



УДК 575.224

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-3-318-327>

Обучение и забывание у *Drosophila melanogaster* при полиморфизме по гену *limk1*

Е. С. Заломаева^{✉1,2}, В. С. Фалина², А. В. Медведева¹,
Е. А. Никитина^{1,2}, Е. В. Савватеева-Попова¹

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

² Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, 191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. реки Мойки, д. 48

Сведения об авторах

Екатерина Сергеевна Заломаева,
SPIN-код: 2075-1823,
Scopus AuthorID: 57203001032,
ResearcherID: AAB-7658-2021,
ORCID: 0000-0002-6005-3433,
e-mail: Zalomaeva.E@yandex.ru

Варвара Сергеевна Фалина,
e-mail: varvara.falina@gmail.com

Анна Владимировна Медведева,
SPIN-код: 4291-9615,
Scopus AuthorID: 16689705800,
ORCID: 0000-0001-7989-8746,
e-mail: avmed56@mail.ru

Екатерина Александровна
Никитина,
SPIN-код: 7844-8621,
Scopus AuthorID: 56603106300,
ResearcherID: L-5761-2014,
ORCID: 0000-0003-1897-8392,
e-mail: 21074@mail.ru

Елена Владимировна
Савватеева-Попова,
SPIN-код: 2559-4778,
Scopus AuthorID: 6603078303,
e-mail: esavvateeva@mail.ru

Для цитирования:

Заломаева, Е. С., Фалина, В. С.,
Медведева, А. В., Никитина, Е. А.,
Савватеева-Попова, Е. В.

(2021) Обучение и забывание
у *Drosophila melanogaster* при
полиморфизме по гену *limk1*.
Интегративная физиология,
т. 2, № 3, с. 318–327.

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-3-318-327>

Получена 26 июня 2021; прошла
рецензирование 2 августа 2021;
принята 3 августа 2021.

Финансирование: Работа
выполнена при поддержке
Государственной программы РФ
47 ГП «Научно-технологическое
развитие Российской Федерации»
(2019–2030) (тема 63.1) и гранта
РФФИ (№ 20-015-00300 А).

Аннотация. В настоящее время нейродегенеративные заболевания (НДЗ) имеют весьма широкое распространение. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2015 году деменция затронула 47 млн человек во всем мире, и, по прогнозам, эта цифра к 2030 году достигнет 75 млн, а к 2050 году — 132 млн. Нейрофизиологи во всем мире стремятся познать этиологию и патогенез НДЗ. Известно, что одной из причин возникновения нейрокогнитивных патологий является нарушение экспрессии гена *limk1*. Кроме того, согласно современным представлениям, основу интеллектуальных проблем при неврологических повреждениях мозга составляет активное забывание, регулируемое сигнальным каскадом ремоделирования актина, ключевым звеном которого является фермент LIMK1. В работе проведен анализ формирования и динамики изменения краткосрочной и среднесрочной памяти у линий *Drosophila melanogaster*, полиморфных по гену *limk1* (*Canton-S*, *Oregon-R* и *agn^{ts3}*). Полиморфизм по гену *limk1* дрозофилы сказывается на содержании его продукта (мутант *agn^{ts3}* характеризуется 2,5-кратным повышением содержания LIMK1 по сравнению с *CS*) и приводит к нарушениям поведения ухаживания и обучения. Результаты настоящего исследования двух линий дикого типа и мутанта *agn^{ts3}* с измененной структурой гена *limk1* показывают, что нарушения структуры данного гена могут являться причиной нарушения процессов обучения и забывания.

Ключевые слова: *limk1*, память, обучение, ремоделирование актина, цитоскелет, дрозофила.

Права: © Е. С. Заломаева, В. С. Фалина, А. В. Медведева, Е. А. Никитина, Е. В. Савватеева-Попова (2021). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях [лицензии CC BY-NC 4.0](#).

Learning and forgetting in *Drosophila melanogaster* in *limk1* gene polymorphism

E. S. Zalomaeva^{1,2}, V. S. Falina², A. V. Medvedeva¹, E. A. Nikitina^{1,2}, E. V. Savvateeva-Popova¹

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

² Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

Authors

Ekaterina S. Zalomaeva,
SPIN: 2075-1823,
ResearcherID: AAB-7658-2021,
Scopus AuthorID: 57203001032,
ORCID: 0000-0002-6005-3433,
e-mail: Zalomaeva.E@yandex.ru

Varvara S. Falina,
e-mail: varvara.falina@gmail.com

Anna V. Medvedeva,
SPIN: 4291-9615,
Scopus AuthorID: 16689705800,
ORCID: 0000-0001-7989-8746,
e-mail: avmed56@mail.ru

Ekaterina A. Nikitina,
SPIN: 7844-8621,
Scopus AuthorID: 56603106300,
ResearcherID: L-5761-2014,
ORCID: 0000-0003-1897-8392,
e-mail: 21074@mail.ru

Elena V. Savvateeva-Popova,
SPIN: 2559-4778,
Scopus AuthorID: 6603078303,
e-mail: esavvateeva@mail.ru

For citation:

Zalomaeva, E. S., Falina, V. S., Medvedeva, A. V., Nikitina, E. A., Savvateeva-Popova, E. V. (2021) Learning and forgetting in *Drosophila melanogaster* in *limk1* gene polymorphism. *Integrative Physiology*, vol. 2, no. 3, pp. 318–327. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-3-318-327>

Received 26 June 2021;
reviewed 2 August 2021;
accepted 3 August 2021.

