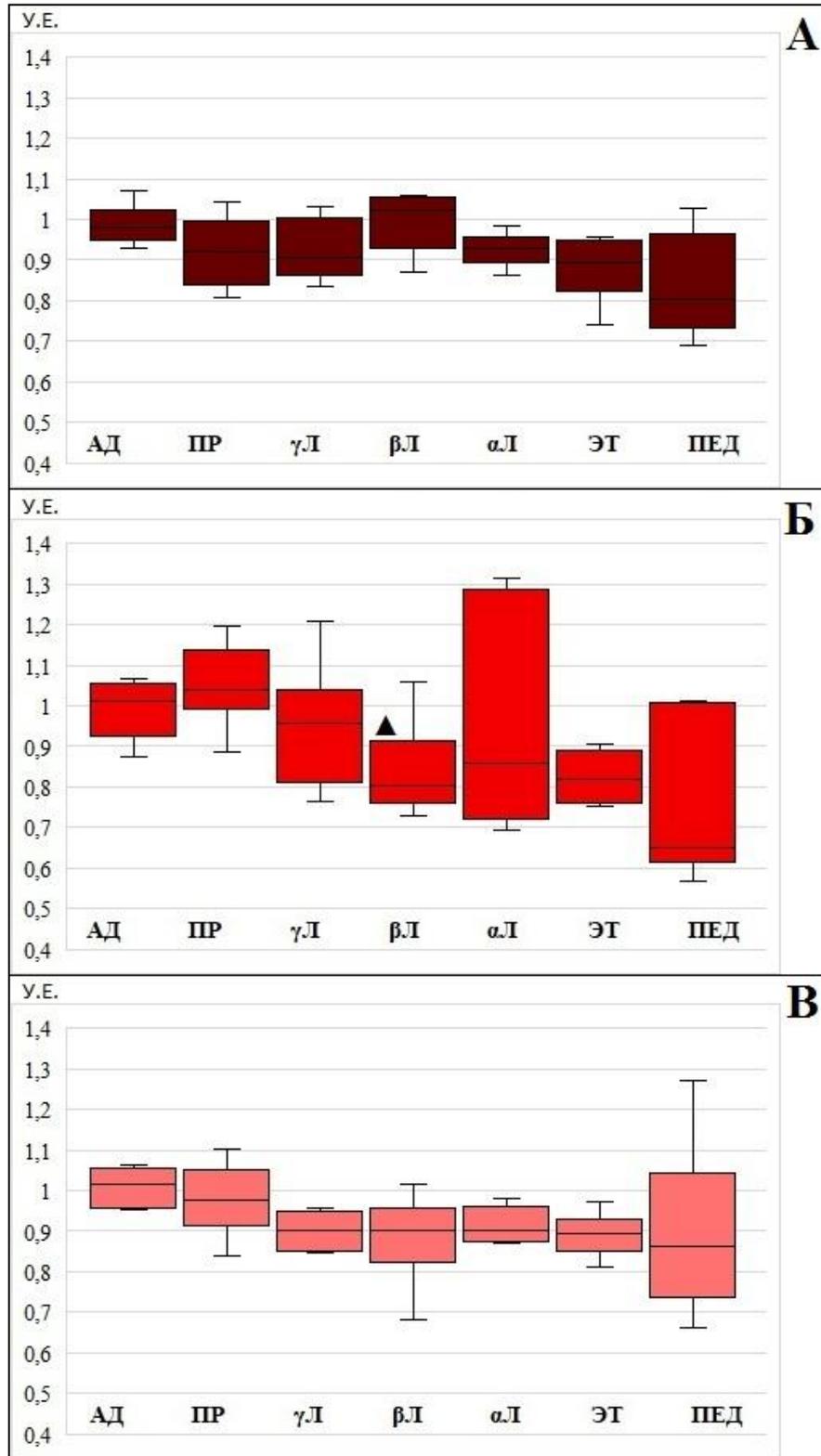


Рисунок 3.23. Анализ распределения LIMK1 в различных структурах мозга *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах. А – контроль, Б – подавление, В – активация. АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γ Л – γ лопасти грибовидных тел, β Л – β лопасти грибовидных тел, α Л – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсовидное тело, ПЕД – педункулюсы. ▲ - достоверно отличается от контроля ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Сравнение интенсивности флуоресценции в структурах мозга линии без изменения экспрессии *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах не выявило достоверных отличий в разных структурах мозга. Анализ распределения белка LIMK1 в структурах мозга линии с подавлением экспрессии *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах показал, что максимальные различия выявлены для антеннальных долей, а минимальные - для β и γ лопастей грибовидных тел, протоцеребрума и эллипсоидного тела. Сопоставление интенсивности флуоресценции в структурах мозга линии с активацией экспрессии *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах выявило, что максимальные различия обнаружены для педункулюсов, а минимальные - для антеннальных долей (Таблица 3 в Приложении IV).

Распределение LIMK1 в мозге имаго дрозофилы с изменением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах представлено на рисунке 3.24.

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 (Рисунок 3.25). Других достоверных отличий не было выявлено.

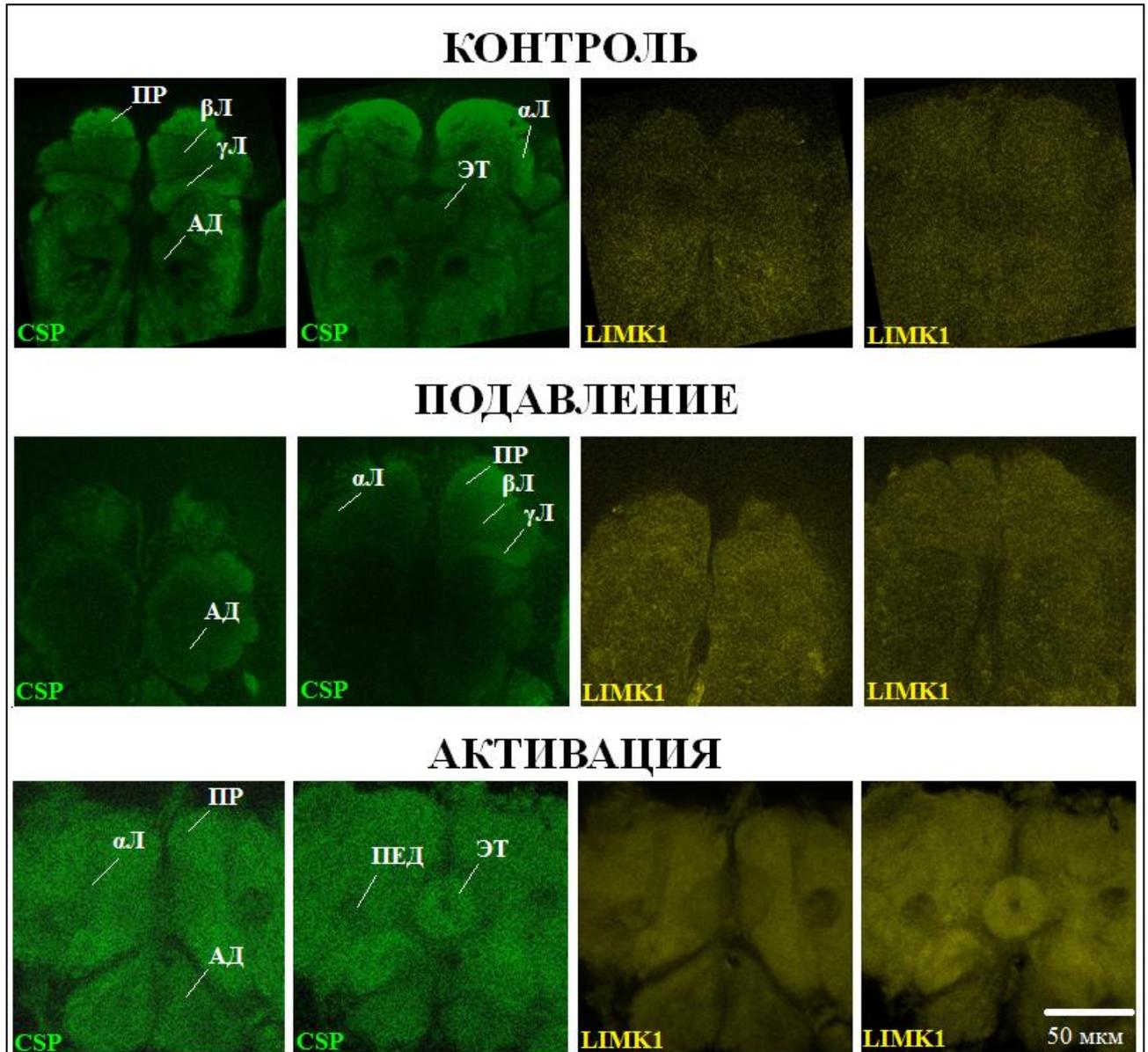


Рисунок 3.24. Распределение LIMK1 в мозге имаго дрозофилы с изменением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах. Зеленый цвет – CSP, жёлтый цвет – LIMK1. АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γ Л – γ лопасти грибовидных тел, β Л – β лопасти грибовидных тел, α Л – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПЕД – педункулюсы.

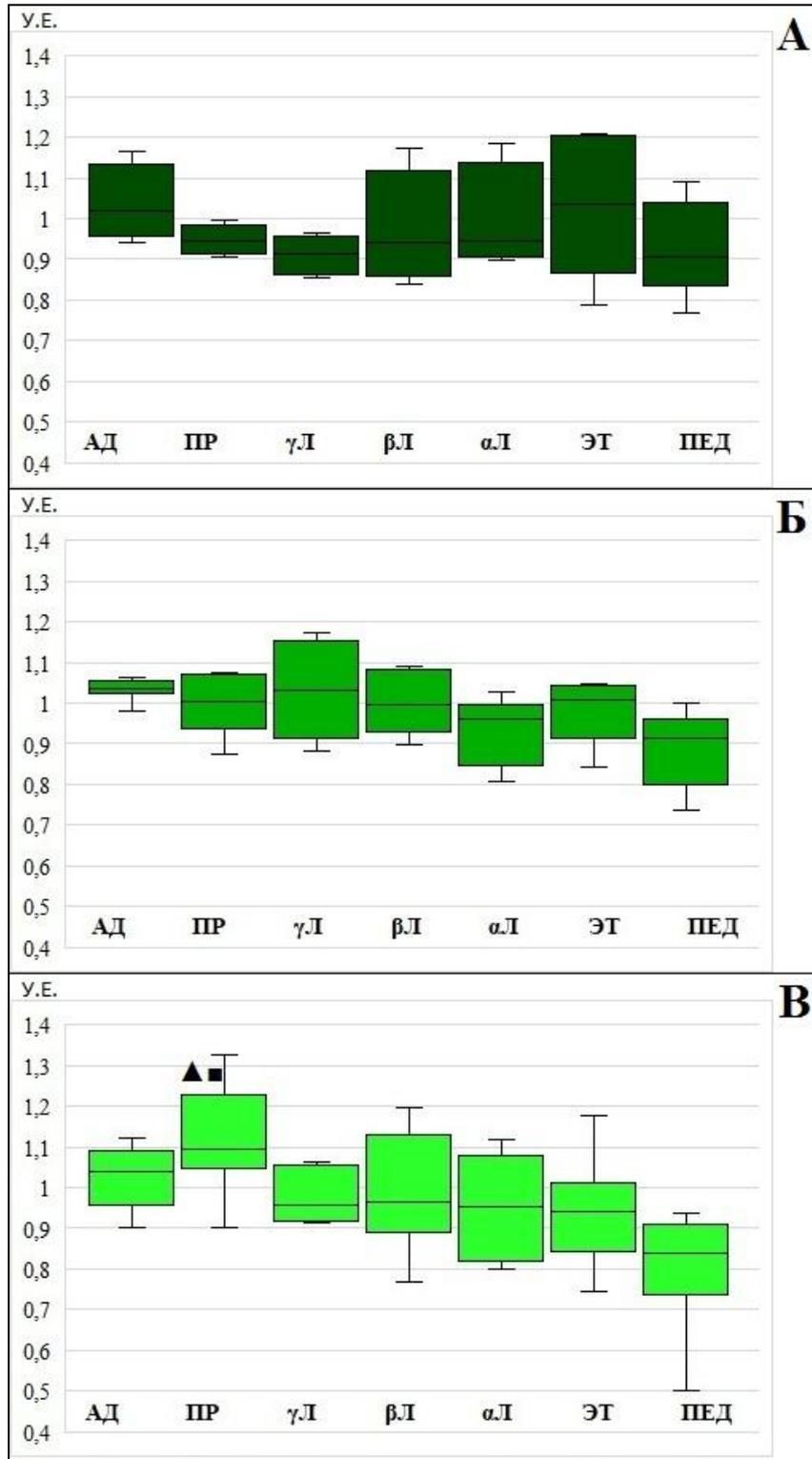


Рисунок 3.25. Анализ распределения LIMK1 в различных структурах мозга *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в серотонинергических и дофаминергических нейронах. А – контроль, Б – подавление, В – активация. АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γ Л – γ лопасти грибовидных тел, β Л – β лопасти грибовидных тел, α Л – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПЕД – педункулюсы. \blacktriangle - достоверно отличается от контроля, \blacksquare - достоверно отличается от подавления *limk1* ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Сравнение интенсивности флуоресценции в структурах мозга линии без изменения экспрессии в нейронах *fruitless* показало, что максимальные различия выявлены для педункулюсов и α лопастей грибовидных тел, а минимальные - для эллипсоидного тела. Анализ распределения белка LIMK1 в разных структурах мозга у линий с подавлением и активацией гена *limk1* в нейронах *fruitless* не выявил достоверных отличий (Таблица 4 в Приложении IV).

Распределение LIMK1 в мозге имаго дрозофилы с изменением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless* представлено на рисунке 3.26.

Сравнительный анализ распределения белка LIMK1 в аналогичных структурах мозга 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 (Рисунок 3.27). Других достоверных отличий не было выявлено.

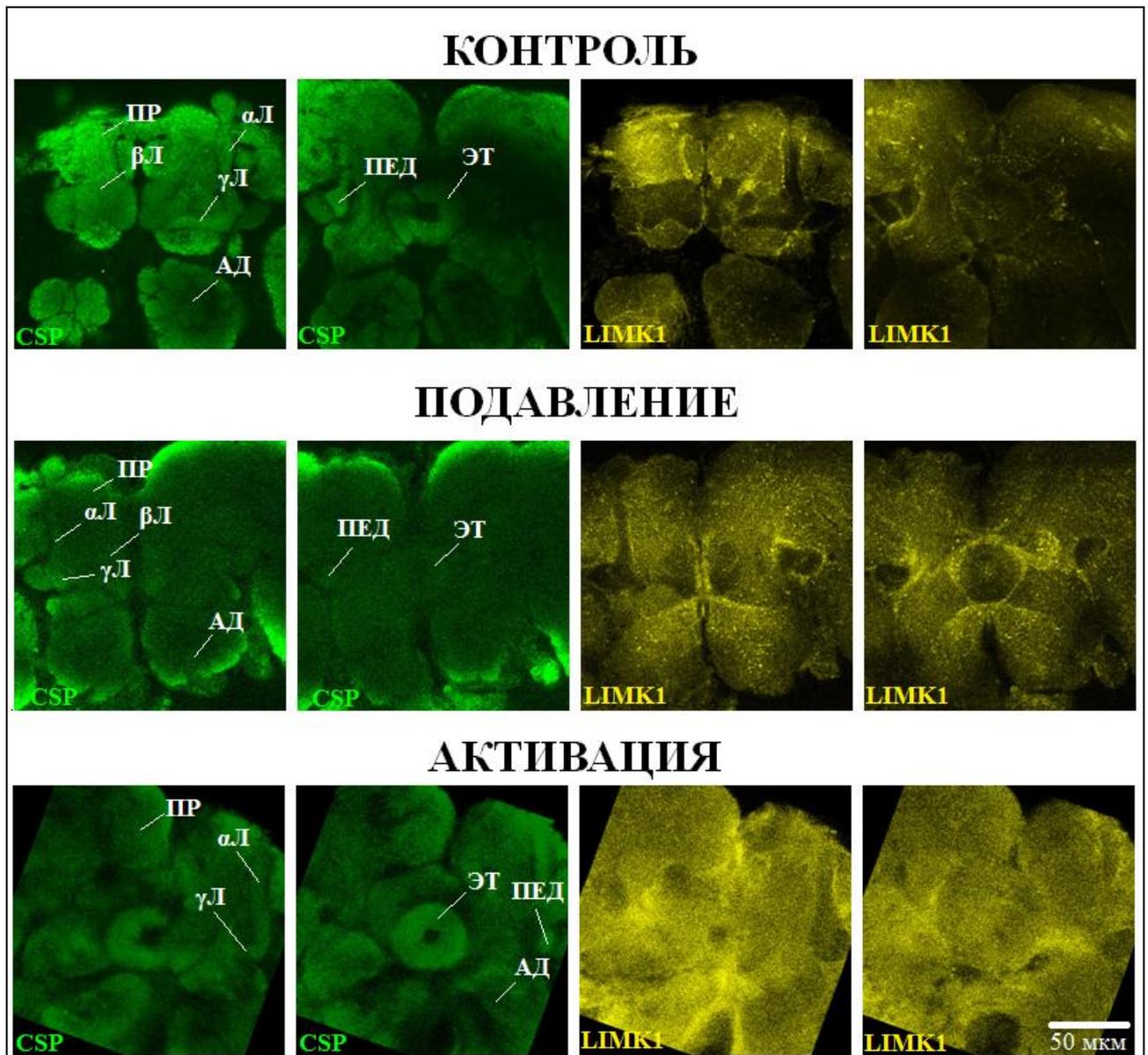


Рисунок 3.26. Распределение LIMK1 в мозге имаго дрозофилы с изменением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless*. Зеленый цвет – CSP, жёлтый цвет – LIMK1. АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γ Л – γ лопасти грибовидных тел, β Л – β лопасти грибовидных тел, α Л – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПЕД – педункулюсы.

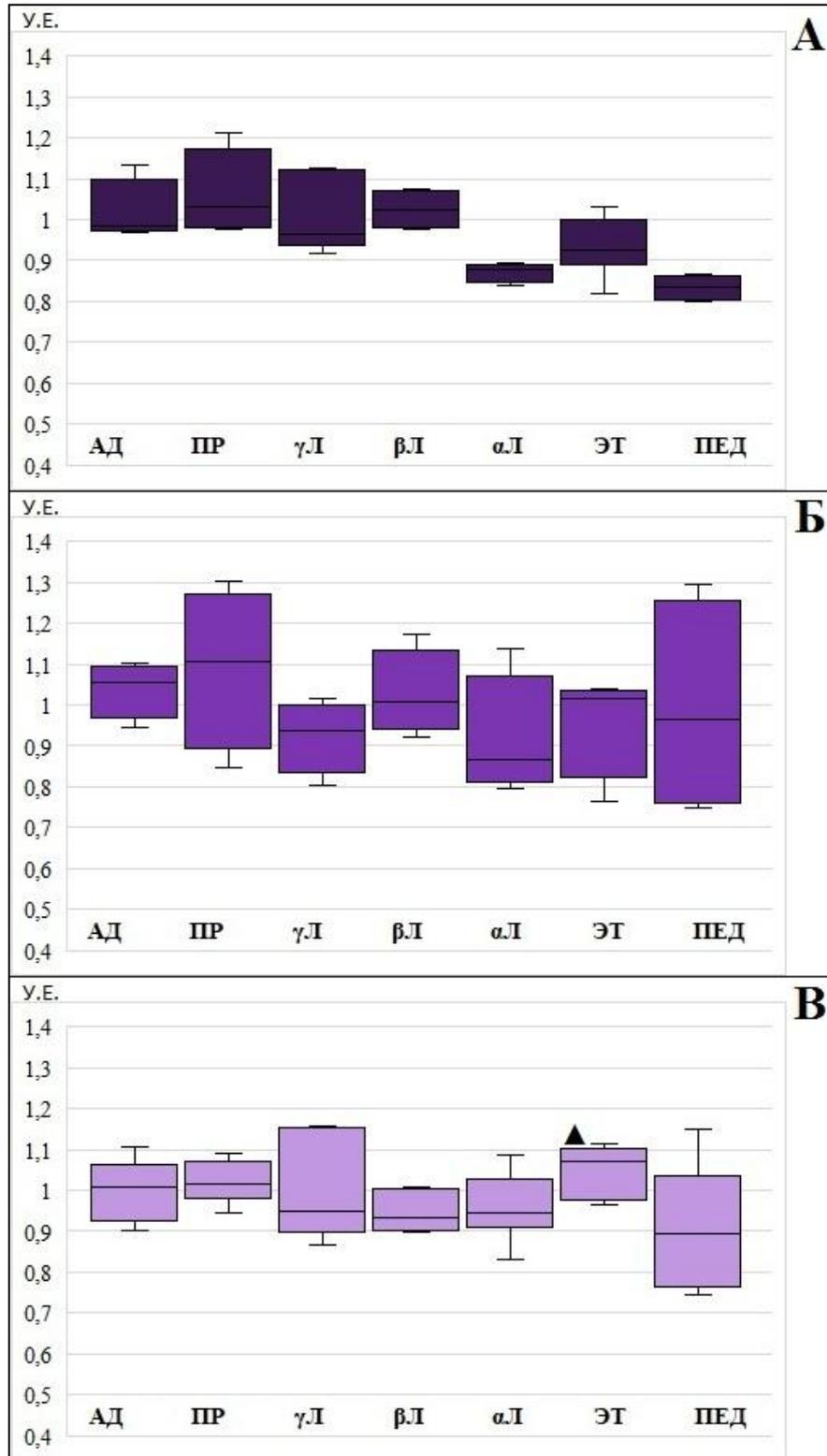


Рисунок 3.27. Анализ распределения LIMK1 в различных структурах мозга *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless*. А – контроль, Б – подавление, В – активация. АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γ Л – γ лопасти грибовидных тел, β Л – β лопасти грибовидных тел, α Л – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПЕД – педункулосы. ▲ - достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Таким образом, проанализировав данные по распределению белка LIMK1 в разных структурах мозга у исследуемых линий, можно выделить следующую общую закономерность: наиболее высокие значения интенсивности флуоресценции белка характерны для антеннальных долей и протоцеребрума, а наиболее низкие - для педункулюсов (Zhuravlev et al., 2023, 2024).

3.4. Обсуждение результатов

В нервной системе процессы обучения и забывания конкурируют друг с другом. Особый интерес представляет забывание, внутренне присущее мозгу, поскольку оно действует одновременно с приобретением памяти, предотвращая закрепление неспецифических следов памяти. Есть предположение, что за стирание воспоминаний у дрозофилы специфически отвечает LIMK1-зависимый сигнальный каскад, вовлекающий также р-кофилин, поскольку в литературе нет данных о его положительном влиянии на память. Несбалансированность этих процессов может значительно ухудшить когнитивные способности животного. (Davis, Zhong, 2017; Richards, Frankland, 2017). В этой связи крайне интересно проследить динамику забывания у линий, проявляющих полиморфизм по гену *limk1*.

Как и при анализе забывания в парадигме обучения с негативным подкреплением электрошоком (Shuai et al., 2010), для оценки активности процессов забывания в парадигме подавления ухаживания необходимо учитывать скорость снижения ИО на некотором временном интервале X после тренировки. Если у двух линий дрозофилы (1 и 2) ИО непосредственно после тренировки одинаковы, можно говорить о том, что обе линии обучаются одинаково хорошо. В данном случае это линии *Canton-S* и *Berlin*. Если при этом кривая ИО для линии 1 на интервале X лежит ниже кривой ИО для линии 2, можно заключить, что угасание памяти у линии 1 происходит быстрее, т.е. процесс активного забывания выражен сильнее. Таким образом, интенсивность процессов забывания

определяется не абсолютными величинами ИО в каждый момент времени, а динамикой (скоростью) его изменения. При этом, если у линии 1 ИО в начале и в конце периода X выше, чем у линии 2, а углы наклона кривых одинаковы, можно заключить, что линия 2 обучается хуже, но активность процесса забывания у нее не отличается от таковой у линии 1.

Необходимо помнить, что стрессорные воздействия могут как вызывать нарушения процессов обучения и памяти, так и приводить к их восстановлению. Так, ранее было показано влияние теплового шока на процессы обучения. Воздействие теплового шока улучшает способность к обучению мутанта дрозофилы *agn^{ts3}*, у которого в норме такая способность нарушена (Никитина и др., 2014а). У мух *Volado*, представляющих собой модель слабоумия, у которых обнаружен дефицит молекулы синаптической адгезии α -интегрин, тепловой шок также восстанавливал память (Hooper et al., 2016). У линии *cardinal*, несущей мутацию, нарушающую синтез фермента феноксазиносинтетазы, что приводит к накоплению 3-гидроксикинуруенина, вызывающего окислительный стресс и нейродегенерацию, при воздействии тепловым шоком наблюдали нарушения формирования среднесрочной памяти (Zhuravlev et al., 2022). Это демонстрирует сложность и многогранность клеточных механизмов, вовлеченных в реализацию процессов памяти, которые могут быть модифицированы действием теплового шока. Наше исследование продемонстрировало его влияние и на процессы забывания.

У линии *Canton-S* тепловой шок привёл к достоверному снижению ИО спустя сутки после тренировки в 11 раз, в то время как в интактном контроле ИО за то же время снизился лишь в 2 раза, и отличия были недостоверны. Можно полагать, что тепловой шок у линии *Canton-S* интенсифицирует забывание. При этом стоит отметить сохранение памяти у мух данной линии даже спустя 24 часа после 30-минутной тренировки. Очевидно, этого времени недостаточно для формирования долгосрочной памяти, поэтому можно предположить, что столь высокий уровень памяти в данной точке связан с изменением процессов

забывания. Данное предположение подтверждается ранее проведёнными исследованиями, выявившими, что для формирования долгосрочной памяти тренировка должна проводиться либо продолжительностью 5 часов, либо серией из 3 тренировок продолжительностью по 1 часу каждая, с перерывами 30-60 минут (Каминская и др., 2015; McBride et al., 1999).

У мух линии *Berlin* динамика забывания несколько отлична от *Canton-S*. Так, изначальные уровни ИО у мух обеих линий довольно близки, но у линии *Berlin* без воздействия уже спустя 15 минут после тренировки ИО резко снижается, а уже через сутки достоверно отличается от уровня сразу после тренировки, чего не было выявлено у линии *Canton-S* без воздействия. Интересно, что у *Berlin* ранее была показана дефектность долгосрочной памяти (Каминская и др., 2015). При этом тепловой шок не оказывает значимого влияния на динамику ИО: кривые забывания сходны у мух с воздействием и без воздействия, однако он полностью устраняет отличия от *Canton-S*. Возможно, эффект ТШ в случае линии *Berlin* связан не с процессами забывания, а с интенсификацией процессов формирования памяти.

Мухи линий *Oregon-R* и *agn^{ts3}* имели низкие уровни ИО, достоверно отличимые от *Canton-S* на всех временных интервалах. Действие теплового шока не оказало значимого влияния на *Oregon-R*: уровни ИО после воздействия всё ещё имели низкие значения. Тепловой шок устранил отличия от *Canton-S*, но только в точках 60 минут и 24 часа. Также тепловой шок оказал небольшое влияние на динамику изменения ИО: спустя 24 часа после тренировки ИО принял отрицательное значение. Однако достоверных различий между точками и от интактного контроля выявлено не было. В то же время на линию *agn^{ts3}* тепловой шок оказал существенное влияние: низкие значения ИО после воздействия сменились высокими, достоверно не отличимыми от *Canton-S*. Таким образом, тепловой шок устранил драматические отличия мутантной линии от линии дикого типа и восстановил уровень ИО, присущий в норме *Canton-S*. При действии теплового шока наблюдается перемещение комплекса LIMK1 – кофилин –актин в

ядро (Савватеева-Попова и др., 2004). Возможно, именно это служит одной из причин избирательного запуска транскрипции и, следовательно, изменения функционирования генома, что в конечном итоге приводит к восстановлению способности к обучению и формированию. Кроме того, стоит отметить, что спустя 24 часа после тренировки ИО у мух линии *agn^{ts3}* оставался практически на таком же уровне, что и сразу после тренировки, это говорит о том, что динамика изменения памяти выражена слабо.

Полученные нами данные, безотносительно к тому, насколько у каждой линии изменена активность LIMK1 и последовательности кодирующего ее гена, служат призывом к критическому осмыслению приводимых в литературе результатов об обучении/забывании. Следует учитывать, что 1) большинство маркеров и балансирных линий у дрозофилы получены на генетическом фоне линии *Oregon-R*; 2) высоко оправдано использование в качестве контрольной линии *Berlin*; 3) линия *Canton-S* не всегда сопоставима в поведенческих экспериментах с линией *Berlin*, но в данном случае заслуживает пристального внимания, так как температурочувствительная мутация *agn^{ts3}* была индуцирована этилметансульфонатом (ЭМС) в линии *Canton-S*, то есть имела и имеет генетический фон *Canton-S*. Также важно помнить, что упомянутые линии дикого типа широко используются в генетических исследованиях, поддерживаются в различных лабораториях по всему миру на протяжении многих десятилетий и могут накапливать различные мутации и/или подвергаться дрейфу генов, в результате чего могут отличаться по признакам, анализируемым в данной работе. Поэтому сравнения показателей обучения/забывания высоко оправданы именно в этом случае.

Немаловажен вопрос, в каких структурах мозга и/или типах клеток LIMK1-зависимый сигнальный каскад регулирует забывание. В парадигме ольфакторного обучения забывание индуцируется Ras и p-кофилином в нейронах грибовидных тел (Shuai et al., 2010). Путь Rac1–SCAR/WAVE–Dia в γ клетках Кеньона грибовидных тел активирует забывание в случае краткосрочной памяти,

чувствительной к анестезии, тогда как путь Cdc42-WASp-Arp2/3 стирает память, устойчивую к анестезии (Gao et al., 2019). $\gamma 5$ клетки Кеньона непосредственно участвуют в формировании памяти, связанной с уходом (Keleman et al., 2012). Выходящие тракты γ лопастей участвуют в формировании КСП, в то время как α/β лопастей участвуют в формировании долгосрочной памяти (Redt-Clouet et al., 2012). Таким образом, разумно предположить, что активация LIMK1 в γ и α/β лопастях может индуцировать забывание в случае краткосрочной и долгосрочной памяти при уходе, соответственно. У линии с активацией гена *limk1* в нервной системе наблюдали достоверные отличия интенсивности флуоресценции LIMK1 в β лопастях грибовидных тел. Следовательно, быстрое забывание, вызванное активацией гена, вероятно, обусловлено увеличением содержания LIMK1 в β лопастях грибовидных тел. В настоящем исследовании показано, что активация гена *limk1* для большинства типов нейронов приводит к ускорению забывания при подавлении ухода (Рисунок 3.28). Снижение ИО можно наблюдать уже спустя 15-30 минут после тренировки.

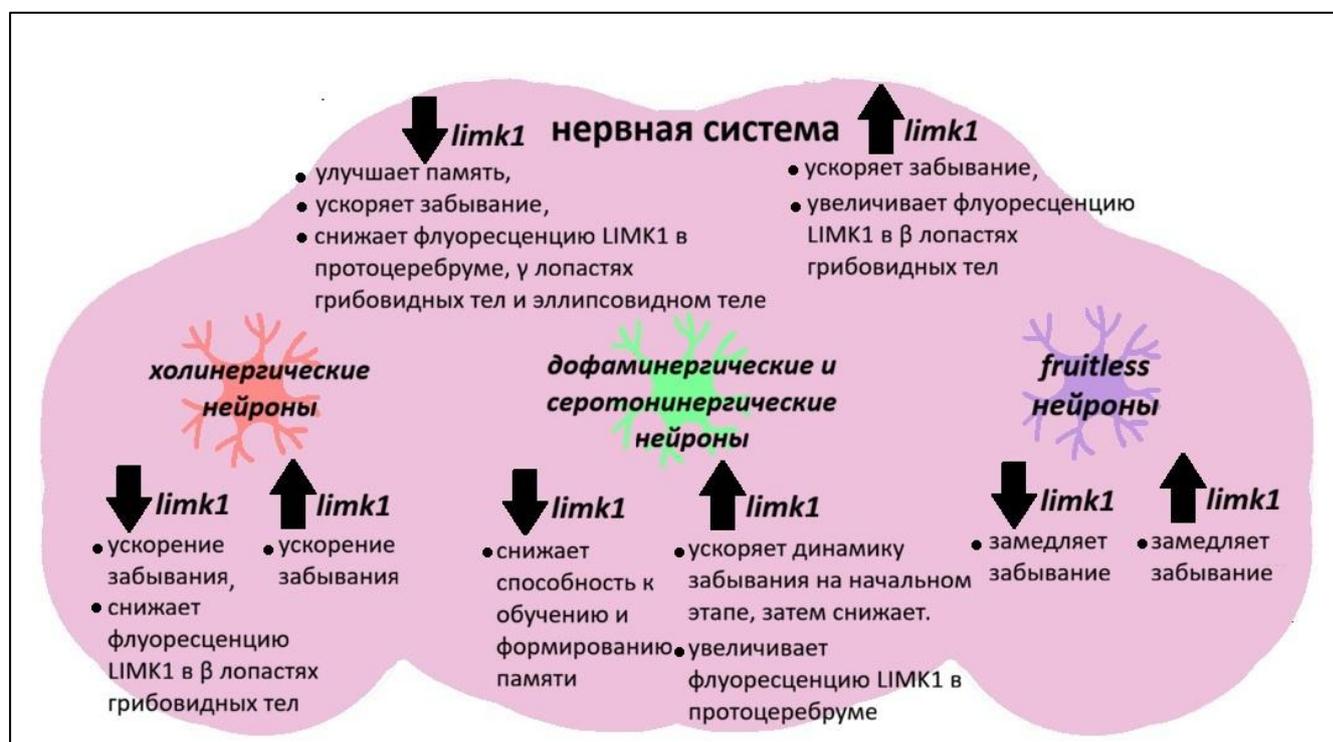


Рисунок 3.28. Роль изменения экспрессии гена *limk1* в нервной системе и разных типах нейронов у *Drosophila melanogaster*.

Ацетилхолин является основным возбуждающим нейромедиатором у дрозофилы. К числу холинергических нейронов относятся: проекционные нейроны, образующие синапсы на клетках Кеньона грибовидных тел (Yasuyama et al., 2002), внутренние нейроны грибовидных тел, которые отвечают за обонятельную память, экспрессирующие холинацетилтрансферазу (ChAT) и везикулярный переносчик ацетилхолина (VACHT) (Barnstedt et al., 2016), а также α/β -нейроны - основные необходимые для консолидации долгосрочной памяти (Yi et al., 2013). Некоторые холинергические выходные нейроны грибовидных тел, по-видимому, регулируют зрительную память на положительное подкрепление у дрозофилы (Aso et al., 2014b). Поскольку внешние клетки грибовидных тел, ответственные за память при подавлении ухаживания, аналогичны тем, которые используются для запоминания положительного подкрепления (Montague, Baker, 2016), уровень памяти может коррелировать с уровнем LIMK1 в некоторых из этих нейронов. Участие LIMK1 в процессах забывания может быть локальным, в определенных популяциях нейронов или синаптических окончаниях. В то же время, LIMK1 может иметь решающее значение для хранения и извлечения данных из памяти в парадигме подавления ухаживания.

Согласно нашим данным, подавление и активация гена *limk1* в холинергических нейронах β лопастей грибовидных тел ускоряет забывание. Известно, что центральный комплекс регулирует память при подавлении ухаживания (Sitnik et al., 2003). Все структуры центрального комплекса, в том числе эллипсоидное тело, содержат холинергические нейроны (Kahsai, Winther, 2011). У линии с подавлением гена *limk1* в холинергических нейронах в эллипсоидном теле наблюдали самый низкий уровень LIMK1. При этом мухи данной линии оказались способны сохранять память до 30 минут, в то время как мухи с активацией *limk1* - менее 15, а спустя 30 минут ИО мух линии с активацией был достоверно ниже, чем ИО сразу после тренировки. Таким образом, возможно, именно снижение LIMK1 в эллипсоидном теле негативно сказывается на забывании. Вместе с тем, самый высокий, хотя и недостоверный, уровень ИО

наблюдали у линии с активацией *limk1*, что указывает на значение высокого уровня LIMK1 в холинергических нейронах при формировании краткосрочной памяти. При этом активация экспрессии способствует интенсификации забывания. Наши данные согласуются с дифференциальной ролью ацетилхолина в формировании памяти (Micheau, Marighetto, 2011). Аналогичным образом вариации уровня LIMK1, основного компонента сигнальной трансдукции, по-видимому, определяют успешность формирования памяти и ее сохранения.

Дофаминергическая система является ключевым элементом, регулирующим процессы обучения и запоминания как в парадигме ольфакторного обучения, так и при подавлении ухаживания. Дофаминергические нейроны отвечают за мотивацию ухаживания, а также за формирование ассоциативной памяти и забывание (Himmelreich et al., 2017; Wang, 2022). Оксид азота (NO) служит ко-трансммиттером дофамина в группе дофаминергических нейронов, включая PAM- $\gamma 5$ и PPL1- $\gamma 1$ pedc. Активация вышеуказанных нейронов обычно вызывает положительную и отрицательную ассоциативную память о запахах соответственно, в то время как NO изменяет их валентность на противоположную (Aso et al., 2019). На способность к запоминанию также влияет порядок следования условных и безусловных стимулов, изменяющийся с положительного на отрицательный и наоборот при обратном обусловливании (эффект зависит от Dop1R2) (Handler et al., 2019). Конечный поведенческий эффект определяется дофаминергической пластичностью, которая определяет режим взаимодействия дофаминергических нейронов и клеток Кеньона выходящих нейронов грибовидных тел (Gkanias et al., 2022). Серотонинергические нейроны также влияют на поведение при ухаживании и восстанавливают мотивацию к спариванию у самцов после неудачных попыток спаривания (Hu et al., 2020; Salvaterra et al., 2001). Однако роль этого типа нейронов в реализации процессов ухаживания остается в значительной степени неизвестной. Нейроны aSP 13, которые являются как дофаминергическими, так *fruitless*-положительными регулируют формирование памяти при подавлении ухаживания (Keleman et al.,

2012; Yu et al., 2010). При подавлении экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах мы наблюдали нарушения памяти. Наиболее выраженные различия памяти, вызванные активацией и подавлением *limk1* в нейронах *fruitless*, дофаминергических и серотонинергических нейронах, вероятно, указывают на специфическую роль этих клеток мозга в LIMK1-зависимом забывании при подавлении ухаживания.

Линии с изменением экспрессии *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах, а также в контроле показали отрицательные значения ИО через 24 часа после обучения. Однако у контрольной линии уровень ИО оставался нормальным в течение 30 минут после тренировки. Подавление *limk1* было связано с серьезными нарушениями обучения и памяти: ИО сразу после тренировки статистически не отличался от нуля. Таким образом, LIMK1-зависимая передача сигналов в дофаминергических и серотонинергических нейронах важна для обучения при подавлении ухаживания.

Подавление *limk1* в нейронах *fruitless* снизило скорость забывания на промежутке времени от 30 до 60 минут. Это сходно с ролью ГТФазы Ras (ключевого регулятора динамики цитоскелета), подавление активности которой также приводит к снижению LIMK1 и снижению активности забывания, а также продлению памяти на более длительный срок в парадигме павловского ольфакторного аверсивного обучения (Shuai et al., 2010). Таким образом, можно говорить о возможности регуляции факторов, влияющих на процессы памяти, как естественной, так и искусственной, что приближает нас к созданию методов терапии заболеваний, для которых такая регуляция необходима. ИО контрольной линии не отличался от нуля, начиная с 30 минут после тренировки, в то время как подавление *limk1* увеличивало ИО. У самцов нейроны *fruitless* отвечают за поведение во время ухаживания. В головном мозге дрозофилы насчитывается около 1500 нейронов *fruitless* (Liu et al., 2019; Yu et al., 2010). Некоторые холинергические и дофаминергические нейроны также являются Fru-позитивными, например, около 300 нейронов γ лопастей грибовидных тел и aSP13

дофаминергических нейронов, расположенные в верхнем медиальном протоцеребруме, которые регулируют обучение ухаживанию и память. Известно также, что активность гена *fruit* снижается при формировании долгосрочной памяти в парадигме подавления ухаживания (Winbush et al., 2012). Следовательно, подавление активности нейронов *fruitless* может быть связано с улучшением памяти.

Как правило, врожденное забывание отстает от процесса обучения, что позволяет памяти формироваться и закрепляться. Это отставание может отсутствовать в изучаемых линиях с изменённой экспрессией гена *limk1* и *agn^{ts3}*, что приводит к снижению ИО в процессе обучения или вскоре после него. Забывание у разных линий наблюдали как при активации, так и при подавлении *limk1*. Следовательно, сохранение памяти, по-видимому, требует надлежащего баланса активности *limk1* в различных структурах мозга. Снижение уровня LIMK1 у линии *agn^{ts3}* после теплового шока связано с восстановлением способности к обучению и формированию памяти об ухаживании (Medvedeva et al., 2008; Nikitina et al., 2014a). Тепловой шок также влияет на профиль микроРНК *agn^{ts3}* и активность специфических дофаминергических нейронов, ответственных за аверсивное обучение (Galili et al., 2014; Savvateeva-Popova et al., 2017). Таким образом, механизмы нарушения и восстановления памяти во время ухаживания кажутся довольно сложными.