Funding: This study was supported by the State Program of the Russian Federation 47 GP “Scientific and Technological Development of the Russian Federation” (2019-2030) (63.1) and RFBR 20-015-00300A.

Copyright: © E. S. Zalomaeva, V. S. Falina, A. V. Medvedeva,

Abstract. Currently, neurodegenerative diseases (NDD) are very widespread. According to the World Health Organization (WHO), dementia affected 47 million people worldwide in 2015, and is projected to reach 75 million by 2030 and 132 million by 2050. Neurophysiologists around the world seek to know the etiology and pathogenesis of NDD. It is known that one of the causes of neurocognitive pathologies is impaired expression of the *limk1* gene. In addition, according to modern ideas, the basis of intellectual problems in neurological brain injuries is active forgetting, regulated by the signaling cascade of actin remodeling, the key enzyme of which is LIMK1. The work analyzed the formation and dynamics of short and medium-term memory change in *Drosophila melanogaster* stocks polymorphic for the *limk1* gene (*Canton-S*, *Oregon-R* and *agn^{ts3}*). Polymorphism on the *limk1* gene of *Drosophila* affects the content of its product (mutant *agn^{ts3}* is characterized by a 2.5-fold increase in LIMK1 content compared to *CS*) and leads to violations of courtship and training behavior. The results of the present study of two wild-type stocks and *agn^{ts3}* mutant with altered *limk1* gene structure indicate that disruptions in the structure of this gene can cause disturbance of learning and forgetting processes.

Keywords: *limk1*, memory, learning, actin remodeling, cytoskeleton, *Drosophila*.

E. A. Nikitina, E. V. Savvateeva-Popova (2021). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Память — это преодоление отсутствия.
Janet P. L'intelligence avant le langage.
Paris, 1936.

Введение

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) представляют собой одну из серьезнейших угроз человеческому здоровью. Ключевым звеном патогенеза этих заболеваний является гибель нейронов, что приводит к нарушению выполняемых ими функций. Познание механизмов НДЗ сопряжено с рядом трудностей. Прежде всего это связано с тем, что причины их возникновения неясны до настоящего времени. НДЗ являются результатом взаимодействия внешних факторов, негативно влияющих на человека, и индивидуальных особенностей генома. Одним из ведущих симптомов НДЗ являются когнитивные нарушения, в том числе нарушения обучения и памяти.

Память можно определить как способность организма к приобретению, длительному сохранению и дальнейшему воспроизведению информации. Обучение непосредственно предшествует формированию памяти и заключается в выработке в ходе индивидуального развития приспособительных форм поведения. Еще Уильям Джеймс в своих «Принципах психологии» (1890) сформулировал мнение, что кратковременная («первичная») память качественно отличается от долговременной («вторичной») памяти (Jonides et al. 2008).

Первые исследования физиологических основ памяти связаны с именем Д. Хебба. В 1940-е гг. он ввел понятия кратковременной и долговременной памяти и предложил теорию, объясняющую их нейрофизиологическую природу. Современные подходы к изучению физиологических механизмов памяти во многом связаны с развитием идей Д. Хебба (Brown 2020).

Выделяют следующие механизмы, лежащие в основе обучения и различных форм памяти.

Механизм краткосрочной памяти (КСП).

Традиционный взгляд на КСП состоит в том, что в ее основе лежит активность нейронов, которая передает возбуждение по замкнутой цепи. Она циркулирует в течение нескольких минут, храня информацию, после чего затухает. В результате остается память не о самой

информации, а лишь о том, что в прошлом было воздействие раздражителя, так называемый нейрональный след (Smirnov 2000). Однако новые экспериментальные данные демонстрируют, что информация может поддерживаться посредством краткосрочной синаптической пластичности (Masse et al. 2020).

Механизм среднесрочной памяти (ССП).

После генерации импульсов в период развития КСП в игру вступают биохимические реакции. Активируются ионные каналы, различные рецепторы и медиаторы, запуск которых осуществляется с помощью вторичных посредников, например, цАМФ (Honjo, Furukubo-Tokunaga 2005). Под действием глутамата усиливается синтез эндорфинов, энкефалинов и других модуляторных пептидов. Последнее событие особенно важно для консолидации памяти, так как нейропептиды стимулируют запоминание.

Механизм долгосрочной памяти (ДСП).

Сначала в ходе научения увеличиваются размеры постсинаптической мембраны, количество и плотность мембранных рецепторов, усиливается синтез синаптических медиаторов. Затем изменения затрагивают отростки нейронов: на дендритах появляются дополнительные шипики, а аксоны приобретают новые ветвления. В результате количество синапсов между нейронами растет. Долгосрочная память основывается на синтезе белка *de novo*. Первые гипотезы, связывающие запечатление информации с биохимическими изменениями в нервной ткани, зародились на основе широко известных в 1960-е гг. опытов Г. Хидена. Информация, лежащая в основе долговременной памяти, кодируется, записывается в структуре полинуклеотидной цепи молекулы. Разная структура импульсных потоков, в которых закодирована определенная сенсорная информация в афферентных нервных проводниках, приводит к разной перестройке молекулы РНК. Весь набор вероятных перестановок и комбинаций нуклеотидных элементов обеспечивает возможность фиксировать в структуре молекулы РНК огромный объем информации (Zefirov et al. 2015). Процесс фиксации информации в нервной клетке находит отражение в синтезе белка, в молекулу которого вводится соответствующий следовой отпечаток изменений в молекуле РНК (Asok et al. 2019).