До сих пор неясно, как мозг мухи обрабатывает информацию о неудачных попытках ухаживания и какие сигналы влияют на активность aSP13. Большинство нейронов грибовидных тел, вовлечённых в формирование памяти при ухаживании, совпадают с нейронами, ответственными за ассоциативную память при павловском обусловливании (Montague, Baker, 2016). Таким образом, мы можем ожидать сходства механизмов забывания как при подавлении ухаживания, так и в парадигме ольфакторного обучения. Поскольку нейроны РАМ обычно вызывают аттрактивные поведенческие эффекты, например, при вознаграждении сахаром, мы можем предположить антагонизм между ухаживанием и другими

поведенческими программами, такими как кормление или спонтанная двигательная активность (Vogt et al., 2014). Выбор между кормлением и ухаживанием контролируется тирамином, который активирует нейроны P1, присущие латеральному протоцеребральному комплексу, которые регулируют процесс ухаживания (Yu et al., 2010; Cheriyankunnel et al., 2021). Другим управляющим звеном может быть сложная система взаимосвязанных клеток Кеньона и выходящих нейронов грибовидных тел, регулируемых дофаминергическими нейронами. PAM-γ5 (aSP13) секретирует NO, превращая их аттрактивное влияние в аверсивное (Asok et al., 2019). Следовательно, активация PAM-γ5 может служить триггером, отключающим ухаживание самца, в то время как его подавление или изменение механизма приводит к забыванию.

Другой вопрос заключается в том, как LIMK1 индуцирует забывание на субклеточном уровне. Забывание в случае памяти, чувствительной к анестезии, и памяти, устойчивой к анестезии, в парадигме ольфакторного обучения, вероятно, вызвано образованием линейных и разветвленных актиновых сетей соответственно, что указывает на роль морфологии цитоскелета в этих процессах (Feng, Chiang, 2019; Gao et al., 2019). Недостаток активного кофилина приводит к дефектам цитоскелета и ухудшает высвобождение синаптических пузырьков (Wolf et al., 2015). Сверхактивация пути LIMK1 – кофилин может привести к значительным перестройкам цитоскелета в PAM-γ5, что, в свою очередь, может вызвать дисбаланс между высвобождением дофамина и NO. Все вышесказанное может усилить эффект NO, полученного от ближайших клеток Кеньона или выходящих нейронов грибовидных тел и привести к возвращению высокой мотивации ухаживания.

В зрелых нейронах актином обогащены как пре-, так и постсинаптические структуры, такие как дендритные отростки, которые регулируются сигнальным путем Rho. Действие LIMK1 на процессы полимеризации актина и память довольно сложное и зависит от способа регуляции LIMK1 (кратковременная или длительная сверхэкспрессия), а также уровня кофилина. В то время, как активный

кофилин дестабилизирует фибриллярный актин, в высоких концентрациях он усиливает полимеризацию актина и формирует актиновые нити в дендритных шипиках при длительной потенциации (Cuberos et al., 2015).

Таким образом, наши данные показывают вовлеченность LIMK1 в реализацию процессов памяти при ухаживании. Изменения в экспрессии *limk1*, а также в распределении LIMK1 в головном мозге были связаны с различиями обучения и памяти на разных временных интервалах. Даже локальные вариации экспрессии *limk1* в мозге дрозофилы могут существенно повлиять на ее способность к обучению. Использование драйверов с более узким спектром экспрессии Gal4 может помочь выявить роль определенных подтипов нейронов в забывании, связанном с ухаживанием. Изучение поведенческих последствий сверхэкспрессии *limk1* в различных областях мозга дополнит оценку последствий ее подавления. Проведенное исследование открывает перспективы в изучении белков-партнёров LIMK1, таких как кофилин в его активной и фосфорилированной форме.

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 СОКРАЩЕНИЙ

α Л – α лопасти грибовидных тел

β Л – β лопасти грибовидных тел

γ Л – γ лопасти грибовидных тел

АД – антеннальные доли

ВТ – веерообразное тело центрального комплекса

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГТФаза – гуанозинтрифосфатаза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗО – зрительная область

ИО – индекс обучения

ИУ – индекс ухаживания

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПЕД / ПД – педункулюсы

ПР – протоцеребрум

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ЭТ – эллипсоидное тело центрального комплекса

$A\beta$ – amyloid- β ; β -амилоид

$A\beta$ PP – amyloid- β protein precursor; белок-предшественник β -амилоида

АС – adenylyl cyclase; аденилатциклаза

AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

AN – antennal nerve; антенный нерв

APLn – anterior paired lateral neuron; передний парный латеральный нейрон

β L – β -lobe; бета-лопасть грибовидного тела

BACE1 – β secretase1; β -секретаза 1

BDNF – brain-derived neurotrophic factor; нейротрофический фактор мозга

Ca – calyx; каликсы

CaMKII – Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase; Ca^{2+} -кальмодулин-зависимая протеинкиназа

CC – central complex; центральный комплекс

ChAT – choline-acetyltransferase; холин-ацетилтрансфераза

CRE – cAMP-responsive element; цАМФ-зависимый элемент

CREB – cAMP response element-binding protein; цАМФ-зависимый транскрипционный фактор

CS – conditioned stimulus; условный стимул

CSP – Cysteine string protein

DA – dopamine; дофамин

DALn – dorsal anterior lateral neurons; дорсальные переднелатеральные нейроны

DAn – dopaminergic neurons; дофаминергические нейроны

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole; 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DPMn – dorsal paired medial neuron; дорсальный парный медиальный нейрон

dsRNA – double-stranded; двухцепочечной РНК

ErbB – erythroblastic leukemia viral oncogene homolog; гомолог В вирусного онкогена эритробластной лейкемии

Es – esophagus; глотка

GC – great commissure; большая комиссура

GDNF – Glial cell line-derived neurotrophic factor; глиальный нейротрофический фактор

GFP – Green fluorescent protein

In – interneurons; интернейроны

INDELS – инсерции и делеции

LH – lateral horn; боковой рог

LIMK1 – LIM kinase 1; LIM киназа 1

LIMK2 – LIM kinase 2; LIM киназа 2

Lo – lobula; лобула

LTD – long-term depression; долговременной депрессии

LTP – long-term potentiation; долговременная потенциация

MAP – microtubule-associated proteins; белки, ассоциированные с микротрубочками

MBn – mushroom body neurons; нейроны грибовидных тел

MB-V2n – Mushroom body ventral lobe arborizing neuron 2; древовидный нейрон вентральной доли грибовидного тела 2

MB-V3 – mushroom body ventral lobe arborizing neuron 3; древовидный нейрон вентральной доли грибовидного тела 3

Me – medulla; медулла

MRCK α – myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase α ; киназа миотонической дистрофии, родственная Cdc42-связанной киназе α

NES – nuclear-export signal; сигнал ядерного экспорта

NLS – nuclear localization signal; сигнал ядерной локализации

NMDAR – N-methyl-D-aspartate receptor; N-метил-D-аспарат-специфичный рецептор

NO – nitric oxide; оксид азота

Nurr1 – nuclear receptor related-1 protein; связанный с ядерным рецептором белок 1

OA – octopamine; октопамин

OAMB – octopamine receptor; рецепторы октопамина

OAn – octopaminergic neurons; октопаминергические нейроны

ORn – olfactory receptors neurons; нейроны обонятельных рецепторов

PAK – p21 activated kinase; p21-активируемая киназа

PAM – protospacer adjacent motif; прилегающий к протоспейсеру мотив

PB – protocerebral bridge; протоцеребральный мост

Ped – pedunculus; педункулюс

PICK1 – protein Interacting with C Kinase-1; белок, взаимодействующий с C киназой-1

PKC – protein kinase C; протеинкиназа C

Pn – projection neurons; проекционные нейроны

PP1i – protein phosphatase-1(i); протеинфосфатаза 1(i)

PS – presenilin; пресенилин

PSD-95 – postsynaptic density protein 95; белок постсинаптической плотности 95

RNAi – RNA interference; РНК-интерференция

ROCK – Rho-associated serine/threonine kinase; Rho-ассоциированная серин/треонин киназа

SSH1 – sling shot protein phosphatase 1; slingshot протеиновая фосфатаза 1

US – unconditioned stimulus; безусловный стимул

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Берлов, Д.Н. Функциональные ансамбли в мозге человека и животных / Д.Н. Берлов, Е.А. Никитина // Физиология человека. – 2021. – Т. 47. №5. – С. 118-127.
2. Вейн, А.М. Память человека / А.М. Вейн, Б.И. Каменецкая. – Изд-во «Наука». – Москва. – 1973. – 208с.
3. Журавлев, А. В. Обучение и память у дрозофилы: физиолого-генетические основы / А.В. Журавлев, Е.А. Никитина, Е.В. Савватеева-Попова // Успехи физиологических наук. – 2015. – Т. 46. № 1. – С.76–92.
4. Захаров, В.В. Виды памяти и клинические синдромы амнестических расстройств / В.В. Захаров // Поведенческая неврология. – 2022 – №1. – С. 18–26.
5. Каминская А.Н. Особенности поведения *Drosophila melanogaster* при различной структуре гена *limk1* / Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Санкт-Петербург, 2012. – 163с.
6. Каминская, А.Н. LIM-киназа 1 в регуляции когнитивных и локомоторных и функций *Drosophila melanogaster* / А.Н. Каминская, А.В. Медведева // Экологическая генетика. – 2013. – Т. 11. № 3. – С. 63-78.
7. Каминская, А.Н. Влияние соотношения изоформ LIMK1 на поведение ухаживания *Drosophila melanogaster*: комплексный подход / А.Н. Каминская, Е.А. Никитина, Т.Л. Паялина и др. // Экологическая генетика. – 2011. – Т. 9. № 4. – С. 3-14.
8. Каминская, А.Н. Обучение и формирование памяти в сопоставлении с распределением pCREB и белковых агрегатов в нейромышечных контактах у *Drosophila melanogaster* при полиморфизме *limk1* / А.Н. Каминская, Е.А. Никитина, М.С. Герасименко и др. // Генетика. – 2015. – Т. 51. №6. – С. 685-695.
9. Камышев, Н.Г. Выявление мутантов дрозофилы, проявляющих дефекты памяти после выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания / Н.Г.

Камышев, К.Г. Илиади, Ю. В. Брагина и др. // Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова. – 1999. – Т. 85. № 1. – С. 84-92.

10. Ковалева, Т.Ф. Кофилин: молекулярно-клеточные функции и роль в функционировании нервной системы / Т.Ф. Ковалева, Н.С. Максимова, И.Ю. Жуков и др. // Нейрохимия. – 2019. – Т. 36. № 1. – С. 14-23.

11. Медведева, А.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 / А.В. Медведева, Д.А. Молотков, Е.А. Никитина и др. // Генетика. – 2008. – Т. 44. № 6. – С. 669-681.

12. 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 // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58. - №1. – С. 34-42.

13. 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 и др. // Медицинский академический журнал. – 2020. – Т. 20. № 4. – С. 45–54.

14. Никитина, Е.А. Влияние теплового шока на обучение, формирование памяти и содержание LIMK1 в мозге самцов *Drosophila melanogaster* с измененной структурой гена *limk1* / Е.А. Никитина, А.Н. Каминская, Д.А. Молотков и др. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2014а. – Т. 50. № 2. – С. 137–147.

15. Никитина, Е.А. Локус *agnostic* дрозофилы: вовлеченность в становление когнитивных нарушений при синдроме Уильямса / Е.А. Никитина, А.В. Медведева, Г.А. Захаров, Е.В. Савватеева-Попова // Acta Naturae. – 2014b. – Т. 6. № 2(21). – С. 58-66.

16. Никитина Е.А. Обучение и память у дрозофилы: роль мутации *white* / Е.А. Никитина // Интегративная физиология. – 2023. – Т. 4 № 1. – с. 91-102.
17. Никитина, Е.А. Ослабленное магнитное поле Земли: влияние на транскрипционную активность генома, обучение и память у *Dr. melanogaster* / Е.А. Никитина, А.В. Медведева, М.С. Герасименко и др. // Журнал Высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2017. – Т. 67. № 2. – С. 246-256.
18. Никитина, Е.А. Роль LIM-киназы 1 в процессах памяти / Е.А. Никитина, Заломаева, А.В. Медведева и др. // Успехи физиологических наук. – 2023. – Т. 54 № 4. – С. 36-56.
19. Никитина, Е.А. Участие GDNF, LIMK1 и белков теплового шока в формировании процессов обучения и памяти у дрозофилы / Е.А. Никитина, А.В. Медведева, Ю.Ф. Долгая и др. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2012. – Т. 48. № 6. – С. 588-596.
20. Никитина, Е.А. Физиолого-генетический анализ механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний с привлечением моделей на дрозофиле / диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Санкт-Петербург, 2015. – 460с.
21. Никитина, М.А. Нейродегенеративные заболевания / М.А. Никитина, В.М. Алифирова. – Томск: Издательство СибГМУ. – 2021. – 101с.
22. Никитина Е.А. Тепловой шок в период развития центральных структур мозга дрозофилы: формирование памяти у мутанта *l(1)ts403 Drosophila melanogaster* / Е.А. Никитина, Е.В. Токмачева, Е.В. Савватеева-Попова // Генетика. – 2002. – Т. 38 № 11. – 1-8с.
23. Покровский, В.М. Физиология человека в 2 томах. Том II / В.М. Покровский, Г.Ф. Коротько, Ю.В. Наточин. – М: Медицина. – 1997. – 368с.
24. Попов, А.В. Роль грибовидных тел и центрального комплекса головного мозга *Drosophila melanogaster* в организации поведения ухаживания и коммуникационного звукоизлучения / А.В. Попов, А.И. Переслени, Е.В.

- Савватеева-Попова и др. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2004. – Т. 40. № 6. – С. 521–530.
25. Савватеева-Попова, Е.В. Особенности архитектуры X-хромосомы, экспрессии LIM-киназы 1 и рекомбинации у мутантов дрозофилы локуса *agnostic*: модель синдрома Вильямса человека / Е.В. Савватеева-Попова, А.И. Переслени, Л.М. Шарагина и др. // Генетика. – 2004. – Т. 40. № 6. – С. 749-769.
26. Угрюмов, М.В. Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма. В 2-х томах. / М.В. Угрюмов. – Том 2. – М: Научный мир. – 2014. – 848 с.
27. Циркин, В.И. Роль дофамина в деятельности мозга (обзор литературы) / В.И. Циркин, В.И. Багаев, Б.Н. Бейн // Вятский медицинский вестник. – 2010. – №1. – С. 7-18.
28. Численность населения Российской Федерации по полу и возрасту на 1 января 2024 года (Статистический бюллетень). – Москва, 2024.
29. Acevedo, K. LIM kinase 2 is widely expressed in all tissues / K. Acevedo, N. Moussi, R. Li et al. // Journal of Histochemistry and Cytochemistry. – 2006. – V. 54. №5. – P. 487-501.
30. Alvarez-Castelao, B. The regulation of synaptic protein turnover / B. Alvarez-Castelao, E.M. Schuman // Journal of Biological Chemistry. – 2015. – V. 290. № 48. – P. 28623-28630.
31. Aso, Y. Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila* / Y. Aso, D. Sitaraman, T. Ichinose. – eLife. – 2014b. – V. 3: e04580.
32. Aso, Y. Nitric oxide acts as a cotransmitter in a subset of dopaminergic neurons to diversify memory dynamics / Y. Aso, R.P. Ray, X. Long et al. // Elife. – 2019. – V. 8. – e49257.
33. Aso, Y. The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers / Y. Aso, K. Grübel, S. Busch et al. // Journal of Neurogenetics. – 2009 – V. 23. № 1-2. – P.1 56-172.

34. Aso, Y. The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning / Y. Aso, D. Hattori, Y. Yu // *Elife*. – 2014a. – 3:e04577.
35. Asok, A. Molecular mechanisms of the memory trace / A. Asok, F. Leroy, J.B. Rayman, E.R. Kandel // *Trends in Neurosciences*. – 2019. – V. 42. № 1. – P. 14–22.
36. Asrar, S. Regulation of hippocampal long-term potentiation by p21-activated protein kinase 1 (PAK1) / S. Asrar, Y. Meng, Z. Zhou et al. // *Neuropharmacology*. – 2009. – V. 56. – P. 73-80.
37. Baddeley, A. Working memory: theories, models, and controversies / A. Baddeley // *Annual Review of Psychology*. – 2012. – V. 63. – P. 1–29.
38. Bamburg, J.R. ADF/Cofilin-actin rods in neurodegenerative diseases / J.R. Bamburg, B.W. Bernstein, R.C. Davis et al. // *Current Alzheimer Research*. – 2010. – V. 7. № 3. – P. 241-250.
39. Bamburg, J.R. Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease / J.R. Bamburg, G.S. Bloom // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. – 2009. – V. 66. № 8. – P. 635-649.
40. Bao, X. Localization of serotonin/tryptophan-hydroxylase-immunoreactive cells in the brain and suboesophageal ganglion of *Drosophila melanogaster* / X. Bao, B. Wang, J. Zhang et al. // *Cell and Tissue Research*. – 2010. – V. 340. – P. 51–59.
41. Barnstedt, O. Memory-relevant mushroom body output synapses are cholinergic / O. Barnstedt, D. Oswald, J. Felsenberg et al. // *Neuron*. – 2016. – V. 89. № 6. – P. 1237-1247.
42. Ben Zablah, Y. LIM-Kinases in synaptic plasticity, memory, and brain diseases / Y. Ben Zablah, H. Zhang, R. Gugustea, Z. Jia // *Cells*. – 2021. – V. 10. – P. 2079.
43. Berabez, R. LIM Kinases, promising but reluctant therapeutic targets: chemistry and preclinical validation in vivo / R. Berabez, S. Routier, H. Bénédicti et al. // *Cells*. – 2022. – V. 11. – P. 2090.
44. Berger-Sweeney, J. Selective immunolesions of cholinergic neurons in mice: effects on neuroanatomy, neurochemistry, and behavior / J. Berger-Sweeney, N.A. Stearns, S.L. Murg Floerke-Nashner et al. // *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2001. – V. 21. – P. 8164–8173.

45. Bernard, O. Kiz-1, a protein with LIM zinc finger and kinase domains, is expressed mainly in neurons / O. Bernard, S. Ganiatsas, G. Kannourakis, R. Dringen // *Cell Growth Differ.* – 1994. – V. 5. – P. 1159-1179.
46. Berry, J.A. Dopamine Neurons Mediate Learning and Forgetting through Bidirectional Modulation of a Memory Trace / J.A. Berry, A. Phan, R.L. Davis // *Cell Reports.* – 2018. – V. 25. № 3. – P. 651-662.
47. Blanpied, T.A. Structural plasticity with preserved topology in the postsynaptic protein network / T.A. Blanpied, J.M. Kerr, M.D. Ehlers // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.* – 2008. – V. 105. № 34. – P. 12587-12592.
48. Bliss, T.V. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus / T.V. Bliss, G.L. Collingridge // *Nature.* – 1993. – V. 361. – P. 31-39.
49. Borovac, J. Regulation of actin dynamics during structural plasticity of dendritic spines: Signaling messengers and actin binding proteins / J. Borovac, M. Bosch, K. Okamoto // *Molecular and Cellular Neuroscience.* – 2018. – V. 91. – P. 122-130.
50. Bosch, M. Structural plasticity of dendritic spines / M. Bosch, Y. Hayashi // *Current Opinion in Neurobiology.* – 2012. – V. 22. № 3. – P. 383-388.
51. Bostancıoğlu, M. Optogenetic stimulation of serotonin nuclei retrieve the lost memory in Alzheimer's disease / M. Bostancıoğlu, *Journal of Cellular Physiology.* – 2020. – V. 235. № 2. – P. 836-847.
52. Brand A.H. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes / A.H. Brand, N. Perrimon // *Development.* – 1993. – V 118, № 2. – P. 401-415.
53. Buchner, E. Genes expressed in the adult brain of drosophila and effects of their mutations on behavior – a survey of transmitter-related and 2nd messenger-related genes / E. Buchner // *Journal of Neurogenetics.* – 1991. – V. 7. – P. 153-192.
54. Cervantes-Sandoval, I. Scribble scaffolds a signalosome for active forgetting / I. Cervantes-Sandoval, M. Chakraborty, C. MacMullen, R.L. Davis // *Neuron.* – 2016. – V. 90. № 6. – P. 1230-1242.

55. Chen, C.C. A subset of cholinergic mushroom body neurons blocks long-term memory formation in *Drosophila* / C.C. Chen, H.W. Lin, K.L. Feng et al. // *Cell Reports*. – 2023. – V. 42. № 8. – 112974.
56. Chen, Z.R. Role of cholinergic signaling in Alzheimer's disease / Z.R. Chen, J.B. Huang, S.L. Yang, F.F. Hong // *Molecules*. – 2022. – V. 27. №6. 1816.
57. Cheriyankunel, S.J. A neuronal mechanism controlling the choice between feeding and sexual behaviors in *Drosophila* / S.J. Cheriyankunel, S. Rose, P.F. Jacob // *Current Biology*. – 2021. – V. 31. – P. 4231-4245.
58. Chrobak, J.J. Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system / J.J. Chrobak, A. Lorincz, G. Buzsaki // *Hippocampus*. – 2000. – V. 10. – P. 457–465.
59. Cingolani, L.A. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy / L.A. Cingolani, Y. Goda // *Nature reviews neuroscience*. – 2008. – V. 9. – P. 344-356.
60. Cristofanilli, M. Calcium channel and glutamate receptor activities regulate actin organization in the salamander retinal neuron / M. Cristofanilli, A. Akopian // *The Journal of Physiology*. – 2006. – V. 575. Pt. 2. – P. 543-554.
61. Cuberos, H. Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction / H. Cuberos, B. Vallée, P. Vourc'h et al. *FEBS Letters*. – 2015. – V. 589. № 24. P. 3795-3806.
62. Dan, C. Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin / C. Dan, A. Kelly, O. Bernard, A. Minden // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276. № 34. – P. 32115-32121.
63. Davis, R.L. Mushroom bodies and *Drosophila* learning / R.L. Davis // *Neuron*. – 1993. – V. 11. № 1. – P. 1-14.
64. Davis, R.L. Olfactory learning / R.L. Davis // *Neuron*. – 2004. – V. 44. № 1. – P. 31-48.
65. Davis, R.L. Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience / R.L. Davis // *Annual Review of Neuroscience*. – 2005. – V. 28. – P. 275-302.