В последние годы на первый план выходит стремление понять, какую роль в становлении и сохранении памяти играет активное забывание (Medina 2018). Возникновению новых представлений, отличающихся от традиционных, во многом способствовало изучение когнитивных функций у организмов с простой нервной системой — нематоды, аплизии, наземной улитки и дрозофилы, поскольку сложность методик изучения памяти млекопитающих не всегда обеспечивает однозначность трактовки результатов. Однако 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», — состоянием, конкурирующим с процессами консолидации памяти (Davis, Zhong 2017). 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 нарушение активного (врожденного) механизма забывания.

В настоящее время не существует лекарств и методов лечения, способных полностью остановить развитие нейродегенеративных патологий. Даже поддержание пациента на поздних стадиях заболевания в ясном состоянии сознания представляется практически невозможным. Поэтому современная наука стремится к решению вопросов возникновения и прогрессирования данных заболеваний для того, чтобы в перспективе успешно излечивать на ранних стадиях или вовсе предупреждать их возникновение.

Для того чтобы разобраться в этиологии НДЗ, необходимо постоянное наблюдение за развитием патологий. Невозможно проводить детальное исследование механизмов НДЗ у человека, прежде всего в силу этических соображений, а также в связи с большой продолжительностью жизни. Именно поэтому необходимо создание животных моделей, являющихся подходящим объектом для изучения нейропатологий (Zamboni et al. 2018).

Среди используемых в нейрогенетике животных моделей особая роль принадлежит дрозофиле. Это связано с тем, что созданные с ее привлечением модели заболеваний обнаруживают широкий спектр признаков, проявляющихся у людей с разными вариантами

нейропатологий. У высокоразвитых беспозвоночных, включая дрозофилу, имеются все основные формы обучения, молекулярные механизмы которых сходны с таковыми у млекопитающих (Tully 1996). Для дрозофилы характерно наличие нескольких типов памяти, которые формируются в зависимости от метода обучения: ольфакторная память, память, вырабатываемая методом УРПУ (условно-рефлекторное подавление ухаживания), визуальная память и перестройка условных рефлексов. Ольфакторное обучение основывается на восприятии запахов. Ольфакторное обучение дрозофилы в павловской парадигме предполагает ряд тренировочных сессий, от числа которых и наличия между ними промежутков зависит характер формирующейся памяти, которая подразделяется на несколько стадий:

- 1) немедленная память, фиксирующая нововоспринятую информацию, или собственно обучение;
- 2) краткосрочная память (КСП): 3–7 мин после обучения, одна тренировка;
- 3) среднесрочная память (ССП): 30 мин — 3 ч, одна тренировка;
- 4) долгосрочная память (ДСП): >3–6 ч — до 9 сут; 10 тренировок с перерывами.

Особой стратегией формирования памяти у дрозофилы является метод УРПУ (Siegel, Hall 1979). Суть УРПУ заключается в формировании у самца дрозофилы стойкой ассоциации между безусловным стимулом (БС; антиафродизиак, выделяемый оплодотворенной самкой) и условным стимулом (УС; афродизиак, выделяемый как оплодотворенной, так и наивной самками). Формирование в ЦНС самца ассоциации УС — БС путем его тренировок с оплодотворенной самкой приводит к снижению его индекса ухаживания (ИУ); на основе ИУ наивного и обученного самцов рассчитывается индекс обучения (ИО) (Zhuravlev et al. 2020). Память, вырабатываемая методом УРПУ, имеет те же основные формы (КСП, ССП, ДСП), что и ольфакторная (Griffith, Ejima 2009).

Визуальная память возникает в результате обучения в симуляторе полета. В процессе обучения используют тепловое воздействие в качестве безусловного стимула. Муха учится избегать БС, благодаря чему развивается ее способность ориентироваться в пространстве. Наконец, дрозофиле свойственна перестройка ранее приобретенных условных рефлексов в ответ на поступление новых условных стимулов. При длительном предъявлении УС, неподкрепленного БС, происходит реактивация

памяти. Это приводит либо к ее возобновлению, либо к исчезновению (Zhuravlev et al. 2015).

Основой обучения и памяти служит синаптическая пластичность нервной системы, для поддержания которой необходима реорганизация актинового цитоскелета. В настоящее время имеющиеся данные в области нейрогенетики и нейрофизиологии говорят о ведущей роли нарушений актинового цитоскелета в возникновении НДЗ. Цитоскелет участвует в различных функциях клетки, которые поддерживают ее жизнеспособность и функциональную активность. Поэтому нарушение этих функций, которое является следствием повреждения цитоскелета, приводит к развитию многих заболеваний, в числе которых и болезни старения.

Актин-ремоделирующий каскад в клетке обеспечивает передачу сигнала от рецепторов нейротрансмиттеров через малые ГТФазы, LIMK1 и кофилин к актину. В основе процесса реорганизации цитоскелета лежит фосфорилирование кофилина, субстрата LIMK1, в результате чего кофилин переходит в неактивное состояние. Это позволяет накопить актиновые фрагменты, которые послужат так называемой «затравкой» для построения новых актиновых филаментов. В случае нарушения работы каскада происходит образование комплекса кофилин-актин. Этот комплекс накапливается в отростках нейронов и приводит к прекращению везикулярного транспорта, следствием чего является атрофия нейритов (Gu et al. 2010).

Анализ нуклеотидной последовательности гена *limk1 D. melanogaster* выявил более 70% гомологии с геном *limk1 H. sapiens* (Reiter et al. 2001).