66. Davis, R.L. The Biology of forgetting – a perspective / R.L. Davis, Y. Zhong // *Neuron*. – 2017. – V. 95. – P. 490-503.
67. Dong, T. Inability to activate Rac1-dependent forgetting contributes to behavioral inflexibility in mutants of multiple autism-risk genes / T. Dong, J. He, S. Wang, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2016. – V. 113. № 27. – P. 7644-7649.
68. Dorkenwald, S. Neuronal wiring diagram of an adult brain / S. Dorkenwald, A. Matsliah, A.R. Sterling et al. // *Nature*. – 2024. – V. 634. – P. 124–138.
69. Dubnai, J. Neural substrates of memory: from synapse to system / J. Dubnai, A.-S. Chiang, T. Tully // *Journal of Neurobiology*. – 2003. – V. 54. № 1. – P. 238–253.
70. Dudai, Y. *The Neurobiology of memory: concepts, findings, trends*. 1st edition / Y. Dudai. – Oxford University Press, 1989. – 352 p.
71. Edelman, L. AT-rich palindromes mediate the constitutional t (11;22) translocation / L. Edelman, E. Spiteri, K. Koren et al. // *American Journal of Human Genetics*. – 2001. – V. 68. № 1. – P. 1-13.
72. Edwards, D.C. Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton / D.C. Edwards, G.N. Gill // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. – P. 11352-11361.
73. Endo, M. Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin / M. Endo, K. Ohashi, Y. Sasaki et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2003. – V. 23. – P. 2527-2537.
74. Endo, M. LIM Kinase and slingshot are critical for neurite extension / M. Endo, K. Ohashi, K. Mizuno // *The journal of biological chemistry*. – 2007. – V. 282. № 18. – P. 13692-13702.
75. Erlendsson, S. Mechanisms of PDZ domain scaffold assembly illuminated by use of supported cell membrane sheets / S. Erlendsson, T.S. Thorsen, G. Vauquelin et al. // *eLife*. – 2019. – V. 8. – e39180.

76. Feng, K.L. Forgetting memories through distinct actin remodeling mechanisms / K.L. Feng, A.S. Chiang // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2019. – V. 116. – P. 20807-20808.
77. Field, E.J. An electron-microscopic study of scrapie in the rat: further observations on "inclusion bodies" and virus-like particles / E.J. Field, H.K. Narang // *Journal of the Neurological Sciences*. – 1972. – V. 17. № 3. – P. 347-364.
78. Field, E.J. Electron microscopic observations on the cerebellar cortex in kuru / E.J. Field, J.D. Mathews, C.S. Raine // *Journal of the Neurological Sciences*. – 1969. – V. 8. № 2. – P. 209-224.
79. Fisher, E.R. Unique, concentrically laminated, membranous inclusions in myofibers / E.R. Fisher, A.R. Gonzalez, R.C. Khurana, T.S. Danowski // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1972. – V. 58. № 3. – P. 239-244.
80. Foletta, V.C. LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues / V.C. Foletta, N. Moussi, P.D. Sarmiere et al. // *Experimental Cell Research*. – 2004. – V. 294. № 2. – P. 392-405.
81. Forthmann, B. New perspective on the multidimensionality of divergent thinking tasks / B. Forthmann, P.-C. Bürkner, C. Szardenings et al. // *Frontiers in Psychology*. – 2019. – V. 10. – Art. 985.
82. Frahm, S. An essential role of acetylcholine-glutamate synergy at habenular synapses in nicotine dependence / S. Frahm, B. Antolin-Fontes, A. Gorlich et al. // *Elife*. – 2015. – 4:e11396.
83. Fu, Y. Unusual, rod-shaped cytoplasmic inclusions (Hirano bodies) in a cerebellar hemangioblastoma / Y. Fu, J. Ward, H.F. Young // *Acta Neuropathologica*. – 1975. – V. 31. № 2. – P. 129-135.
84. Galili, D.S. Converging circuits mediate temperature and shock aversive olfactory conditioning in *Drosophila* / D.S. Galili, K.V. Dylla, A. Lüdke et al. // *Current Biology*. – 2014. – V. 24. – P. 1712-1722.

85. Gao, Y. Genetic dissection of active forgetting in labile and consolidated memories in *Drosophila* / Y. Gao, Y. Shuai, X. Zhang et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2019. – V.116. – P. 21191-21197.
86. George, J. Palmitoylation of LIM Kinase-1 ensures spine-specific actin polymerization and morphological plasticity / J. George, C. Soares, A. Montersino et al. // eLife. – 2015. – V. 4. – e06327.
87. Ghosh, H.S. Adult neurogenesis and the promise of adult neural stem cells / H.S. Ghosh // Journal of Experimental Neuroscience. – 2019. – V. 13. – Art. 1179069519856876.
88. Giordani, G. Role of neuronal and non-neuronal acetylcholine signaling in *Drosophila* humoral immunity / G. Giordani, G. Cattabriga, A. Becchimanzi et al. // Insect Biochemistry and Molecular Biology Journal. – 2023. – V. 153. – 103899.
89. Gkaniias, E. An incentive circuit for memory dynamics in the mushroom body of *Drosophila melanogaster* / E. Gkaniias, L.Y. McCurdy, M.N. Nitabach, B. Webb // Elife. – 2022. – V. 11. – e75611.
90. Godenschwege, T.A. Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behavior / T.A. Godenschwege, D. Reisch, S. Diegelmann et al. // European Journal of Neuroscience. – 2004. – V. 20. № 3. – P. 611-622.
91. Gorovoy, M. LIM Kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells / M. Gorovoy, J. Niu, O. Bernard et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2005. – V. 280. P. 26533-26542.
92. Griffith, L.C. Courtship learning in *Drosophila melanogaster*: diverse plasticity of a reproductive behavior / L.C. Griffith, A. Ejima // Learning & Memory. – 2009. – V. 16. № 12. – P. 743–750.
93. Gromov, P.S. Identification of two molecular chaperons (HSX70, HSC70) in mature human erythrocytes / P.S. Gromov, J.E. Celis // Experimental Cell Research. – 1991. – V. 195. № 2. – P. 556-559.

94. Grothe M.J. Atrophy of the cholinergic basal forebrain in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease dementia / M.J. Grothe, C. Schuster, F. Bauer et al. // *Journal of Neurology*. – 2014. – V. 261. – P. 1939–1948.
95. Grothe, M. Atrophy of the cholinergic Basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease / M. Grothe, H. Heinsen, S.J. Teipel // *Biological Psychiatry*. – 2012. – V. 71. – P. 805–813.
96. Grothe, M. Reduction of basal forebrain cholinergic system parallels cognitive impairment in patients at high risk of developing Alzheimer's disease / M. Grothe, L. Zaborszky, M. Atienza et al. // *Cerebral cortex*. – 2010. – V. 20. – P. 1685–1695.
97. Gu, J. ADF/Cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity / J. Gu, C.W. Lee, Y. Fan et.al. // *Nature Neuroscience*. – 2010. – V. 13. № 10. – P. 1208-1215.
98. Gu, Z. Regulation of NMDA receptors by neuregulin signaling in prefrontal cortex / Z. Gu, Q. Jiang, A.K.Y. Fu et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2005. – V. 25. № 20. – P. 4974-4984.
99. Gundersen, G.G. Microtubules and signal transduction / G.G. Gundersen, T.A. Cook // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1999. – V.11. № 1. – P. 81-94.
100. Guven-Ozkan, T. Functional neuroanatomy of *Drosophila* olfactory memory formation / T. Guven-Ozkan, R.L. Davis // *Learning & Memory*. – 2014. – V. 21. № 10. – P. 519-526.
101. Haam, J. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function / J. Haam, J.L. Yakel // *Journal of Neurochemistry*. – 2017. – V. 142. № 2. – P. 111-121.
102. Handler, A. Distinct dopamine receptor pathways underlie the temporal sensitivity of associative learning / A. Handler, T.G.W. Graham, R. Cohn et al. // *Cell*. – 2019. – V. 178. – P. 60-75.e19.
103. Hartenstein, V. Morphological diversity and development of glia in *Drosophila* / V. Hartenstein // *Glia*. – 2011. – V. 59. № 9. – P. 1237-1252.

104. Hasselmo, M.E. High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation / M.E. Hasselmo, J. McGaughy // *Progress in brain research*. – 2004. – V. 145. – P. 207–231.
105. Hasselmo, M.E. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation / M.E. Hasselmo // *Trends in cognitive sciences*. – 1999. – V. 3. – P. 351–359.
106. Hebb, D. *The organization of behavior* / D. Hebb. – Wiley: New York, 1949. – 335 p.
107. Herculano-Houzel, S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain / S. Herculano-Houzel // *Frontiers in Human Neuroscience*. – 2009, – V. 3. – Art. 31.
108. Himmelreich, S. Dopamine receptor DAMB signals via Gq to mediate forgetting in *Drosophila* / S. Himmelreich, I. Masuho, J.A. Berry // *Cell Reports*. – 2017. – V. 21. – P. 2074-2081.
109. Hiraoka, J. Self-association of LIM-kinase 1 mediated by the interaction between an N-terminal LIM domain and a C-terminal kinase domain / J. Hiraoka, I. Okano, O. Higuchi et al. // *FEBS Letters*. – 1996. – V. 399. № 1-2. – P. 117-121.
110. Hirth, F. On the origin and evolution of the tripartite brain / F. Hirth // *Brain, Behavior and Evolution*. – 2010 – T. 76. №1. – P. 3–10.
111. Hooper, P.L. The central role of heat shock factor 1 in synaptic fidelity and memory consolidation / P.L. Hooper, H.D. Durham, Z. Török et al. // *Cell Stress Chaperones*. – 2016. – V. 21. № 5. – P. 745-753.
112. Hu, S. Serotonin signals overcome loser mentality in *Drosophila* / S.W. Hu, Y.T. Yang, Y. Sun et al. // *iScience*. – 2020. – V. 23. № 11. – 101651.
113. Huang, W. p21-Activated Kinases 1 and 3 control brain size through coordinating neuronal complexity and synaptic properties / W. Huang, Z. Zhou, S. Asrar et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2011. – V. 31. № 3. – P. 388-403.
114. Humble, J. Intrinsic spine dynamics are critical for recurrent network learning in models with and without autism spectrum disorder / J. Humble, K. Hiratsuka, H. Kasai, T. Toyozumi // *Frontiers in Computational Neuroscience*. – 2019. – V. 13. – Art. 38.

115. Johnson, O. Serotonin receptor activity is necessary for olfactory learning and memory in *Drosophila melanogaster* / O. Johnson, J. Becnel, C.D. Nichols. // *Neuroscience*. – 2011. – V. 192. – P. 372–381.
116. Joiner, M.A. Mapping of the anatomical circuit of CaM kinase-dependent courtship conditioning in *Drosophila* / M.A. Joiner, L.C. Griffith // *Learning & Memory*. – 1999. – V. 6. № 2. – P. 177–192.
117. Kahsai, L. Chemical neuroanatomy of the *Drosophila* central complex: distribution of multiple neuropeptides in relation to neurotransmitters / L. Kahsai, A.M. Winther // *Journal of Comparative Neurology*. – 2011. – V. 519. – P. 290-315.
118. Kamyshev, N.G. *Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory / N.G. Kamyshev, K.G. Iliadi, J.V. Bragina // *Learning & Memory*. – 1999 – V. 6 № 1. – P. 1-20.
119. Kandel, E.R. The molecular and systems biology of memory / E.R. Kandel, Y. Dudai, M.R. Mayford // *Cell*. – 2014. – V. 157. – P. 163-186.
120. Kandel, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses / E.R. Kandel // *Science*. – 2001. – V. 294. № 5544. – P. 1030-1038.
121. Kang, D.E. Cofilin, a master node regulating cytoskeletal pathogenesis in Alzheimer's disease / D.E. Kang, J.A. Woo // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2019. – 72(s1). – P. S131-S144.
122. Keleman, K. Dopamine neurons modulate pheromone responses in *Drosophila* courtship learning / K. Keleman, E. Vrontou, S. Krüttner et al. // *Nature*. – 2012. – V. 489. – P. 145-149.
123. Kida, S. A functional role for CREB as a positive regulator of memory formation and LTP / S. Kida // *Experimental Neurobiology*. – 2012. – V. 21. № 4. – P. 136-140.
124. Kim, Y.C. Appetitive learning requires the alpha1-like octopamine receptor OAMB in the *Drosophila* mushroom body neurons / Y.C. Kim, H.G. Lee, J. Lim, K.A. Han // *Journal of Neuroscience*. – 2013. – V. 33. № 4. – P. 1672-1677.

125. Kim, Y.C. D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila* / Y.C. Kim, H.G. Lee, K A. Han // *Journal of Neuroscience*. – 2007. – V. 27. № 29. – P. 7640-7647.
126. Konorski, J. Conditioned reflexes and neuron organization / J. Konorski. – Cambridge University Press, Cambridge, 1948. – 267 p.
127. Kopelman, M.D. Disorders of memory / M.D. Kopelman // *Brain*. – 2002. – V.125. №10. – P. 2152–2190.
128. Kozlov, E.N. Long-term memory formation in *Drosophila* depends on the 3'UTR of CPEB Gene orb2 / E.N. Kozlov, E.V. Tokmatcheva, A.M. Khrustaleva et al. // *Cells*. – 2023. – V. 12. – P. 318.
129. Laas, R. Hirano bodies and chronic alcoholism / R. Laas, C. Hagel // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. – 1994. – V. 20. № 1. – P. 12-21.
130. Lagasse, F. A switch from cycloheximide-resistant consolidated memory to cycloheximide-sensitive reconsolidation and extinction in *Drosophila* / F. Lagasse, J.M. Devaud, F. Mery // *The Journal of Neuroscience*. – 2009. – V. 29. № 7. – P. 2225–2230.
131. Landin-Romero, R. An update on semantic dementia: genetics, imaging, and pathology / R. Landin-Romero, R. Tan, J.R. Hodges, F. Kumfor // *Alzheimer's Research & Therapy*. – 2016. – V.8. №1. – 52.
132. Lee, P.T. Serotonin-mushroom body circuit modulating the formation of anesthesia-resistant memory in *Drosophila* / P.T. Lee, H.W. Lin, Y.H. Chang et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – V. 108. № 33. – P. 13794-13799.
133. Lee-Hoeflich, S.T. Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis / S.T. Lee-Hoeflich, C.G. Causing, M. Podkova et.al. // *EMBO Journal*. – 2004. – V. 23. № 24. – P. 4792-4801.
134. Lindström, N.O. Tissue specific characterisation of Lim-kinase 1 expression during mouse embryogenesis / N.O. Lindström, C. Neves, R. McIntosh et al. // *Gene expression patterns*. – 2010. – V. 11. № 3-4. – P. 221-232.

135. Liu, W. Neuropeptide F regulates court-ship in *Drosophila* through a male-specific neuronal circuit / W. Liu, A. Ganguly, J. Huang et al. // eLife. – 2019. – V. 8. – P. 1-29.
136. Liu, X. The GABAergic anterior paired lateral neuron of *Drosophila* suppresses and is suppressed by olfactory learning / X. Liu, R.L. Davis // Nature Neuroscience. – 2009. – V. 12. № 1. – P. 53–59.
137. Liu, Y. Hippocampal activation of Rac1 regulates the forgetting of object recognition memory / Y. Liu, S. Du, L. Lv. et. al. // Current Biology. – 2016. – V. 26. № 17. – P. 2351-2357.
138. Lunardi, P. Effects of hippocampal LIMK inhibition on memory acquisition, consolidation, retrieval, reconsolidation, and extinction / P. Lunardi, R.M. Sachser, R.O. Sierra et al. // Molecular Neurobiology. – 2017. – V. 55. № 2. – P. 958-967.
139. Maekawa, M. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase / M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Boku et al. // Science. – 1999. – V. 285. № 5429. – P. 895-898.
140. Malinow, R. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity / R. Malinow, R.C. Malenka // Annual Review of Neuroscience. – 2002. – V. 25. P. – 103-126.
141. Malloy C.A. Pharmacological identification of cholinergic receptor subtypes: modulation of locomotion and neural circuit excitability in *Drosophila* larvae / C.A. Malloy, E. Somasundaram, A. Omar et al. // Neuroscience. – 2019. – V. 411. – P. 47-64.
142. Manetti, F. LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators / F. Manetti // Medicinal Research Reviews. – 2011. – V. 32. № 5. – P. 968-998.
143. Mao, R. LIMK1 and LIMK2 regulate cortical development through affecting neural progenitor cell proliferation and migration / R. Mao, R. Deng, Y. Wei et al. // Molecular Brain. – 2019. – V. 12. №1. – Art. 67.

144. Martinez-Saez, E. Hirano body-rich subtypes of Creutzfeldt-Jakob disease / E. Martinez-Saez, E. Gelpi, M.J. Rey // *Neuropathology and Applied Neurobiology*.— 2012. — V. 38. № 2. — P. 153-161.
145. Matthews, B.R. Memory dysfunction / B.R. Matthews // *Continuum (Minneapolis, Minn.)* — 2015. — №21. — T. 3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry. — P. 613–626.
146. McBride, S.M.J. Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster* / S.M.J. McBride, G. Giuliani, C. Choi et al. // *Neuron*. — 1999. — V. 24. № 4. — P. 967-977.
147. McGuire, S.E. Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster* / S.E. McGuire, M. Deshazer, R.L. Davis // *Progress in Neurobiology*. — 2005. — V. 76. № 5. — P. 328–347.
148. Medina, C. Cofilin 1 and actin dynamics involvement in fear memory processing / C. Medina, V. de la Fuente, T.S. Dieck et al. // *Neurobiology of Learning and Memory*. — 2020. — V. 173. — P. 107275.
149. Medina, J.H. Neural, cellular and molecular mechanisms of active forgetting / J.H. Medina // *Frontiers in Systems Neuroscience*. — 2018. — V.12. — Art. 3.
150. Medvedeva, A.V. Systemic regulation of genetic and cytogenetic processes by a signal cascade of actin remodeling: locus agnostic in *Drosophila* / A.V. Medvedeva, D.A. Molotkov, E.A. Nikitina et al. // *Russian Journal of Genetics*. — 2008. — V. 44. — P. 669-681.
151. Meng, J. Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3 / J. Meng, Y. Meng, A. Hanna et al. // *Journal of Neuroscience*. — 2005. — V. 25. № 28. — P. 6641-6650.
152. Meng, Y. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK1 knockout mice / Y. Meng, Y. Zhang, V. Tregoubov et al. // *Neuron*. — 2002. — V. 35. № 1. — P. 121-133.

153. Micheau, J. Acetylcholine and memory: a long, complex and chaotic but still living relationship / J. Micheau, A. Marighetto // *Behavioural Brain Research*. – 2011. – V. 221. № 2. – P. 424-429.
154. Minamide, L.S. Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin–actin rods that disrupt distal neurite function / L.S. Minamide, A.M. Striegl, J.A. Boyle et al. // *Nature cell biology*. – 2000. – V. 2. № 9. – P. 628-636.
155. Misra, U.K. Binding of activated alpha 2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2 dependent activation of LIMK / U.K. Misra, R. Deedwania, S.V. Pizzo // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – V. 280. – P. 26278-26286.
156. Mizuno, K. Identification of a human CDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/Double zinc finger motif / K. Mizuno, I. Okano, K. Ohashi et al. // *Oncogene*. – 1994. – V. 9. № 6. – P.1605-1612.
157. Mizuno, K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation / K. Mizuno // *Cell signaling*. – 2013. – V. 25. № 2. – P. 457-469.
158. Montague, S.A. Memory elicited by courtship conditioning requires mushroom body neuronal subsets similar to those utilized in appetitive memory / S.A. Montague, B.S. Baker // *PLoS One*. – 2016. – V.11. – e0164516.
159. Montague, S.A. Memory elicited by courtship conditioning requires mushroom body neuronal subsets similar to those utilized in appetitive memory / S.A. Montague, B.S. Baker // *PLoS One*. – 2016 – V. 11. № 10. – P. e0164516.
160. Munsie, L. Mutant huntingtin causes defective actin remodeling during stress: defining a new role for transglutaminase 2 in neurodegenerative disease / L. Munsie, N. Caron, R.S. Atwal et al. // *Human Molecular Genetics*. – 2011. – V. 20.№ 10. – P. 1937-1951.
161. Munsie, L.N. The role of the cofilin-actin rod stress response in neurodegenerative diseases uncovers potential new drug targets / L.N. Munsie, R. Truant // *Bioarchitecture*. – 2012. – V. 2. № 6. – P. 204–208.