В геноме дрозофилы *limk1* располагается в районе 11В2 X-хромосомы. Его длина составляет около 9 т. п. н., ген включает 4 интрона и 5 экзонов. Ген локализован в локусе *agnostic*. Этот локус примечателен тем, что имеет множество палиндромов и коротких нуклеотидных повторов, а также обрамлен А/Т-богатыми областями. Мутации локуса изначально были выделены как изменяющие функционирование систем вторичных посредников, и все они приводят к равному увеличению активности Ca^{2+} /калмодулин-зависимой фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов (ФДЭ-I), но по-разному сказываются на когнитивных особенностях. Аллели локуса *agnostic* по-разному определяют: 1) структуру гена LIMK1; 2) архитектуру хромосом в районе локализации локуса; 3) укладку хромосом; 4) особенности гомологичного и негомологичного спаривания, реализуемые

в разных частотах неравной рекомбинации; 5) активность компонентов каскада LIMK1 — кофилин — актин; 6) возникновение цитоплазматических амилоидных включений; 7) способность к обучению и сохранению памяти (Medvedeva et al. 2008).

Целью настоящей работы являлось исследование процессов обучения и забывания у *Drosophila melanogaster* при полиморфизме гена *limk1*.

Материалы и методы

В работе использовали следующие линии *Drosophila melanogaster* из биокolleкции Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (ЦКП «Биокolleкция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем»).

Canton-S — линия дикого типа, у которой обнаружен однонуклеотидный полиморфизм С/Т (+12 п. н.) в участке связывания фактора транскрипции M1 в гене *limk1*.

agn^{ts3} — линия, несущая термочувствительную мутацию в локусе *agnostic*, влияющую на метаболизм цАМФ. Несет множественные полиморфные варианты в 1-м интроне, а также вставку транспозона семейства Tc1/mariner длиной порядка 1700 п. н. за 3'-концевой областью гена в межгенном участке (+ 456 п. н. от конца транскрипции изоформ С и D).

Oregon-R — линия дикого типа, выделенная из естественной популяции штата Орегон, США. Несет множественные полиморфные варианты в 1-м интроне, а также вставку 15 п. н. в экзоне 6, приводящую к появлению 5 аминокислот в С-концевой области белка LIMK1.

Около 20 однонуклеотидных замен, вставок и делеций в интроне 1 являются общими для *agn^{ts3}* и *Oregon-R*, а также встречаются у *Canton-S*. Наиболее примечательна А/Т-обогащенная вставка 28 п. н. в 1 интроне (рис. 1). Полиморфизм Т(785)/G встречается только у *agn^{ts3}*, но его функциональное значение неизвестно (Savvateeva-Popova et al. 2017).

Мух выращивали на стандартной изюмно-дрожжевой среде. Развитие линий происходило при $25 \pm 0,5$ °С и свето-темновом цикле 12:12 ч.

Для изучения процессов обучения и памяти на дрозофиле применяли метод УРПУ (Kamyshev et al. 1999; Siegel, Hall 1979). В качестве объектов уходаживания для самцов всех анализируемых линий использовали оплодотворенных самок линии дикого типа *Canton-S* в возрасте пяти суток. Обучение и тестирование проводили в специальных камерах из оргстекла (диаметр

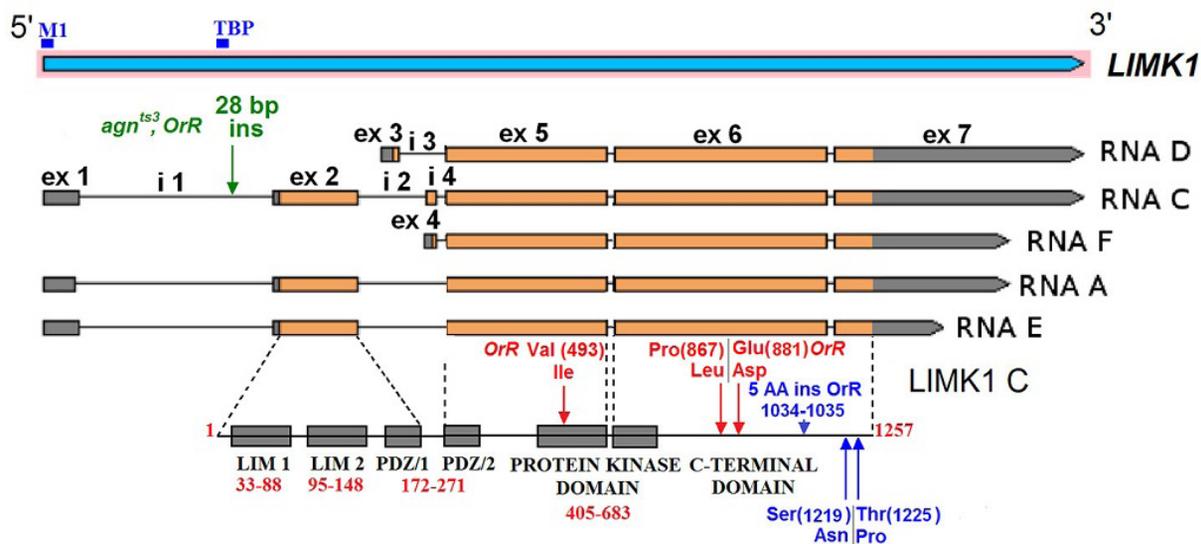


Рис. 1. Структура гена *limk1* *Drosophila melanogaster* (адаптировано из: Savvateeva-Popova et al. 2017). Положения экзонов и интронов приведены в соответствии с данными FlyBase (<http://flybase.org/>). Границы домена белка и мутантные аминокислотные остатки показаны для изоформы LIMK1 C, у. е. ex — экзон; i — интрон