162. Nagata, K. The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1 / K. Nagata, K. Ohashi, N. Yang, K. Mizuno // *Biochemical Journal*. – 1999. – V. 343. Pt 1. – P. 99-105.
163. Namme, J.N. Cofilin signaling in the CNS physiology and neurodegeneration / J.N. Namme, A.K. Bepari, H. Takebayashi // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. № 19. – P. 10727.
164. Ogren, S.O. The role of 5-HT(1A) receptors in learning and memory / S.O. Ogren, T.M. Eriksson, E. Elvander-Tottie et al. // *Behavioural Brain Research*. – 2008. – V. 195. – P. 54–77.
165. Okano, I. Identification and characterization of a novel family of serine/threonine kinases containing two N-Terminal LIM motifs / I. Okano, J. Hiraoka, H. Otera et.al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – V. 270. – P. 31321-31330.
166. Pascual, A. Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body / A. Pascual, T. Preat // *Science*. – 2001. – V. 294. № 5544. – P. 1115–1117.
167. Patel, U. Transcriptional changes before and after forgetting of a long term sensitization memory in *Aplysia californica* / U. Patel, L. Perez, S. Farrell et al. // *Neurobiology of Learning and Memory*. – 2018. – V. 155. – P. 474-485.
168. Peng, Q. From fruitless to sex: On the generation and diversification of an innate behavior / Q. Peng, J. Chen, Y. Pan // *Genes, Brain and Behavior*. – 2021. – Nov.20(8). – e12772.
169. Perisse, E. Shocking revelations and saccharin sweetness in the study of *Drosophila* olfactory memory / E. Perisse, C. Burke, W. Huetteroth et al. // *Current Biology*. – 2013. – V. 23. № 17. – P. 752–763.
170. Prunier, C. LIM kinases: cofilin and beyond / C. Prunier, R.Prudent, R. Kapur et al. // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. № 25. – P. 41749-41763.
171. Qu, X. Activity-Dependent nucleation of dynamic microtubules at presynaptic boutons controls neurotransmission / X. Qu, A. Kumar, H. Blockus et al. // *Current Biology*. – 2019. – V. 29. № 24. – P. 4231-4240.e5.

172. Rademacher, N. Intramolecular domain dynamics regulate synaptic MAGUK protein interactions / N. Rademacher, B. Kuropka, S.-A. Kunde et al. // *eLife*. – 2019. – V. 13. №8. – eLife.41299.
173. Rasch, B. About sleep's role in memory / B. Rasch, J. Born // *Physiological reviews*. – 2013. – V. 93. – P. 681–766.
174. Reaume, C.J. A natural genetic polymorphism affects retroactive interference in *Drosophila melanogaster* / C.J. Reaume, M.B. Sokolowski, F. Mery // *Proceedings of the Royal Society*. – 2011. – V. 278 № 1702. – P. 91-98.
175. Redt-Clouet, C. Mushroom body neuronal remodelling is necessary for short-term but not for long-term courtship memory in *Drosophila* / C. Redt-Clouet, S. Trannoy, A. Boulanger et. al. // *European Journal of Neuroscience*. – 2012. – V. 35. № 11. – P.1684–1691.
176. Richards, B.A. The persistence and transience of memory / B.A. Richards, P.W. Frankland // *Neuron*. – 2017. – V. 94. – P. 1071-1084.
177. Rivlin, P.K. Morphology and molecular organization of the adult neuromuscular junction of *Drosophila* / P.K. Rivlin, R.M. St Clair, I. Vilinsky, D.L. Deitcher // *Journal of Comparative Neurology*. – 2004. – V. 468. №4. – P. 596-613.
178. Rosso, S. LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons / S. Rosso, F. Bollati, M. Bisbal et al. // *Molecular Biology of the Cell*. – 2004. – V. 15. P. – 3433-3449.
179. Sacchetti, P. Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1 / P. Sacchetti, R. Carpentier, P. Segard et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – V. 34. № 19. – P. 5515-5527.
180. Salvarezza, S.B.. LIM Kinase 1 and cofilin regulate actin filament population required for dynamin-dependent apical carrier fission from the trans - Golgi network / S.B. Salvarezza, S. Deborde, R. Schreiner et al. // *Molecular Biology of the Cell*. – 2009. – V. 20. № 1. – P. 438-451.

181. Salvaterra, P.M. *Drosophila* cholinergic neurons and processes visualized with Gal4/UAS-GFP / P.M. Salvaterra, T. Kitamoto // *Brain research. Gene Expression Patterns*. – 2001. – V.1. – P. 73-82.
182. Sarazin, M. Amnesic syndrome of the medial temporal type identifies prodromal AD: a longitudinal study / M. Sarazin, C. Berr, J. De Rotrou et al. // *Neurology*. – 2007. – V.69. №19. – P. 1859–1867.
183. Sarazin, M. The amnesic syndrome of hippocampal type in Alzheimer's disease: an MRI study / M. Sarazin, V. Chauviré, E. Gerardin et al. // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2010. – V. 22. №1. – P. 285–294.
184. Savvateeva-Popova, E.V. Age-dependent memory loss, synaptic pathology and altered brain plasticity in the *Drosophila* mutant cardinal accumulating 3-hydroxykynurenine / E.V. Savvateeva-Popova, A.V. Popov, N.G. Kamyshev et al. // *Journal of Neural Transmission*. – 2000. – V. 107. № 5. – P. 581–601.
185. Savvateeva-Popova, E.V. *Drosophila* model for the analysis of genesis of LIM-kinase 1-dependent Williams-Beuren syndrome cognitive phenotypes: INDELS, transposable elements of the Tc1/Mariner superfamily and microRNAs / E.V. Savvateeva-Popova, A.V. Zhuravlev // *Frontiers in Genetics*. – 2017. – V. 8. – Art. 123.
186. Schmitt, J.A. Serotonin and human cognitive performance / J.A. Schmitt, M. Wingen, J.G. Ramaekers et al. // *Current Pharmaceutical Design*. – 2006. – V. 12. № 20. – P. 2473–2486.
187. Schubert, V. Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner / V. Schubert, J.S. Da Silva, C.G. Dotti // *Journal of Cell Biology*. – 2006. – V. 172. № 3. – P. 453-467.
188. Schwaerzel, M. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila* / M. Schwaerzel, M. Monastirioti, H. Scholz et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2003. – V. 23. №33. – P.10495-10502.
189. Scott, R.W. LIM Kinases: function, regulation and association with human disease / R.W. Scott, M.F. Olson // *Journal of Molecular Medicine*. – 2007. – V. 85. № 6. – P. 555-568.

190. Shi, Y. Focal adhesion kinase acts downstream of EphB receptors to maintain mature dendritic spines by regulating cofilin activity / Y. Shi, C.G. Pontrello, K.A. DeFea et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2009. – V. 29. № 25. – P. 8129-8142.
191. Shuai, Y. Dissecting neural pathways for forgetting in *Drosophila* olfactory aversive memory / Y. Shuai, A. Hirokawa, Y. Ai et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – V. 112. № 48. – E6663-72.
192. Shuai, Y. Forgetting is regulated through Rac activity in *Drosophila* / Y. Shuai, B. Lu, Y. Hu et al. // *Cell*. – 2010. – V. 140. № 4. – P. 579-589.
193. Shuai, Y. Stress resistance conferred by neuronal expression of dominant-negative Rac in adult *Drosophila melanogaster* / Y. Shuai, Y. Zhang, L. Gao, Y. Zhong // *Journal of Neurogenetics*. – 2011. – V. 25(1-2). – P. 35-39.
194. Siegel, R.W. Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila* / R.W. Siegel, J.C. Hall // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1979. – V. 76. № 1. – P. 3430–3434.
195. Sima, A.A. Hirano-bodies in the distal symmetric polyneuropathy of the spontaneously diabetic BB-Wistar rat / A.A. Sima, D. Hinton // *Acta Neurologica Scandinavica*. – 1983. – V. 68. № 2. – P. 107-112.
196. Simhadri, P.K. Dysregulation of LIMK-1/cofilin-1 pathway: A possible basis for alteration of neuronal morphology in experimental cerebral malaria / P.K. Simhadri, R. Malwade, R. Vanka et al. // *Annals of Neurology*. – 2017. – V. 82. № 3. – P. 429-443.
197. Singhrao, S.K. C1q, the classical complement pathway protein binds Hirano bodies in Pick's disease / S.K. Singhrao // *Microscopy Research and Technique*. – 2013. – V. 76. № 6. – P. 606-611.
198. Sitaraman, D. Serotonin is critical for rewarded olfactory short-term memory in *Drosophila* / D. Sitaraman, H. La Ferriere, S. Birman, T. Zars // *Journal of Neurogenetics*. – 2012. – V. 26. № 2. – P. 238-244.

199. Sitaraman, D. Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila* / D. Sitaraman, M. Zars, H. Laferriere et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – V. 105. – P. 5579–5584.
200. Sitnik, N.A. The ability of *Drosophila* mutants with defects in the central complex and mushroom bodies to learn and form memories / N.A. Sitnik, E.V. Tokmacheva, E.V. Savvateeva-Popova // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2003. – V. 33. – P. 67-71.
201. Siwicki, K.K. Associative learning in *Drosophila*: beyond olfactory conditioning / K.K. Siwicki, L. Ladewski // Behavioral Processes. – 2003. – V. 64. № 2. – P. 225–238.
202. Sokal, R.R. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd ed / R.R. Sokal, F.J. Rohlf. – New York: W.H. Freeman, 1995. – 887p.
203. Song, W. Peripheral multidendritic sensory neurons are necessary for rhythmic locomotion behavior in *Drosophila* larvae / W. Song, M. Onishi, L.X. Jan, Y.N. Jan // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2007. – V. 104. – P. 5199-5204.
204. Stanyon, C.A. LIM-kinase1 / C.A. Stanyon, O. Bernard // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 1999. – V. 31. №3-4. – P. 389-394.
205. Stickgold, R. Sleep-dependent memory triage: evolving generalization through selective processing / R. Stickgold, M.P. Walker // Nature neuroscience. – 2013. – V. 16. – P. 139–145.
206. Sumi, T. Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha / T. Sumi, K. Matsumoto, A. Shibuya, T. Nakamura // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276. № 25. – P. 23092-23096.
207. Tantama, M. Optogenetic reporters: Fluorescent protein-based genetically encoded indicators of signaling and metabolism in the brain / M. Tantama, Y.P. Hung, G. Yellen // Progress in Brain Research. – 2012. – V. 196. – P. 235-263.

208. Tastet, J. LIMK2-1 is a hominidae-specific isoform of LIMK2 expressed in central nervous system and associated with intellectual disability / J. Tastet, H. Cuberos, B. Vallée et al. // *Neuroscience*. – 2019. – Feb 10: 399. – P. 199-210.
209. Teipel, S. Cholinergic basal forebrain atrophy predicts amyloid burden in Alzheimer's disease / S. Teipel, H. Heinsen, E. et al. // *Neurobiology of Aging*. – 2014. – V. 35. – P. 482–491.
210. Todorovski, Z. LIMK1 regulates long-term memory and synaptic plasticity via the transcriptional factor CREB / Z. Todorovski, S. Asrar, J. Liu et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2015. – V. 35. № 8. – P. 1316-1328.
211. Tomchik, S.M. Dynamics of learning-related cAMP signaling and stimulus integration in the *Drosophila* olfactory pathway / S.M. Tomchik, R.L. Davis // *Neuron*. – 2009. – V. 64. № 4. – P. 510-521.
212. Tully, T. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila* / T. Tully, T. Preat, S.C. Boynton, M.D. Vecchio // *Cell*. – 1994. – V.79. №1. – P. 35–47.
213. Turner, M.A. Subcortical dementia / M.A. Turner, N.F. Moran, M.D. Kopelman // *British Journal of Psychiatry*. – 2002. – V. 180. – P.148–151.
214. Vertes, R.P. Projections of the median raphe nucleus in the rat / R.P. Vertes, W.J. Fortin, A.M. Crane // *Journal of Comparative Neurology*. – 1999. – V. 407. №4. – P. 555–582.
215. Villalonga, E. LIM Kinases, LIMK1 and LIMK2, are crucial node actors of the cell fate: molecular to pathological features / E. Villalonga, C. Mosrin, T. Normand et al. // *Cells*. – 2023. – V. 12. № 5. – P. 805.
216. Vogt, K. Shared mushroom body circuits underlie visual and olfactory memories in *Drosophila* / K. Vogt, C. Schnaitmann, K.V. Dylla et al. // *Elife*. – 2014. – V. 3. – e02395.
217. von Linstow Roloff, E. Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats / E. von Linstow Roloff, D. Harbaran, J. Micheau et al. // *Neuroscience*. – 2007. – V. 146. № 3. – P. 875-89.

218. Wada, A. Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein / A. Wada, M. Fukuda, M. Mishima, E. Nishida // *EMBO Journal*. – 1998. – V. 17. №6. – P. 1635-1641.
219. Wang, G. Dopaminergic neurons mediate male *Drosophila* courtship motivational state / G. Wang // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2022. – V. 610. – P. 23-29.
220. Wang, W. Lim kinase, a bi-functional effector in injury-induced structural plasticity of synapses / W. Wang, E. Townes-Anderson // *Neural Regeneration Research*. – 2016. – V. 11. № 7. – P. 1029-1032.
221. Wang, Y. Imaging of an early memory trace in the *Drosophila* mushroom body / Y. Wang, A. Mamiya, A. Chiang, Y. Zhong // *The Journal of Neuroscience*. – 2008. – V. 28. № 17. – P. 4368–4376.
222. Wang, Y. PAK2 haploinsufficiency results in synaptic cytoskeleton impairment and autism-related behavior / Y. Wang, C. Zeng, J. Li et al. // *Cell Reports*. – 2018. – V. 24. № 8. – P. 2029-2041.
223. Wang, Y. Phosphorylation of cofilin regulates extinction of conditioned aversive memory via AMPAR trafficking / Y. Wang, Q. Dong, X.-F. Xu et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2013. – V. 33. № 15. – P. 6423-6433.
224. Winbush, A. Identification of gene expression changes associated with long-term memory of courtship rejection in *Drosophila* males / A. Winbush, D. Reed, P.L. Chang et al. // *G3: Genes Genomes Genetics* (Bethesda). – 2012. – V. 2. № 11. – P. 1437-1445.
225. Witter, M.P. Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways / M.P. Witter, P.A. Naber, T. van Haeften et al. // *Hippocampus*. – 2000. – V. 10. – P. 398–410.
226. Wolf, M. ADF/cofilin controls synaptic actin dynamics and regulates synaptic vesicle mobilization and exocytosis / M. Wolf, A.M. Zimmermann, A. Görlich et al. // *Cerebral Cortex*. – 2015. – V. 25. – P. 2863-2875.
227. Yang, E.J. LIM kinase 1 activates cAMP-responsive element-binding protein during the neuronal differentiation of immortalized hippocampal progenitor cells / E.J.

- Yang, J.H. Yoon, D.S. Min, K.C. Chung // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. № 10. – P. 8903-8910.
228. Yang, N. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization / N. Yang, O. Higuchi, K. Ohashi et al. // *Nature*. – 1998. – V. 393. № 6687. – P. 809-812.
229. Yang, N. Nuclear export of LIM-kinase 1, mediated by two leucine-rich nuclear-export signals within the PDZ domain / N. Yang, K. Mizuno // *Biochemical Journal*. – 1999. – V. 338. Pt 3. – P. 793-798.
230. Yang, C. Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization / C. Yang, M. Huang, J. DeBiasio // *Journal of Cell Biology*. – 2000. – V. 150. № 5. – P. 1001-1012.
231. Yasuyama, K. Synaptic organization of the mushroom body calyx in *Drosophila melanogaster* / K. Yasuyama, I.A. Meinertzhagen, F.W. Schürmann // *The Journal of Comparative Neurology*. – 2002. – V. 445. № 3. – P. 211-226.
232. Yi, W. A subset of cholinergic mushroom body neurons requires Go signaling to regulate sleep in *Drosophila* / W. Yi, Y. Zhang, Y. Tian et al. // *Sleep*. – 2013. – V. 36. – P. 1809-1821.
233. Yokoo, T. p57Kip2 regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus / T. Yokoo, H. Toyoshima, M. Miura et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. № 52. – P. 52919-52923.
234. You, T. Overexpression of LIMK1 promotes tumor growth and metastasis in gastric cancer / T. You, W. Gao, J. Wei et al. // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2015. – V. 69. – P. 96-101.
235. Yu, D. *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning / D. Yu, A.C. Keene, A. Srivatsan et al. // *Cell*. – 2005. – V. 123. № 5. – P. 945–957.
236. Yu, J.Y. Cellular organization of the neural circuit that drives *Drosophila* courtship behavior / J.Y. Yu, M.I. Kanai, E. Demir // *Current-biology*. – 2010). – V. 20. – P. 1602-1614.

237. Zamboni, F. The potential of hyaluronic acid in immunoprotection and immunomodulation: Chemistry, processing and function / F. Zamboni, S. Vieira, R.L. Reis et al. // *Progress in Materials Science*. – 2018. – V. 97. – P. 97-122.
238. Zatssepina O.G. Hsp70 affects memory formation and behaviorally relevant gene expression in *Drosophila melanogaster* / O.G. Zatssepina, E.A. Nikitina, V.Y. Shilova et.al // *Cell Stress Chaperones*. – 2021. – V. 26 № 3. – p. 575-594.
239. Zhang, H. Overexpression of LIMK1 in hippocampal excitatory neurons improves synaptic plasticity and social recognition memory in APP/PS1 mice / H. Zhang, Y. Ben Zablah, A. Liu et al. // *Molecular Brain*. – 2021. – V. 14. № 1. – P. 121-136.
240. Zhou, Z. A critical role of Rho-kinase ROCK2 in the regulation of spine and synaptic function / Z. Zhou, Y. Meng, S. Asrar et al. // *Neuropharmacology*. – 2009. – V. 56. № 1. – P. 81-89.
241. Zhuravlev A.V. 3-hydroxykynurenine as a potential ligand for HSP70 proteins and its effects on *Drosophila* memory after heat shock / A.V. Zhuravlev, B.F. Shchegolev, G.A. Zakharov et al. // *Molecular Neurobiology*. – 2022. – Vol. 59, No. 3. – P. 1862-1871.
242. 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 // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2023. – V. 27. № 3. – С. 250-263.
243. 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 // *Biochemistry (Moscow)*. – 2024. – V. 89. № 3. – P. 393-406.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Таблица I.1. Особенности 5'-регуляторной области и экзон-интронных областей
Drosophila melanogaster линий *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R* и *agn^{ts3}*

Особенности 5'-регуляторной области и области инициации транскрипции гена <i>limk1</i>					
Позиция нуклеотида в гене	Позиция нуклеотида относительно старта транскрипции (+1)	<i>Canton-S</i>	<i>Berlin</i>	<i>Oregon-R</i>	<i>agn^{ts3}</i>
1801	-197	C/T	-	-	C/T
1930	-68	A/T	A/T	-	A/T
1934	-64	G/T	G/T	-	G/T
1941	-57	A/T	-	-	-
2010	+12	C/T	C/T	-	C/T
2110	+112	C/T	-	-	C/T
Особенности структурной области гена <i>limk1</i>					
Позиция нуклеотида в гене	Структурная область гена	<i>Canton-S</i>	<i>Berlin</i>	<i>Oregon-R</i>	<i>agn^{ts3}</i>
3263	Интрон 1	C/T	-	C/T	C/T
3341		-	-	Инсерция А	Инсерция А
3353		-	-	Инсерция АТTCGATTCTTT АТТАТТТАТТАТТАТ	
3355		-	G/A	-	-
3379		-	-	A/G	A/G
3387		-	-	C/A	C/A
3401		-	G/A	-	-
3404		-	-	Делеция ААСАСТТАА	
3450		-	-	A/G	A/G
3525		-	-	G/A	G/A
3641		-	G/C	-	-
3636		-	-	A/T	A/T
3671		-	-	Делеция Т	Делеция Т
3892		Экзон 2	C/T	-	-
4105	-		-	-	G/A
4394	Интрон 2	-	-	A/T	-
5002	Интрон 3	T/C	-	-	T/C
5003		A/T	-	-	A/T
5070	Экзон 4	G/A	-	-	G/A
5318		G/A	-	G/A	-
5829		-	-	G/A	-
5942		-	-	C/G	-
6032		-	-	C/T	-
6101		C/T	-	C/T	-
6227	Интрон 4	A/G	-	A/G	-
6238		A/T	-	A/T	-

6242		T/C	-	T/C	-
6347	Экзон 5	C/T	-	C/T	-
6386		T/C	-	T/C	-
6392		T/C	-	T/C	-
6422		G/A	-	G/A	-

ПРИЛОЖЕНИЕ II

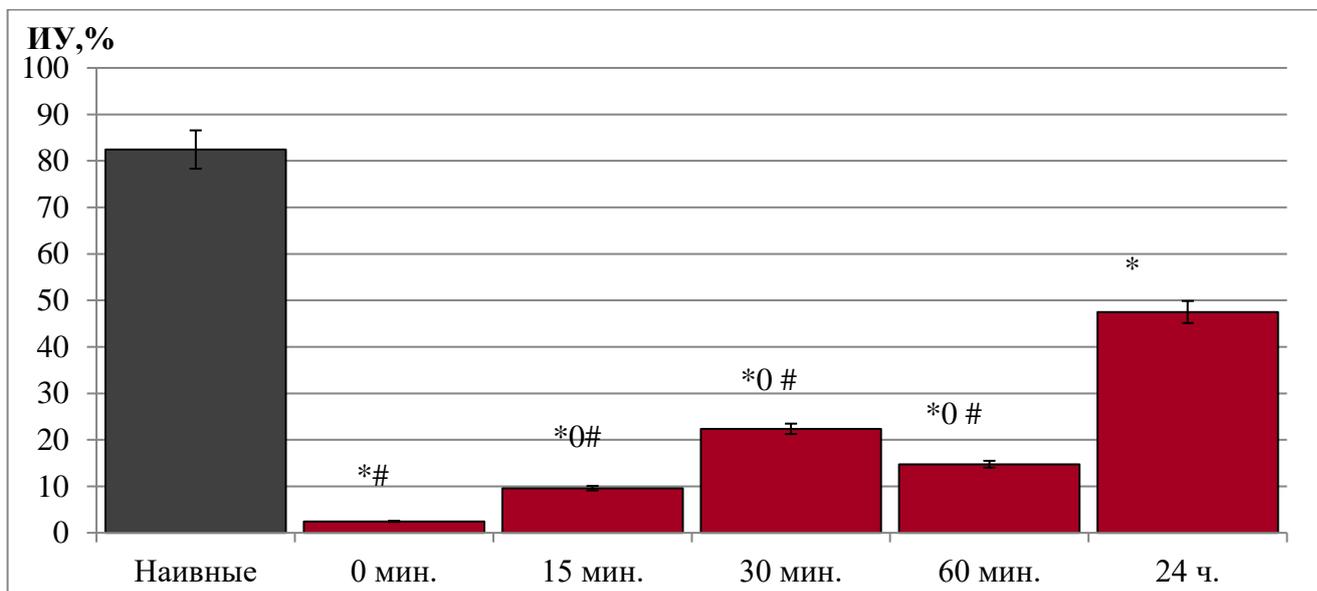


Рисунок I.1. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс ухаживания, % . * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, # - достоверно отличается от 24 ч, ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

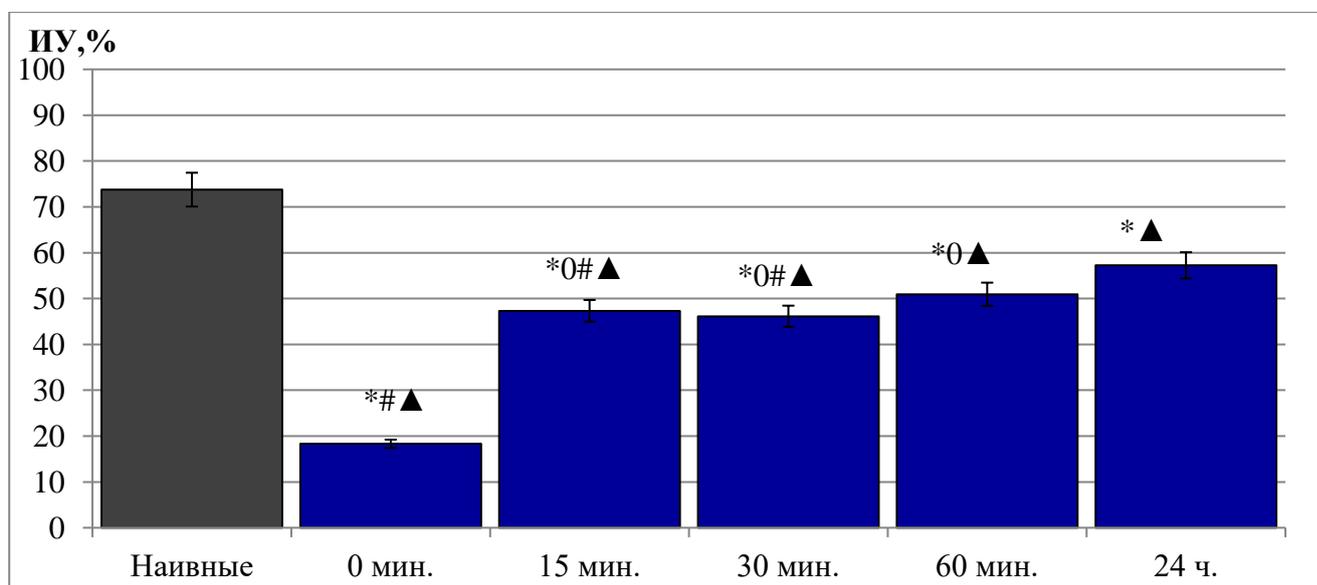


Рисунок I.2. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Berlin*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс ухаживания, % . * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, # - достоверно отличается от 24 ч, ▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

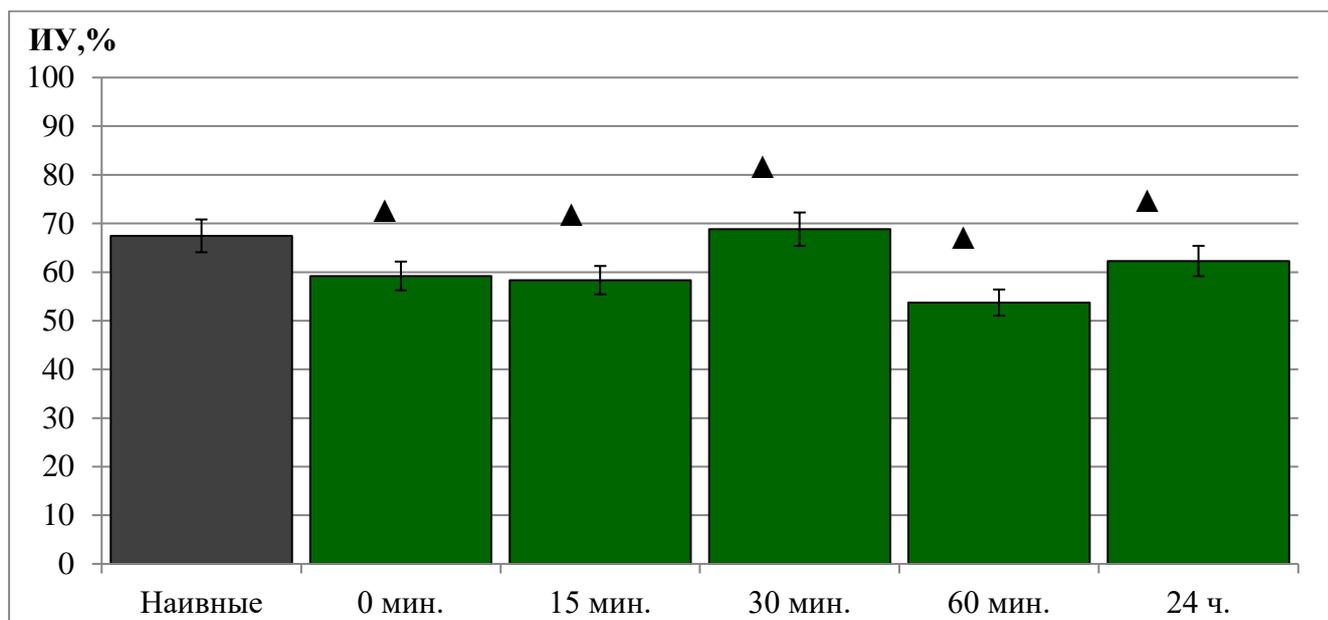


Рисунок I.3. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Oregon-R*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс ухаживания, %. ▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

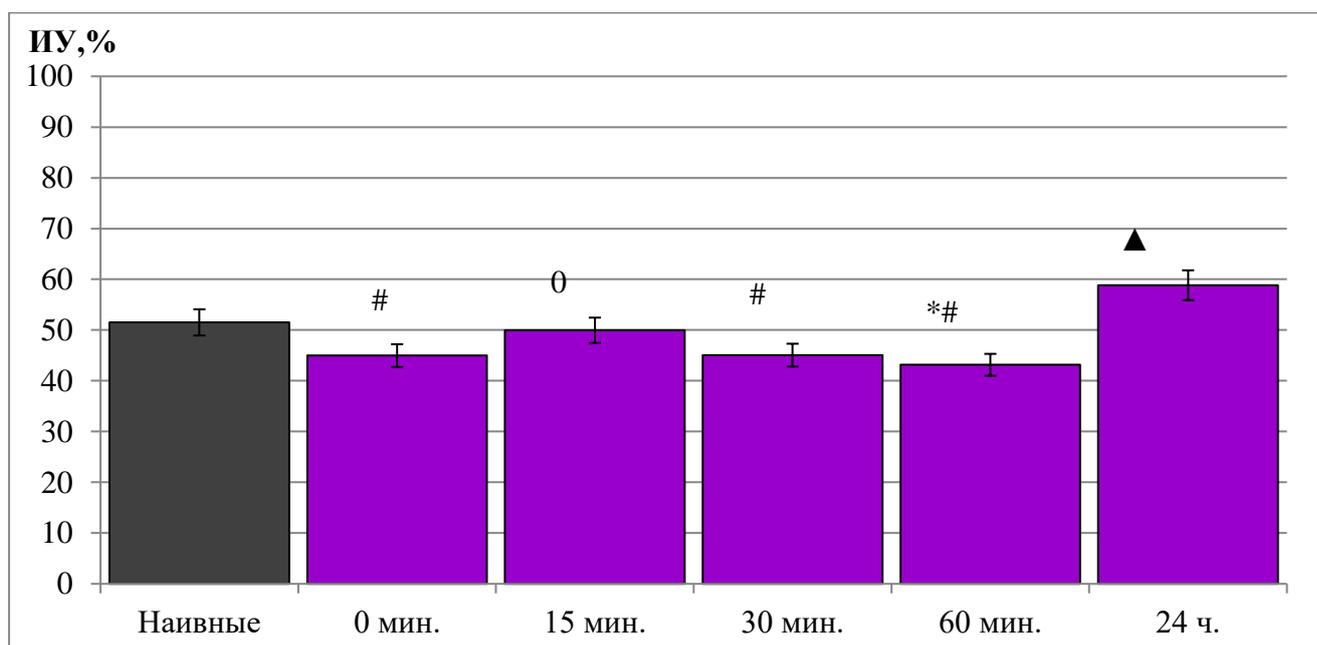


Рисунок I.4. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии *agn^{ts3}*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс ухаживания, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, # - достоверно отличается от 24 ч, ▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

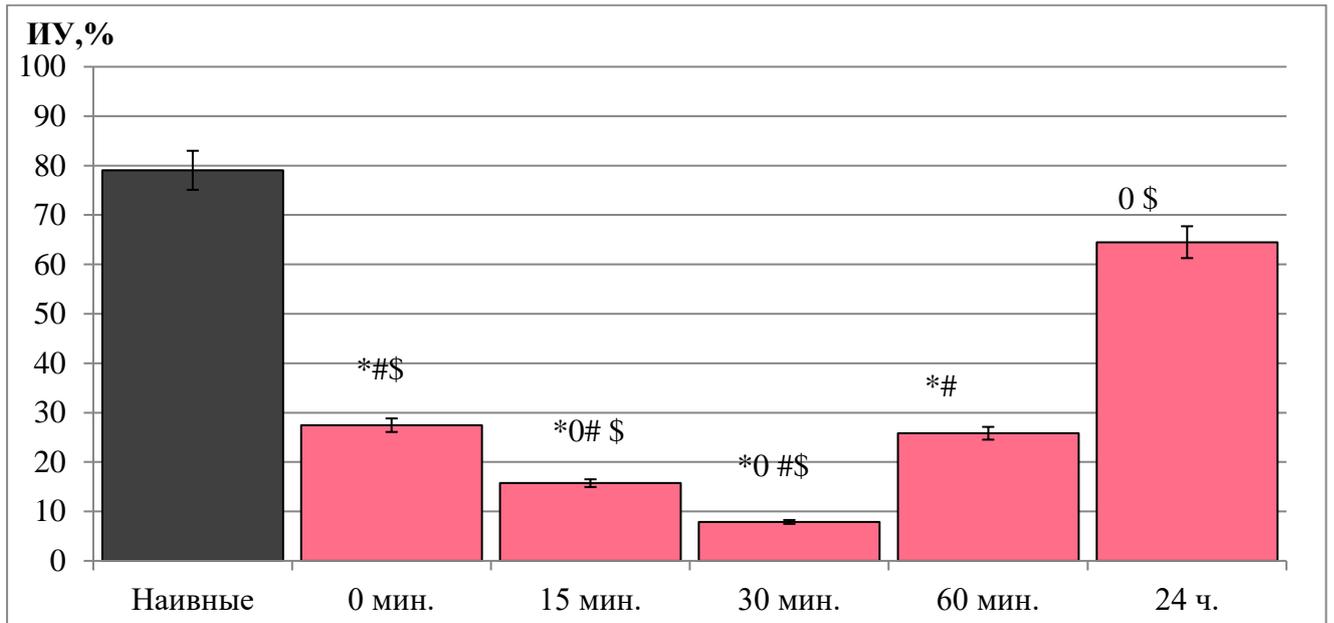


Рисунок I.5. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S* при воздействии тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс ухаживания, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, # - достоверно отличается от 24 ч, \$ - достоверно отличается от интактного контроля ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

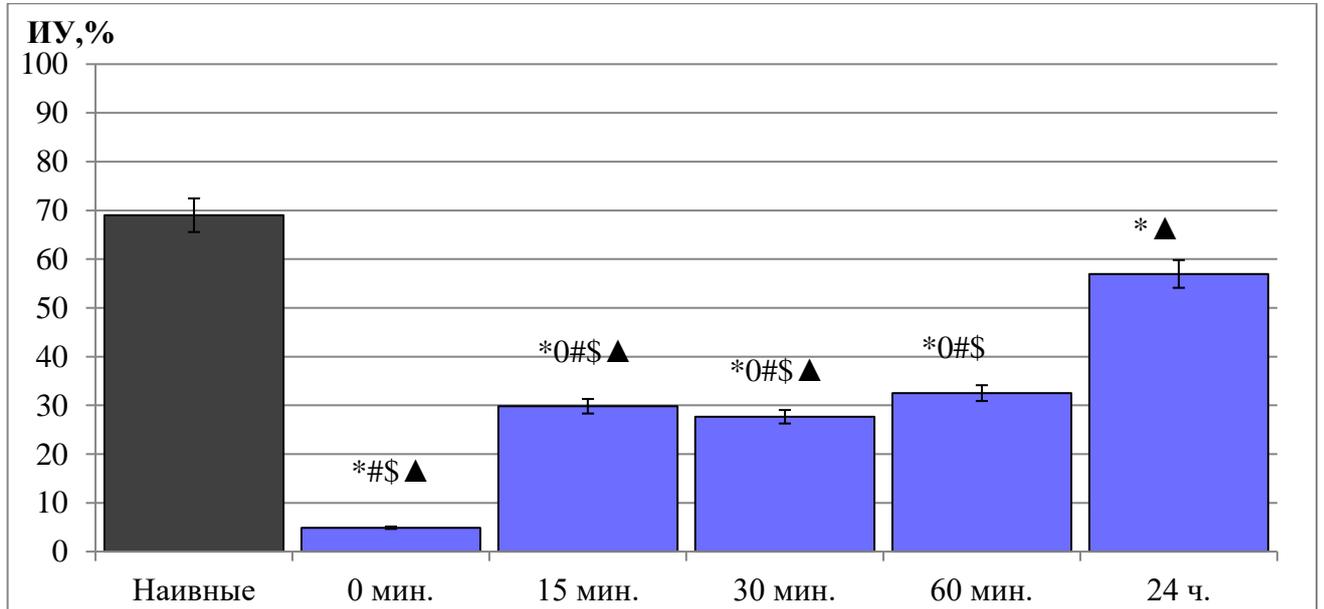


Рисунок I.6. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Berlin* при воздействии тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс ухаживания, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, # - достоверно отличается от 24 ч, \$ - достоверно отличается от интактного контроля, ▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

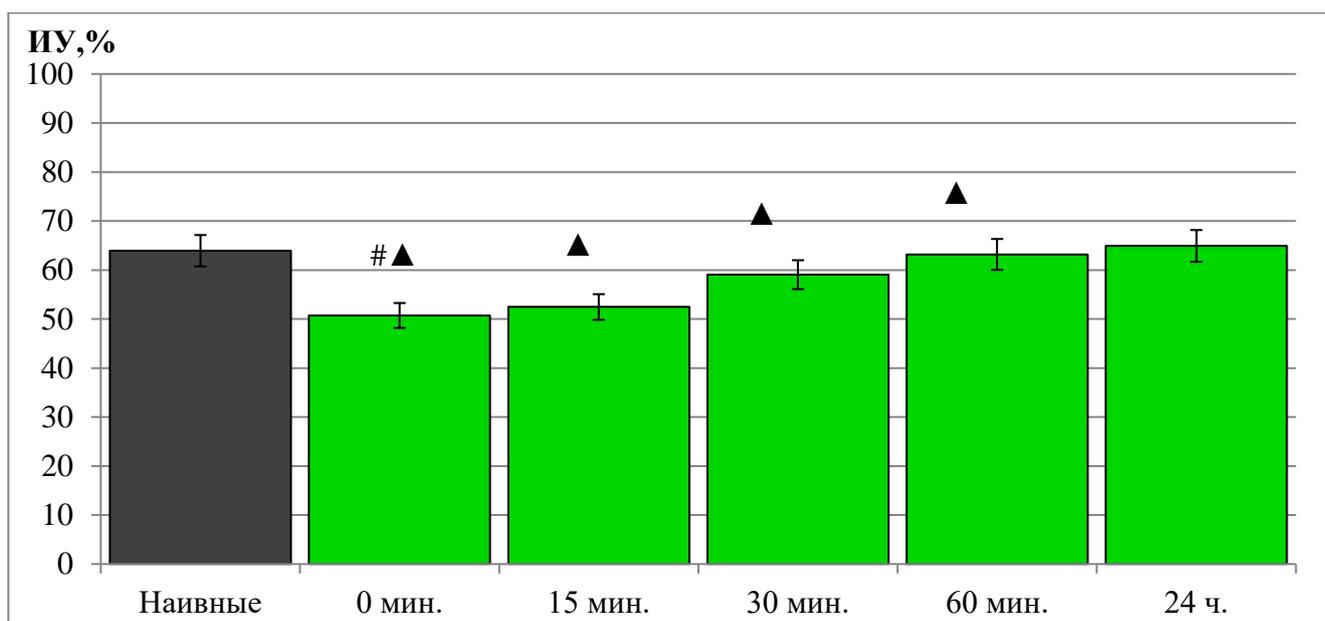


Рисунок I.7. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Oregon-R* при воздействии тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс ухаживания, %. ▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

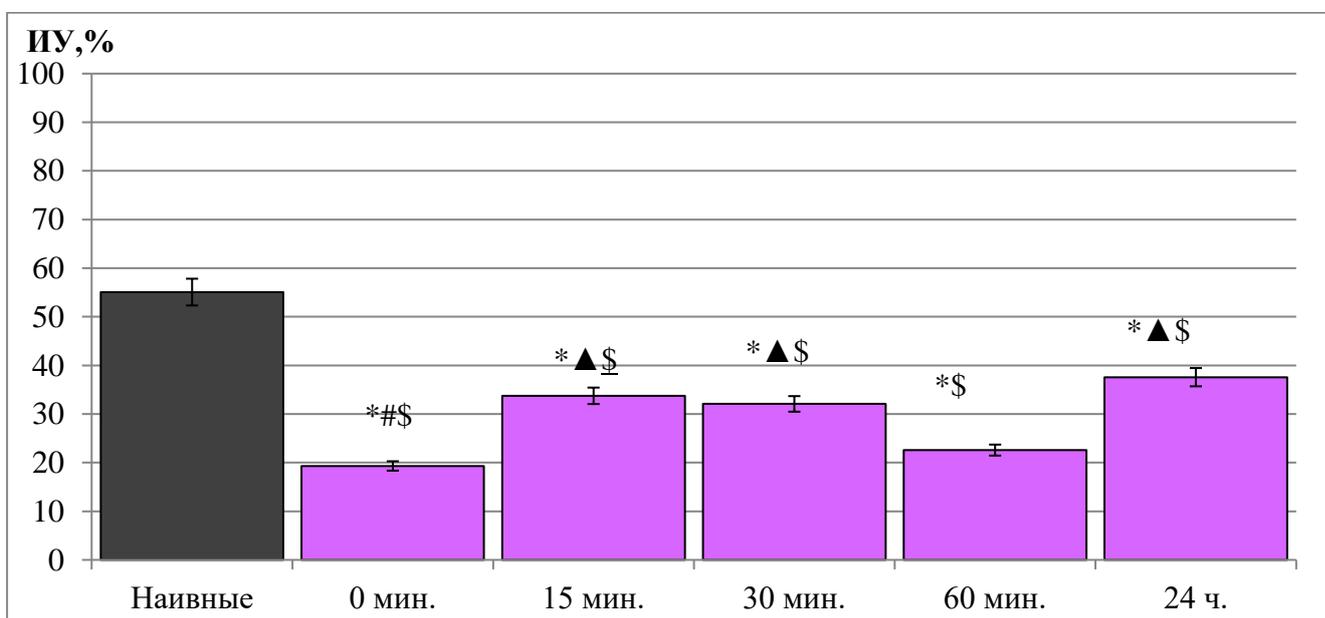


Рисунок I.8. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии *agn^{ts3}* при воздействии тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс ухаживания, %. * - достоверно отличается от наивных мух, # - достоверно отличается от 24 ч, \\$ - достоверно отличается от интактного контроля, ▲ - достоверно отличается от *Canton-S* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