Fig. 1. The structure of *Drosophila melanogaster limk1* gene (Adapted from: Savvateeva-Popova et al. 2017). The positions of exons and introns are given in accordance to FlyBase data (<http://flybase.org/>). The protein domain borders and the mutant amino acid residues are shown for LIMK1 C isoform. Ex—exon, i—intron

15 мм, высота 5 мм). Для выработки УРПУ пятисуточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру вместе с оплодотворенной самкой на 30 минут (тренировка). Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 с, фиксируя время начала отдельных элементов ухаживания (ориентация и преследование, вибрация, лизание, попытка копуляции), а также время исполнения элементов, не связанных с ухаживанием (активность (побежка), прининг, покой). В качестве контроля использовали самцов, не подвергавшихся тренировке. В каждой группе тестировали не менее 20 пар мух.

Для оценки эффективности обучения вычисляли индекс обучения (ИО). Память характеризуется как абсолютным уровнем ИО, так и его динамикой на протяжении тестируемого периода времени. Для оценки активности процессов забывания провели анализ скорости снижения ИО на коротких временных интервалах (0, 15, 30, 60 минут после обучения) 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. Для статистической

обработки данных использовали тест рандомизации ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Исследование показало, что ИО мух линии дикого типа *Canton-S* долгое время сохранялся на высоком уровне, который был достигнут сразу после окончания тренировки (рис. 2). Это свидетельствует о том, что данная линия способна к формированию и сохранению КСП и ССП.

Напротив, у линии *Oregon-R* выработка УРПУ отсутствовала. ИО последовательно снижался с увеличением интервала времени после тренировки. Таким образом, можно говорить о том, что эта линия неспособна как к обучению, так и формированию КСП и ССП. На всех временных точках были обнаружены статистически достоверные отличия от мух линии дикого типа *Canton-S* (рис. 2).

У мутантной линии *agn^{ts3}* также не происходило выработки УРПУ. На всех временных интервалах так же, как и у линии *Oregon-R*, были обнаружены статистически достоверные отличия от ИО мух линии дикого типа *Canton-S* (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что у *agn^{ts3}* по сравнению с *CS* нарушены не только процессы КСП и ССП, но и способность к обучению.

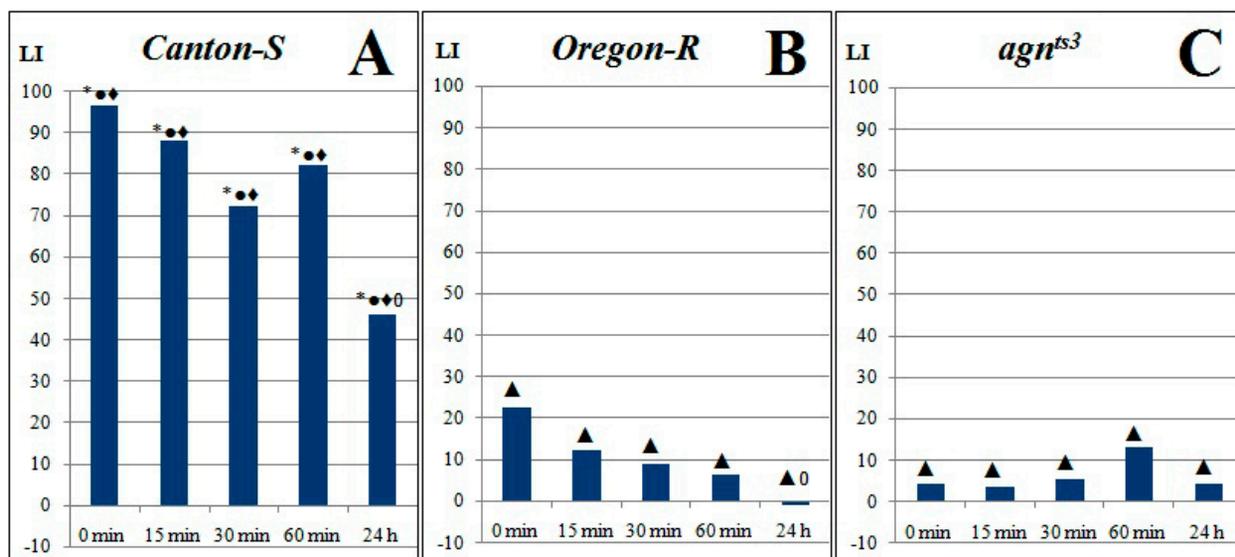


Рис. 2. Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания при тестировании краткосрочной и среднесрочной памяти у самцов линии *Canton-S* (A), *Oregon-R* (B) и *agn^{ts3}* (C) *Drosophila melanogaster*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки; по оси ординат: LI (ИО) — индекс обучения, у. е.

* — ИО достоверно отличается от нуля (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$); • — ИО достоверно отличается от *Oregon-R* (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$); ♦ — ИО достоверно отличается от *agn^{ts3}* (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$); ▲ — ИО достоверно отличается от *Canton-S* (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$); 0 — ИО достоверно отличается от 0 мин той же линии (односторонний тест рандомизации, $p < 0,05$)

Fig. 2. Dynamics of retaining of suppression of conditioned reflex courtship when testing short-term and medium-term memory in *Drosophila melanogaster* males of stock *Canton S* (A), *Oregon-R* (B) и *agn^{ts3}* (C).

The horizontal axis: time after the completion of training; the vertical axis: LI—learning index. *—LI is significantly different from zero (two-sided randomization test, $p < 0.05$); •—LI is significantly different from *Oregon-R* (two-sided randomization test, $p < 0.05$); ♦—LI is significantly different from *agn^{ts3}* (two-sided randomization test, $p < 0.05$); ▲—LI is significantly different from *Canton-S* (two-sided randomization test, $p < 0.05$); 0—LI is significantly different from 0 min same stock (one-sided randomization test, $p < 0.05$)

Таким образом, среди линий с полиморфизмом по локусу *agnostic* у *CS* не выявлено нарушений обучения, КСП и ССП, тогда как *Or-R* и *agn^{ts3}* характеризуются выраженными дефектами, как обучения, так и памяти.

Ранее нами было показано, как измененная структура гена *limk1* сказывается на активности его продукта, и каким образом это реализуется на уровне поведения — обучении, среднесрочной и долгосрочной памяти (Kaminskaya et al. 2012; 2015). В данной работе мы сфокусировали внимание на исследовании динамики краткосрочной памяти при полиморфизме гена *limk1* (рис. 3).

Память характеризуется как абсолютным уровнем ИО, так и его динамикой на протяжении тестируемого периода времени. Для оценки активности процессов забывания необходимо учитывать скорость снижения ИО на некотором временном интервале после тренировки. Как видно на графике (рис. 3), ИО непосредственно после тренировки у линии *Canton-S* значительно превышает таковой у *Oregon-R* и *agn^{ts3}*,

что позволяет говорить о нарушении способности к обучению у двух последних линий. При этом кривые ИО для *Oregon-R* и *agn^{ts3}* лежат намного ниже, нежели кривая ИО для *Canton-S*.

Изменения функций (активное или неактивное состояние) LIMK1 или же кофилина вызывают целый ряд нейропатологий, известных как «интеллектуальные проблемы». Согласно современным представлениям, основу интеллектуальных проблем при различных нейропатологиях составляет активное забывание, регулируемое зависимым от малых ГТФаз Ras и Rho сигнальным каскадом ремоделирования актина. Ras1-зависимое забывание является эволюционно консервативным, присутствуя как у беспозвоночных, так и у позвоночных, что позволяет сопоставлять данные, полученные на разных видах. Активация кофилина препятствует стиранию памяти (Cervantes-Sandoval et al. 2016) не только за счет участия в ремоделировании актина, но и потому, что комплекс АДФ (аденозиндифосфат)/кофилин рассматривают

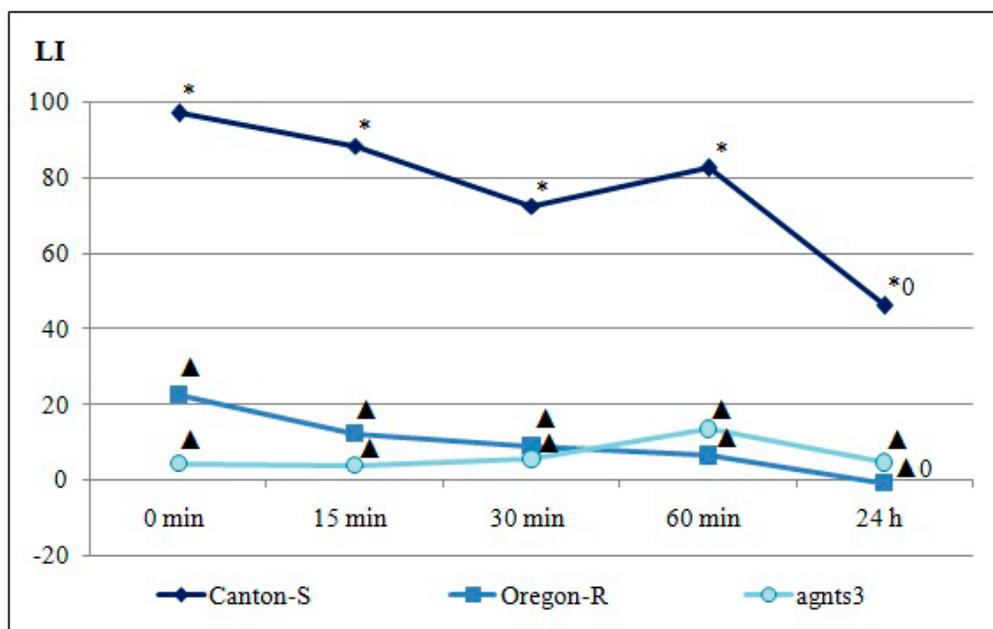


Рис. 3. Сравнительный анализ динамики условно-рефлекторного подавления ухаживания при тестировании краткосрочной и среднесрочной памяти у самцов линий *Canton-S*, *Oregon-R* и *agn^{ts3}* *Drosophila melanogaster*. По оси абсцисс: время после завершения тренировок; по оси ординат: LI (ИО) — индекс обучения, у. е. * — ИО достоверно отличается от нуля (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$); ▲ — ИО достоверно отличается от *Canton-S* (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$); 0 — ИО достоверно отличается от 0 мин той же линии (односторонний тест рандомизации, $p < 0,05$)

Fig. 3. Comparative analysis of dynamics of suppression of conditioned reflex courtship when testing short-term and medium-term memory in *Drosophila melanogaster* *Canton-S*, *Oregon-R* and *agn^{ts3}* males. The horizontal axis: time after the completion of training; the vertical axis: LI (IO)—learning index. *—LI is significantly different from zero (two-sided randomization test, $p < 0.05$), ▲—LI is significantly different from *Canton-S* (two-sided randomization test, $p < 0.05$), 0—LI is significantly different from 0 min same stock (one-sided randomization test, $p < 0.05$)

как функциональный узел клеточной биологии, регулятор клеточного гомеостаза, сенсор-стрессорных воздействий (Gu et al. 2010). Среди таких воздействий и тепловой шок, и окислительный стресс, и гипоксия, и изменения солевого содержания, и засуха, воздействующие на различных представителей живого мира (Huang et al. 2020). Важность же роли компонентов этого каскада в становлении интеллектуальных проблем при различных нейропатологиях обозначена в новейшем исследовании декабря 2020 г. о том, что активность LIMK1/2 в медиальной префронтальной коре мышей ответственна за развитие непредсказуемого мягкого хронического стресса, обездвиживания и социальных поражений, ведущих к таким интеллектуальным проблемам, как депрессия (Gao et al. 2020).

Полученные данные создают базу для дальнейшего изучения роли активного забывания на процессы становления и сохранения памяти при различных нарушениях структуры гена *limk1*.

Заключение

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, что вызывает дисрегуляцию микроРНК, маркеров болезней Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона и делеционно-дупликационных синдромов со множественными, в том числе когнитивными, проявлениями. В линиях природных популяций *Canton-S*, *Oregon-R* и мутантной линии *agn^{ts3}* по результатам секвенирования выявлен полиморфизм по гену *limk1*, для каждой линии характерно специфичное распределение однонуклеотидных замен, коротких инсерций и делеций (Savvateeva-Popova et al. 2017). Обнаруженный полиморфизм имеет своим следствием когнитивные дисфункции, выявляемые в парадигме УРПУ. Данный тест позволяет фиксировать особен-

ности как краткосрочной и среднесрочной, так и долгосрочной памяти. При этом мутационное повреждение гена у *agn^{ts3}* нарушает все типы памяти, которые, однако, восстанавливаются до уровня *Canton-S* при стрессорном действии температурного шока и ослаблении магнитного поля (Nikitina et al. 2014; 2017). У линии *Oregon-R* нарушена краткосрочная и среднесрочная память, но долгосрочная соответствует уровню дикого типа (Kaminskaya et al. 2015).

В этом контексте настоящее исследование, предпринятое с целью изучения влияния полиморфизма гена *limk1* на активное забывание у самцов дрозофилы в парадигме УРПУ, является первым и необходимым шагом для выяснения того, как сказывается на процессах забывания изменение активности ключевого элемента каскада ремоделирования актина LIMK1.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Вклад авторов

- a. Екатерина Сергеевна Заломаева — постановка эксперимента, математическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала;
- b. Варвара Сергеевна Фалина — написание статьи, постановка эксперимента;
- c. Анна Владимировна Медведева — написание статьи и подбор литературы;
- d. Екатерина Александровна Никитина — планирование эксперимента и обсуждение;
- e. Елена Владимировна Савватеева-Попова — осуществление общего руководства экспериментом.

Author contributions

- a. Ekaterina S. Zalomaeva—setting up an experiment, mathematical data processing, preparation of illustrative material;
- b. Varvara S. Falina—writing an article, setting up an experiment;
- c. Anna V. Medvedeva—writing an article and selection of literature;
- d. Ekaterina A. Nikitina—experiment planning and discussion;
- e. Elena V. Savvateeva-Popova—general management of the experiment.

References

- Asok, A., Leroy, F., Rayman, J. B., Kandel, E. R. (2019) Molecular mechanisms of the memory trace. *Trends in Neurosciences*, vol. 42, no. 1, pp. 14–22. <https://www.doi.org/10.1016/j.tins.2018.10.005> (In English)
- Brown, R. E. (2020) Donald O. Hebb and the organization of behavior: 17 years in the writing. *Molecular Brain*, vol. 13, no. 1, article 55. <https://www.doi.org/10.1186/s13041-020-00567-8> (In English)
- Cervantes-Sandoval, I., Chakraborty, M., MacMullen, C., Davic, R. L. (2016) Scribble scaffolds a signalosome for active forgetting. *Neuron*, vol. 90, no. 6, pp. 1230–1242. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.010> (In English)
- Davis, R. L., Zhong, Y. (2017) The biology of forgetting — a perspective. *Neuron*, vol. 95, no. 3, pp. 490–503. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.039> (In English)
- Gao, T.-T., Wang, Y., Liu, L. et al. (2020) LIMK1/2 in the mPFC plays a role in chronic stress-induced depressive-like effects in mice. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, vol. 23, no. 12, pp. 821–836. <https://www.doi.org/10.1093/ijnp/pyaa067> (In English)
- Griffith, L. C., Ejima, A. (2009) Courtship learning in *Drosophila melanogaster*: Diverse plasticity of a reproductive behavior. *Learning & Memory*, vol. 16, no. 12, pp. 743–750. <https://www.doi.org/10.1101/lm.956309> (In English)
- Gu, J., Lee, C. W., Fan, Y. et al. (2010) ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, vol. 13, no. 10, pp. 1208–1215. <https://www.doi.org/10.1038/nn.2634> (In English)
- Honjo, K., Furukubo-Tokunaga, K. (2005) Induction of cAMP response element-binding protein-dependent medium-term memory by appetitive gustatory reinforcement in *Drosophila* larvae. *The Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 35, pp. 7905–7913. <https://www.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2135-05.2005> (In English)
- Huang, J., Sun, W., Ren, J. et al. (2020) Genome-Wide Identification and characterization of actin-depolymerizing factor (ADF) family genes and expression analysis of responses to various stresses in *Zea Mays* L. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 5, article 1751. <https://www.doi.org/10.3390/ijms21051751> (In English)
- Jonides, J., Lewis, R. L., Nee, D. E. et al. (2008) The mind and brain of short-term memory. *Annual Review of Psychology*, vol. 59, pp. 193–224. <https://www.doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093615> (In English)

- Kaminskaya, A. N., Nikitina, E. A., Payalina, T. L. et al. (2012) Effect of the LIM kinase 1 isoform ratio on *Drosophila melanogaster* courtship behavior: A complex approach. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, vol. 2, no. 5, pp. 367–377. <https://www.doi.org/10.1134/S2079059712050024> (In English)
- Kaminskaya, A. N., Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V. et al. (2015) The influence of gene *limk1* polymorphism on learning and memory and distribution pCREB and aggregates formation in neuromuscular junctions of *Drosophila melanogaster*. *Russian Journal of Genetics*, vol. 51, no. 6, pp. 582–590. <https://www.doi.org/10.1134/S1022795415060071> (In English)
- Kamyshev, N. G., Iliadi, K. G., Bragina, J. V. (1999) *Drosophila* conditioned courtship: Two ways of testing memory. *Learning & Memory*, vol. 6, no. 1, pp. 1–20. PMID: 10355520. (In English)
- Masse, N. Y., Rosen, M. C., Freedman, D. J. (2020) Reevaluating the role of persistent neural activity in short-term memory. *Trends in Cognitive Sciences*, vol. 24, no. 3, pp. 242–258. <https://www.doi.org/10.1016/j.tics.2019.12.014> (In English)
- Medina, J. H. (2018) Neural, cellular and molecular mechanisms of active forgetting. *Frontiers in Systems Neuroscience*, vol. 12, article 3. <https://www.doi.org/10.3389/fnsys.2018.00003> (In English)
- Medvedeva, A. V., Molotkov, D. A., Nikitina, E. A. et al. (2008) Systemic regulation of genetic and cytogenetic processes by a signal cascade of actin remodeling: Locus *agnostic* in *Drosophila*. *Russian Journal of Genetics*, vol. 44, no. 6, pp. 669–681. <https://www.doi.org/10.1134/S1022795408060069> (In English)
- Nikitina, E. A., Kaminskaya, A. N., Molotkov, D. A. et al. (2014) Effect of heat shock on courtship behavior, sound production, and learning in comparison with the brain content of *limk1* in *Drosophila melanogaster* males with altered structure of the *limk1* gene. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 50, no. 2, pp. 154–166. <https://www.doi.org/10.1134/S0022093014020082> (In English)
- Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V., Gerasimenko, M. S. et al. (2017) Oslablennoe magnitnoe pole Zemli: vliyanie na transkriptsiionnyu aktivnost' genoma, obuchenie i pamyat' u *Dr. melanogaster* [Weakened geomagnetic field: Effects on genomic transcriptional activity, learning, and memory in *Drosophila melanogaster*]. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I. P. Pavlova — I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*, vol. 67, no. 2, pp. 246–256. <https://www.doi.org/10.7868/S0044467717020101> (In Russian)
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S. et al. (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, vol. 11, no. 6, pp. 1114–1125. <https://www.doi.org/10.1101/gr.169101> (In English)
- Savvateeva-Popova, E. V., Zhuravlev, A. V., Brázda, V. et al. (2017) *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. *Frontiers in Genetics*, vol. 8, article 123. <https://www.doi.org/10.3389/fgene.2017.00123> (In English)
- Siegel, R. W., Hall, J. C. (1979) Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 76, no. 7, pp. 3430–3434. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.76.7.3430> (In English)
- Smirnov, V. M. (2000) *Nejrofiziologiya i vysshaya nervnaya deyatel'nost' detej i podrostkov [Neurophysiology and higher nervous activity of children and adolescents]*. Moscow: Academia Publ., 400 p. (In Russian)
- Tully, T. (1996) Discovery of genes involved with learning and memory: An experimental synthesis of Hirschian and Benzerian perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 93, no. 24, pp. 13460–13467. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13460> (In English)
- Zamboni, F., Vieira, S., Reis, R. L. et al. (2018) The potential of hyaluronic acid in immunoprotection and immunomodulation: Chemistry, processing and function. *Progress in Materials Science*, vol. 97, pp. 97–122. <https://www.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.04.003> (In English)
- Zefirov, T. L., Ziyatdinova, N. I., Kypitsova, A. M. (2015) *Fiziologicheskie osnovy pamyati. Razvitie pamyati u detej i podrostkov [Physiological bases of memory. Memory development in children and adolescents]*. Kazan: Kazan Federal University, 40 p. (In Russian)
- Zhuravlev, A. V., Nikitina, E. A., Savvateeva-Popova, E. V. (2015) Obuchenie i pamyat' u drozofily: fiziologo-geneticheskie osnovy [Education and memory in drosophila: Physiological and genetic bases]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*, vol. 46, no. 1, pp. 76–92. (In Russian)
- Zhuravlev, A. V., Nikitina, E. A., Savvateeva-Popova, E. V. (2020) Rol' kinureninov v regulyatsii povedeniya i protsessov pamyati u drozofily [Role of kynurenines in regulation of behavior and memory processes in *Drosophila*]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 1, no. 1, pp. 40–50. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-1-40-50> (In Russian)