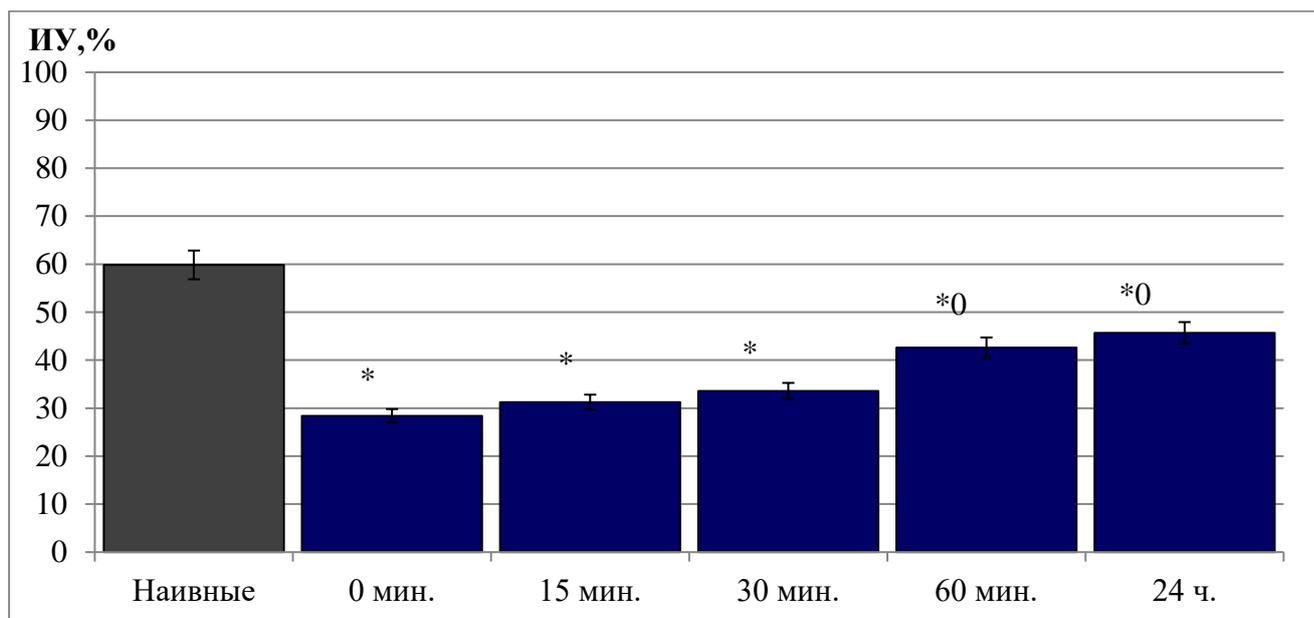


Рисунок I.9. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии без изменения экспрессии гена *limk1* в нервной системе. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

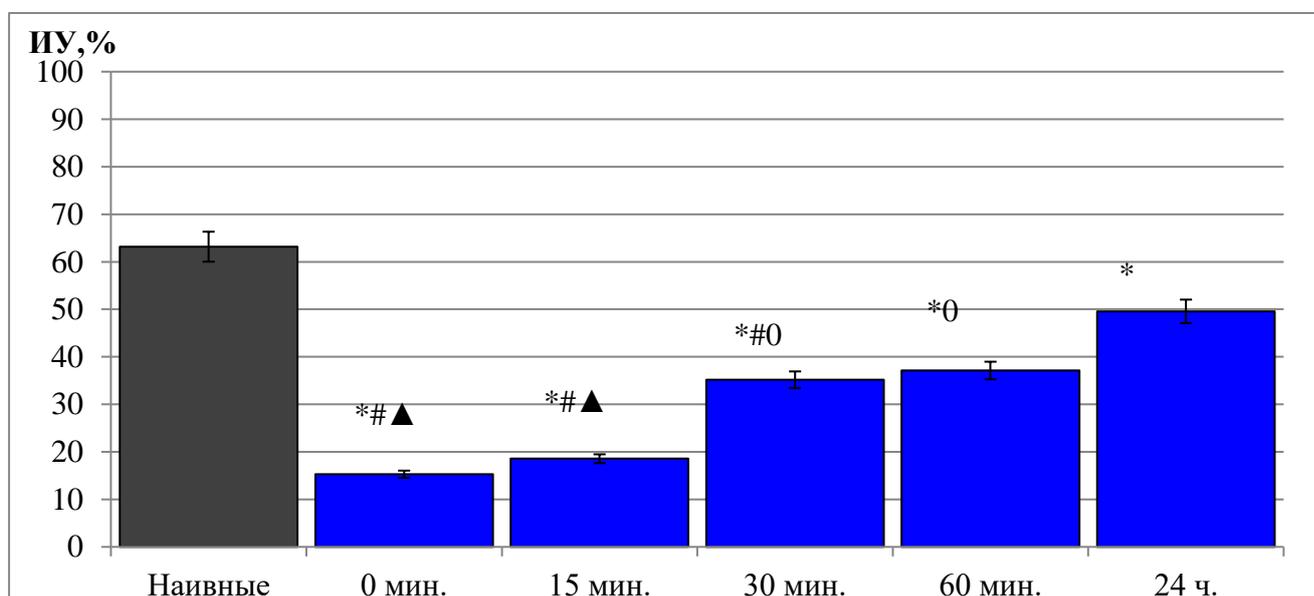


Рисунок I.10. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии с подавлением экспрессии гена *limk1* в нервной системе. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, # - достоверно отличается от 24 ч, ▲ - достоверно отличается от контроля ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

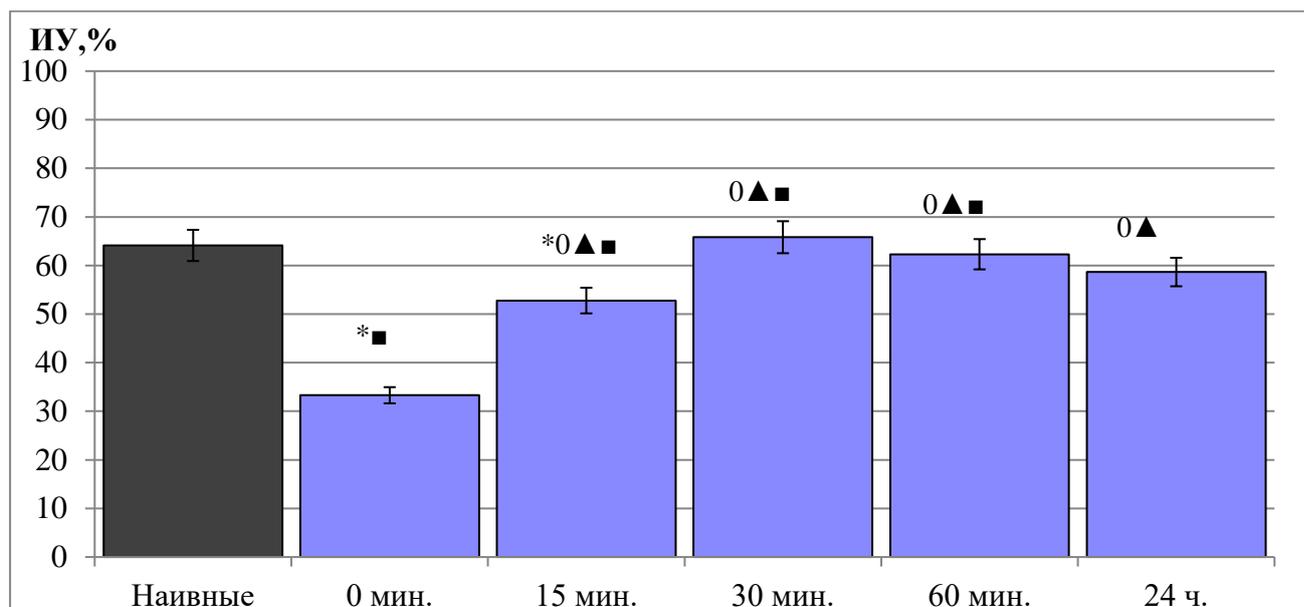


Рисунок I.11. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии с активацией экспрессии гена *limk1* в нервной системе. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, ▲ - достоверно отличается от контроля, ■ - достоверно отличается от линии с подавлением *limk1* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

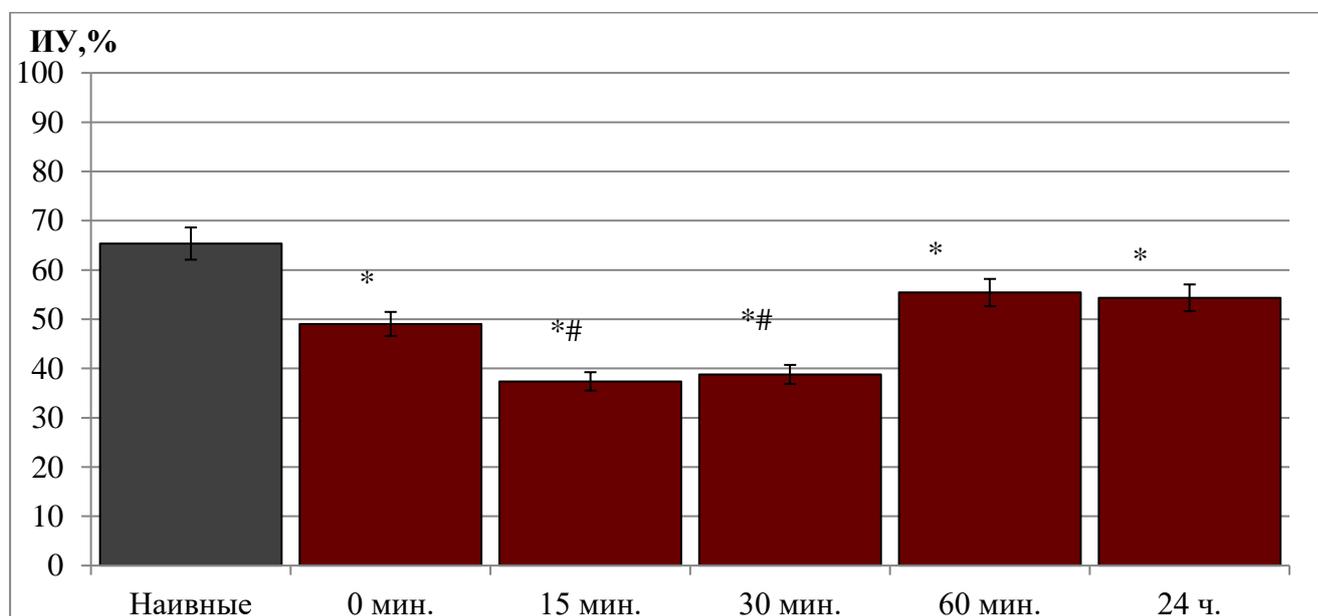


Рисунок I.12. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии без изменения экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, # - достоверно отличается от 24 ч ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

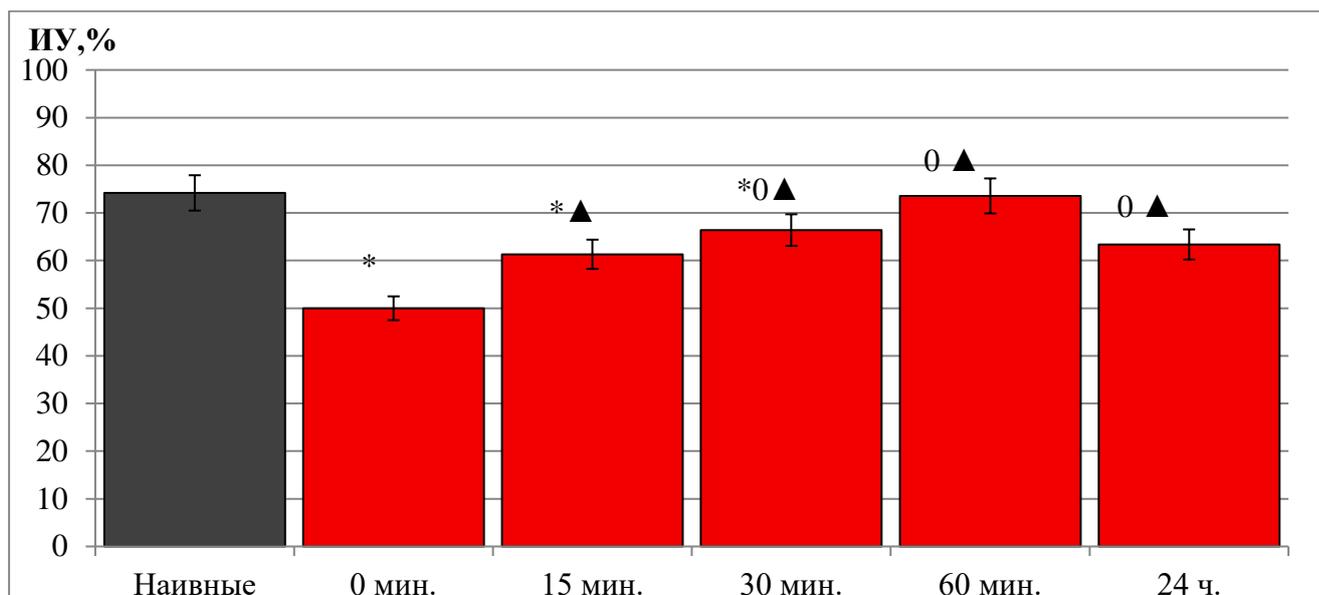


Рисунок I.13. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии с подавлением экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, ▲ - достоверно отличается от контроля ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

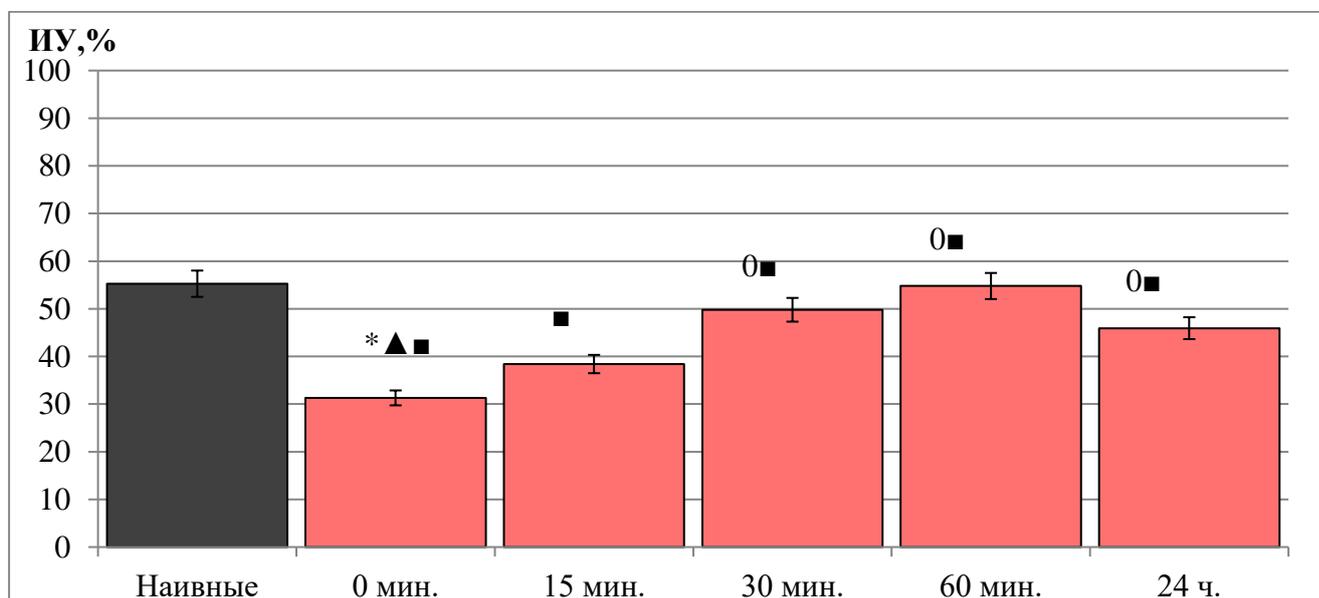


Рисунок I.14. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии с активацией экспрессии гена *limk1* в холинергических нейронах. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, ▲ - достоверно отличается от контроля, ■ - достоверно отличается от линии с подавлением *limk1* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

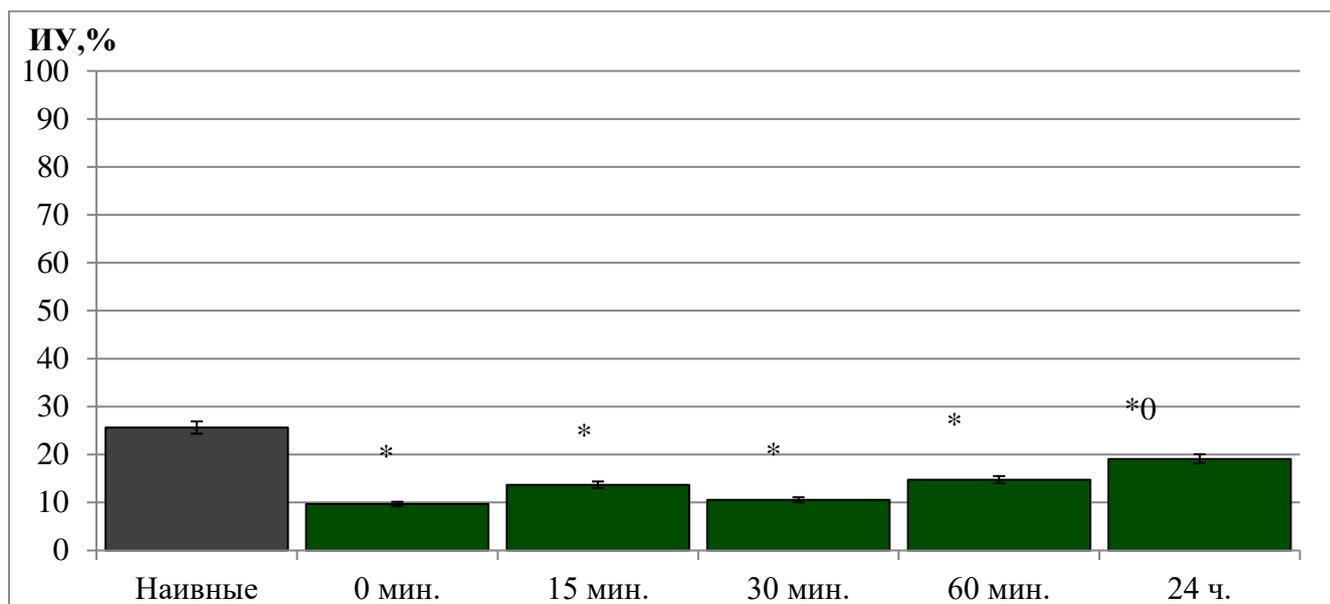


Рисунок I.15. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии без изменения экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

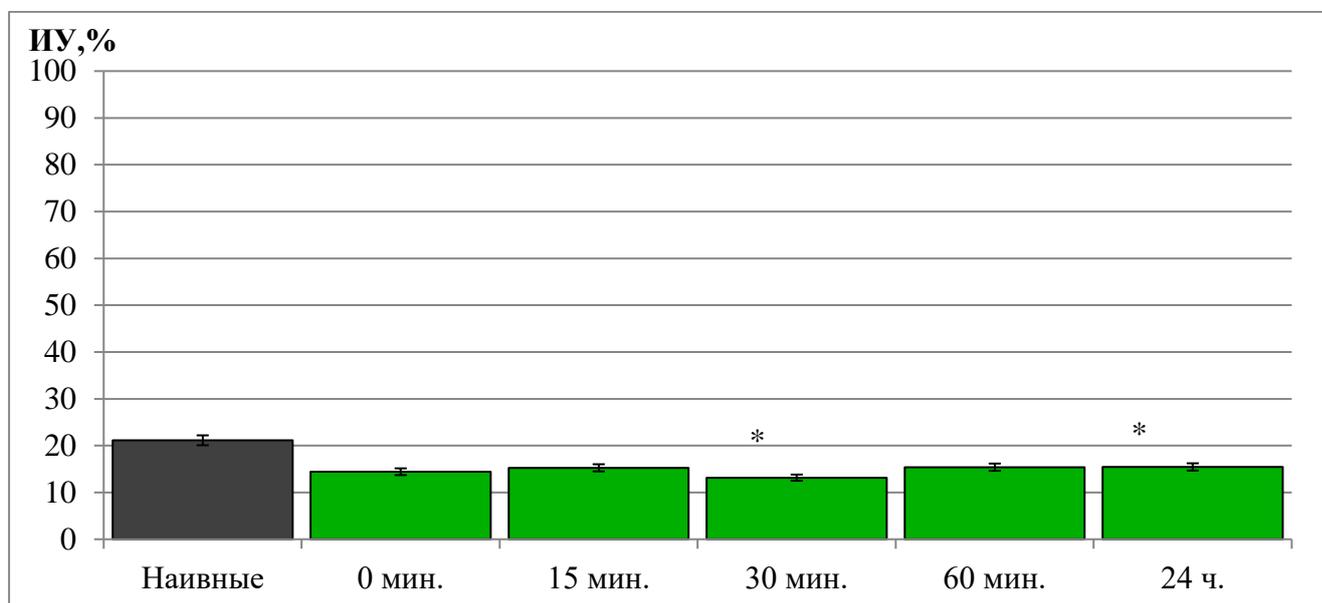


Рисунок I.16. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии с подавлением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

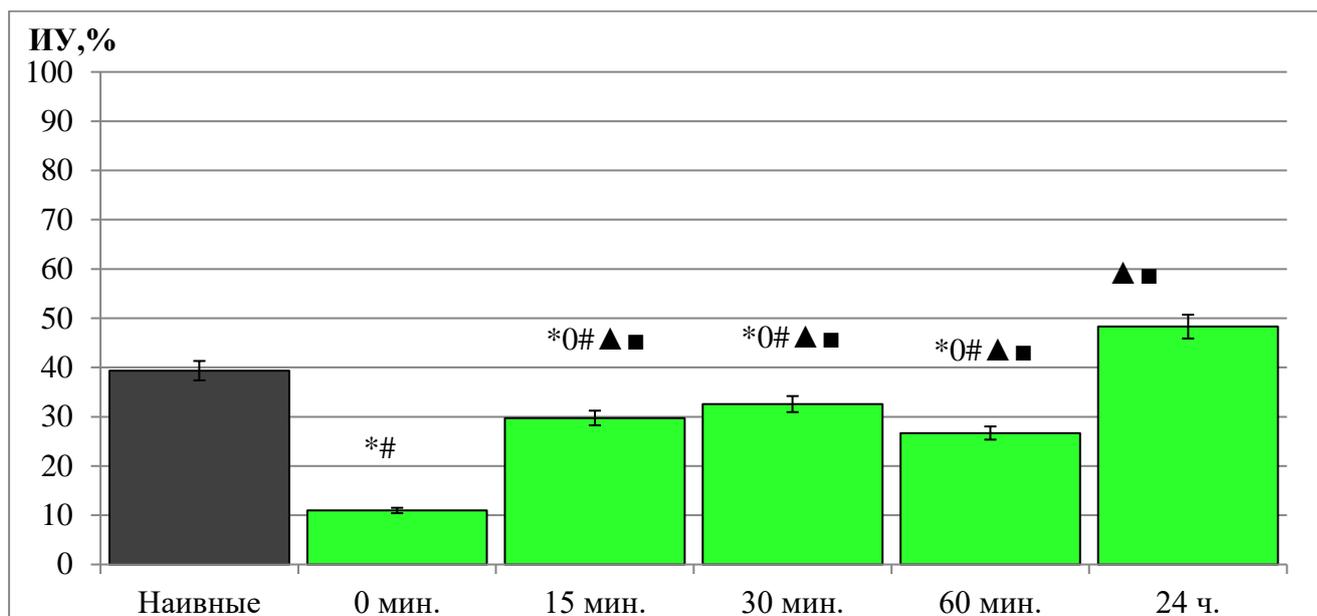


Рисунок I.17. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии с активацией экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, # - достоверно отличается от 24 ч, ▲ - достоверно отличается от контроля, ■ - достоверно отличается от линии с подавлением *limk1* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

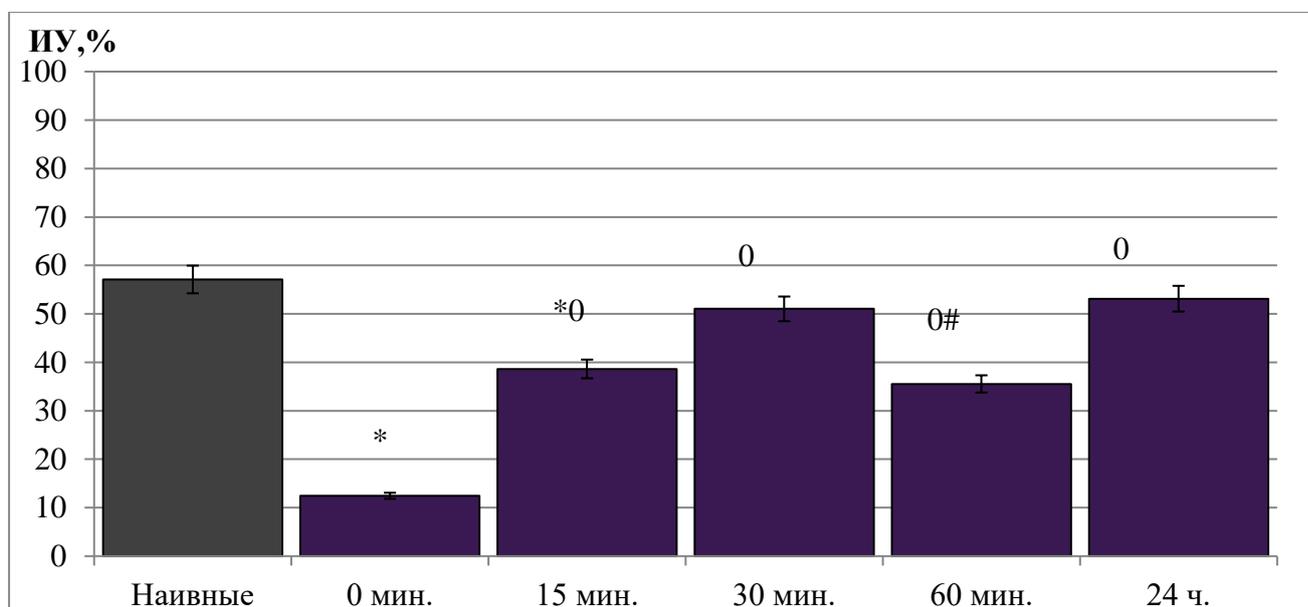


Рисунок I.18. Индексы ухаживания *D. melanogaster* линии без изменения экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, 0 - достоверно отличается от 0 мин, # - достоверно отличается от 24 ч ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

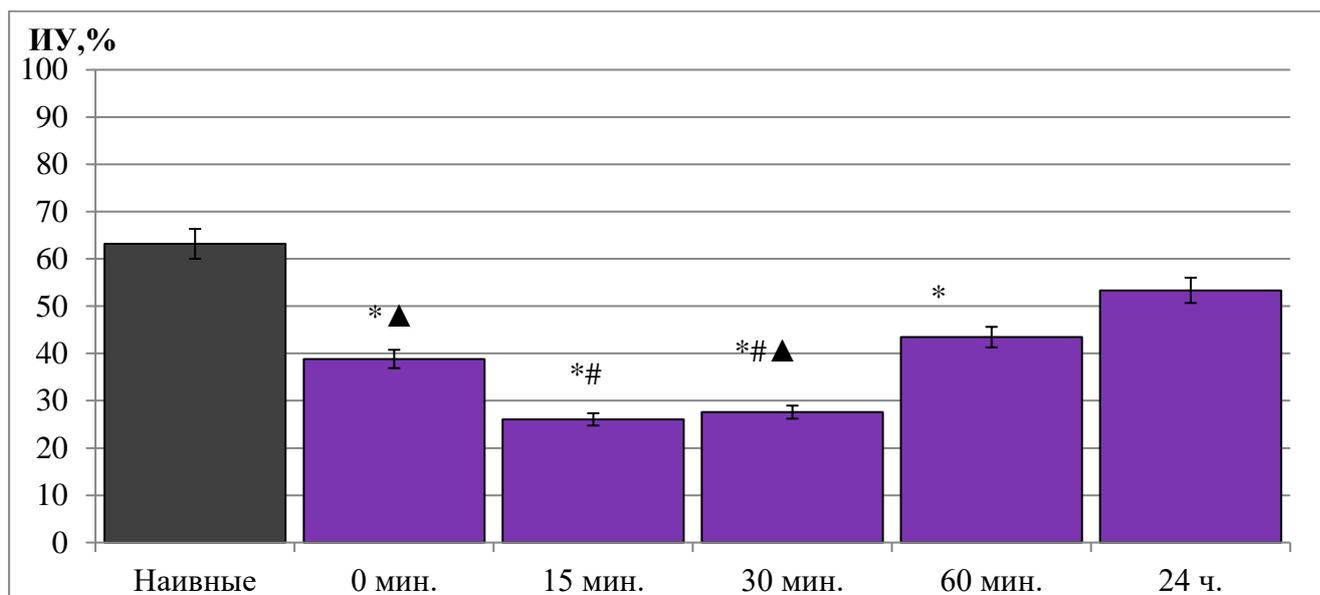


Рисунок I.19. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии с подавлением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, # - достоверно отличается от 24ч, ▲ - достоверно отличается от контроля ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

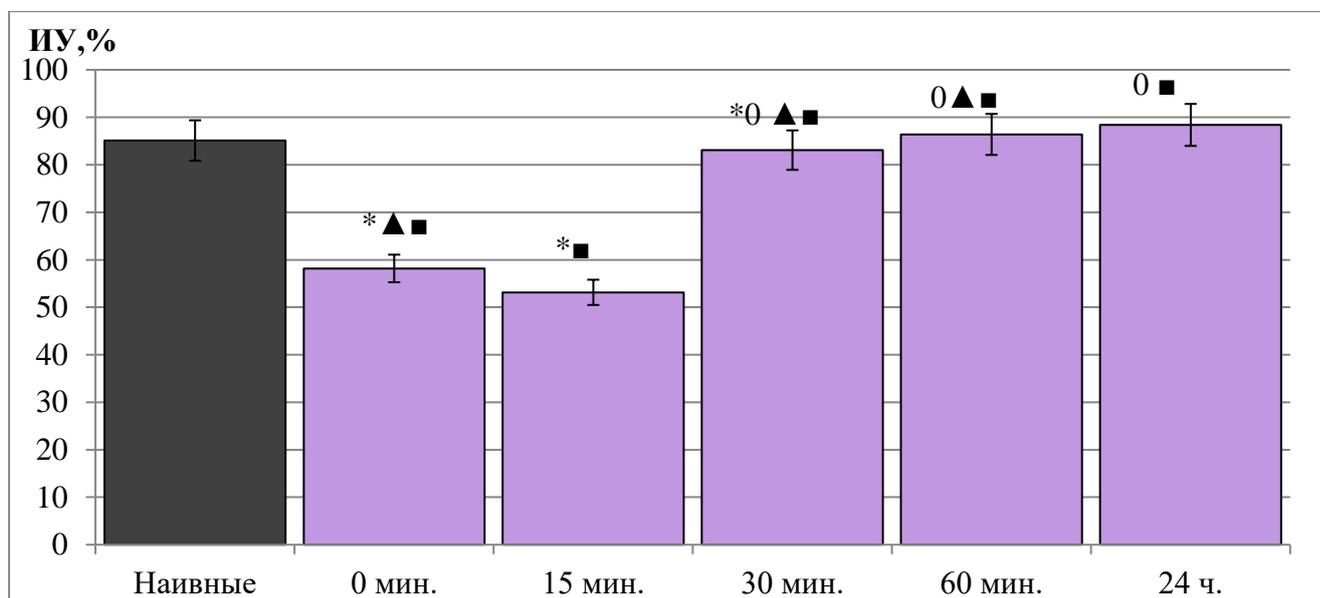


Рисунок I.20. Индексы ухаживания *Drosophila melanogaster* линии с активацией экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИУ - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от наивных мух, # - достоверно отличается от 24ч, ▲ - достоверно отличается от контроля, ■ - достоверно отличается от линии с подавлением *limk1* ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

ПРИЛОЖЕНИЕ III

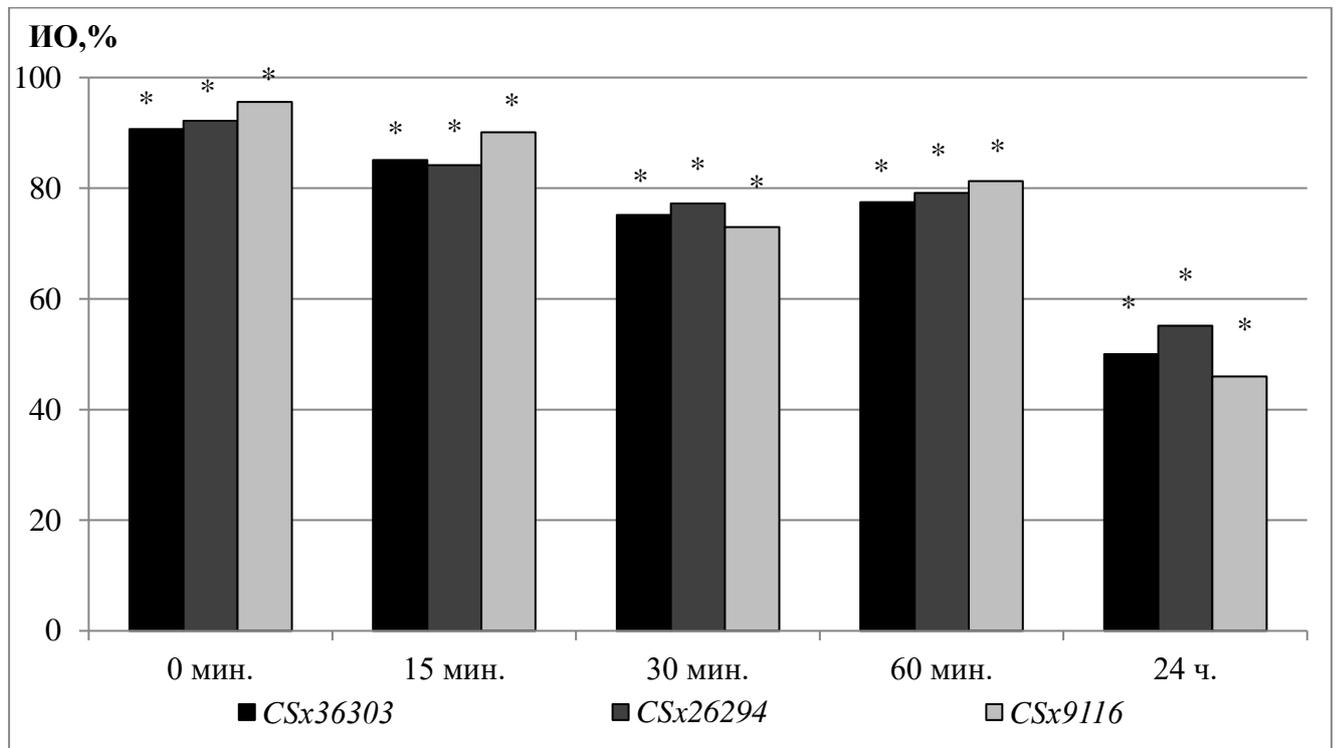


Рисунок II.1. Индексы обучения мух, полученных от контрольных скрещиваний линии дикого типа *Canton-S* с линиями, несущими энхансер UAS. По оси абсцисс: время после завершения тренировки, мин; по оси ординат: ИО - индекс обучения, %. * - достоверно отличается от 0, ($p \leq 0,05$, двусторонний тест рандомизации).

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

Таблица IV.1. Анализ распределения LIMK1 в различных структурах мозга *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нервной системе

		Контроль							
Интенс-ть флуоресц-и LIMK1, у.е.		Достоверные отличия							
		АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД	
1.14	АД								
1.21	ПР	-							
1.10	γЛ	-	-						
0.90	βЛ	+	+	+					
0.95	αЛ	-	+	+	-				
1.04	ЭТ	-	-	-	+	+			
0.89	ПД	+	+	+	-	-	+		

		Подавление							Активация								
Интенс-ть флуоресц-и LIMK1, у.е.		Достоверные отличия							Интенс-ть флуорес-и LIMK1, у.е.		Достоверные отличия						
		АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД			АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД
1.04	АД								1.05	АД							
1.04	ПР	-							1.09	ПР	-						
0.98	γЛ	+	+						1.10	γЛ	-	-					
0.89	βЛ	+	+	+					1.05	βЛ	-	-	-				
0.93	αЛ	+	+	-	-				0.91	αЛ	+	+	-	-			
0.96	ЭТ	+	+	-	+	-			0.86	ЭТ	+	+	+	+	-		
0.87	ПД	+	+	-	-	-	-		0.89	ПД	+	+	+	+	-	-	

Примечание: АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γЛ – γ лопасти грибовидных тел, βЛ - β лопасти грибовидных тел, αЛ – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПД – педункулюсы. + - выявлены достоверные отличия ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Таблица IV.2. Анализ распределения LIMK1 в различных структурах мозга *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1b* холинергических нейронах

Интенс-ть флуоресц-и LIMK1, у.е.		Контроль						
		Достоверные отличия						
		АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД
0.99	АД							
0.92	ПР	-						
0.92	γЛ	-	-					
1.00	βЛ	-	-	-				
0.93	αЛ	+	-	-	-			
0.88	ЭТ	+	-	-	+	-		
0.84	ПД	-	-	-	+	-	-	

Интенс-ть флуоресц-и LIMK1, у.е.		Подавление							Интенс-ть флуорес-и LIMK1, у.е.		Активация						
		Достоверные отличия									Достоверные отличия						
		АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД			АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД
0.99	АД								1.01	АД							
1.05	ПР	-							0.98	ПР	-						
0.96	γЛ	-	-						0.90	γЛ	+	-					
0.84	βЛ	+	+	-					0.88	βЛ	+	-	-				
0.94	αЛ	-	-	-	-				0.91	αЛ	+	-	-	-			
0.83	ЭТ	+	+	+	-	-			0.89	ЭТ	+	-	-	-	-		
0.87	ПД	+	+	-	-	-	-		0.90	ПД	-	-	-	-	-	-	

Примечание: АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γЛ – γ лопасти грибовидных тел, βЛ - β лопасти грибовидных тел, αЛ – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПД – педункулы. + - выявлены достоверные отличия ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Таблица IV.3. Анализ распределения LIMK1 в различных структурах мозга *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в серотонинергических и дофаминергических нейронах

		Контроль							
Интенс-ть флуоресц-и LIMK1, у.е.		Достоверные отличия							
		АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД	
1.04	АД								
0.95	ПР	-							
0.91	γЛ	-	-						
0.97	βЛ	-	-	-					
1.01	αЛ	-	-	-	-				
1.02	ЭТ	-	-	-	-	-			
0.93	ПД	-	-	-	-	-	-		

		Подавление								Активация									
Интенс-ть флуоресц-и LIMK1, у.е.		Достоверные отличия								Интенс-ть флуорес-и LIMK1, у.е.		Достоверные отличия							
		АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД		АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД			
1.03	АД									1.04	АД								
1.00	ПР	-								1.12	ПР	-							
1.03	γЛ	-	-							0.94	γЛ	-	+						
1.00	βЛ	-	-	-						0.98	βЛ	-	+	-					
0.93	αЛ	+	-	-	-					0.94	αЛ	-	+	-	-				
0.98	ЭТ	-	-	-	-	-				0.96	ЭТ	-	+	-	-	-			
0.89	ПД	+	-	-	-	-	-			0.80	ПД	+	+	+	+	+	+		

Примечание: АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γЛ – γ лопасти грибовидных тел, βЛ - β лопасти грибовидных тел, αЛ – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПД – педункулы. + - выявлены достоверные отличия ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Таблица IV.4. Анализ распределения LIMK1 в различных структурах мозга *Drosophila melanogaster* линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless*

		Контроль							
Интенс-ть флуоресц-и LIMK1, у.е.		Достоверные отличия							
		АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД	
1.02	АД								
1.06	ПР	-							
1.05	γЛ	-	-						
1.02	βЛ	-	-	-					
0,87	αЛ	+	+	+	+				
0.93	ЭТ	-	-	-	-	-			
0.83	ПД	+	+	+	+	-	+		

		Подавление							Активация								
Интенс-ть флуоресц-и LIMK1, у.е.		Достоверные отличия							Интенс-ть флуорес-и LIMK1, у.е.		Достоверные отличия						
		АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД			АД	ПР	γЛ	βЛ	αЛ	ЭТ	ПД
1.04	АД								1.00	АД							
1.09	ПР	-							1.02	ПР	-						
0.92	γЛ	-	-						1.00	γЛ	-	-					
1.03	βЛ	-	-	-					0.95	βЛ	-	-	-				
0.92	αЛ	-	-	-	-				0.96	αЛ	-	-	-	-			
0.96	ЭТ	-	-	-	-	-			1.04	ЭТ	-	-	-	-	-		
0.99	ПД	-	-	-	-	-	-		0.91	ПД	-	-	-	-	-	-	

Примечание: АД – антеннальные доли, ПР – протоцеребрум, γЛ – γ лопасти грибовидных тел, βЛ - β лопасти грибовидных тел, αЛ – α лопасти грибовидных тел, ЭТ – эллипсоидное тело, ПД – педункулюсы. + - выявлены достоверные отличия ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни).