

## Нейроны, экспрессирующие ген *factor of interpulse interval (fipi)*, вовлечены в регуляцию поведения ухаживания самцов *Drosophila melanogaster*

С. А. Федотов<sup>✉1,2</sup>, Н. Г. Беседина<sup>1</sup>, Ю. В. Брагина<sup>1</sup>,  
Л. В. Даниленкова<sup>1</sup>, Е. А. Камышева<sup>1</sup>, Н. Г. Камышев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН,  
199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6  
<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

### Сведения об авторах

Сергей Александрович Федотов,  
SPIN-код: 8766-3012,  
ResearcherID: L-2467-2017,  
Scopus AuthorID: 55765206600,  
ORCID: 0000-0002-7428-120X,  
e-mail: serg900@yandex.ru

Наталья Геннадьевна Беседина,  
ORCID: 0000-0003-0603-9486,  
e-mail: nbesedina21@infran.ru

Юлия Валерьевна Брагина,  
ORCID: 0000-0003-0432-0063,  
e-mail: julia\_bragina@infran.ru

Лариса Владимировна  
Даниленкова,  
ORCID: 0000-0001-7826-6106,  
e-mail: danilenkova@infran.ru

Елена Аркадьевна Камышева,  
ORCID: 0000-0001-8527-8842,  
e-mail: kamyshevaea@infran.ru

Николай Григорьевич Камышев,  
SPIN-код: 4461-9955,  
ResearcherID: N-3922-2017,  
Scopus AuthorID: 6603773316,  
ORCID: 0000-0002-3611-7417,  
e-mail: kamyshevng@infran.ru

### Для цитирования:

Федотов, С. А., Беседина, Н. Г.,  
Брагина, Ю. В. и др.  
(2020) Нейроны,  
экспрессирующие ген *factor  
of interpulse interval (fipi)*,  
вовлечены в регуляцию  
поведения ухаживания самцов  
*Drosophila melanogaster*.  
*Интегративная физиология*,  
т. 1, № 4, с. 366–379.  
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-  
4-366-379

Получена 15 июня 2020; прошла  
рецензирование 4 августа 2020;  
принята 4 августа 2020.

**Аннотация.** Ранее нами описан ген *factor of interpulse interval (fipi)*, он же *CG15630*, снижение экспрессии которого в нервной системе приводит к изменениям параметров импульсной песни ухаживания самцов дрозофилы, в частности к укорочению межимпульсного интервала (Fedotov et al. 2014). В настоящей работе мы описали структуры нервной системы, в которых происходит экспрессия гена *fipi*, а также исследовали роль этого гена в реализации поведения ухаживания, включая его модификацию в результате предшествующего опыта ухаживания за нерцептивной оплодотворенной самкой. Известно, что такой опыт (обучение) снижает интенсивность последующих ухаживаний самца за другими самками. Экспрессия маркерного белка GFP под контролем промотора гена *fipi* была обнаружена в локальных интернейронах антеннальных долей, в гамма-нейронах Кеньона и зрительных нейронах оптических долей. Блокирование синаптической передачи от *fipi*-нейронов снижало эффективность подавления ухаживания, а усиление возбудимости этих нейронов способствовало более длительному сохранению эффекта подавления. Нокаунт гена *fipi* не вызывал отклонений в подавлении ухаживания, однако увеличивал интенсивность ухаживания у самцов без обучения. Полученные результаты показывают, что *fipi*-нейроны вовлечены в регуляцию поведения ухаживания, и позволяют предположить, что экспрессия гена *fipi* в гамма-нейронах грибовидных тел участвует в механизмах формирования краткосрочной памяти в данной форме обучения.

**Ключевые слова:** дрозофила, половое поведение, краткосрочная память, гамма-нейроны, подавление ухаживания, обонятельные сигналы.

**Финансирование:** Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 63) и программы кадровой поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых СПбГУ (грант постдока № 34799261, научная лаборатория биологии амилоидов, проект «Трансляционная биомедицина в СПбГУ»).

**Права:** © Авторы (2020). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

## The involvement of neurons expressing gene *factor of interpulse interval (fipi)* in regulation of courtship behavior of *Drosophila melanogaster* males

S. A. Fedotov<sup>✉1,2</sup>, N. G. Besedina<sup>1</sup>, J. V. Bragina<sup>1</sup>,  
L. V. Danilenkova<sup>1</sup>, E. A. Kamysheva<sup>1</sup>, N. G. Kamyshev<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

### Authors

Sergey A. Fedotov,  
SPIN: 8766-3012,  
ResearcherID: L-2467-2017,  
Scopus AuthorID: 55765206600,  
ORCID: 0000-0002-7428-120X,  
e-mail: serg900@yandex.ru

Natalia G. Besedina,  
ORCID: 0000-0003-0603-9486,  
e-mail: nbesedina21@infran.ru

Julia V. Bragina,  
ORCID: 0000-0003-0432-0063,  
e-mail: julia\_bragina@infran.ru

Larisa V. Danilenkova,  
ORCID: 0000-0001-7826-6106,  
e-mail: danilenkova@infran.ru

Elena A. Kamysheva,  
ORCID: 0000-0001-8527-8842,  
e-mail: kamyshevaea@infran.ru

Nikolai G. Kamyshev,  
SPIN: 4461-9955,  
ResearcherID: N-3922-2017,  
Scopus AuthorID: 6603773316,  
ORCID: 0000-0002-3611-7417,  
e-mail: kamyshevng@infran.ru

### For citation:

Fedotov, S. A., Besedina, N. G.,  
Bragina, J. V. et al.  
(2020) The involvement of neurons  
expressing gene *factor of interpulse*

**Abstract.** Previously, we described gene *factor of interpulse interval (fipi)*, aka *CG15630*), whose decreased expression in the nervous system led to the changes in the parameters of a pulse song — a component of courtship in *Drosophila* males, in particular, to the reduction of the interpulse interval (Fedotov et al. 2014). In this study, we describe the structures of the nervous system, where the *fipi* gene is expressed. We also examine the role of this gene in courtship behavior, including its modification as a result of previous experience of a male courting a non-receptive fertilized female. It is known that such experience (learning) reduces the intensity of subsequent courtship of a male as regards other females. The expression of the GFP marker protein under control of the *fipi* gene promoter was detected in local interneurons of the antennal lobes, in Kenyon gamma-neurons, and in visual neurons of the optical lobes. The blocking of synaptic transmission from *fipi* neurons reduced the efficiency of courtship suppression, and increased the excitability of these neurons, which resulted in a longer retention of the suppression effect. The knockdown of the *fipi* gene did not cause abnormalities in the courtship suppression, instead, it increased courtship intensity in males with no experience. The results show that *fipi* neurons are involved in the regulation of courtship behavior, and suggest that the expression of the *fipi* gene in gamma-neurons of mushroom bodies is involved in the formation of a short-term memory in this form of learning.

**Keywords:** *Drosophila*, sexual behavior, short-term memory, gamma neurons, courtship suppression, olfactory signals.

*interval (fipi)* in regulation of courtship behavior of *Drosophila melanogaster* males. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 4, pp. 366–379. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-4-366-379

**Received** 15 June 2020;  
reviewed 4 August 2020;  
accepted 4 August 2020.

**Funding:** This study was supported by the Program of Fundamental Scientific Research of State Academies for 2013–2020 (GP-14, Section 63) and the program of personal support for scientific research conducted under the guidance of leading scientists of Saint Petersburg State University (postdoc grant No. 34799261, scientific laboratory of amyloid biology, Translational Biomedicine Project, Saint Petersburg State University).

**Copyright:** © The Authors (2020).  
Published by Herzen State Pedagogical University of Russia.  
Open access under CC BY-NC License 4.0.

## Введение

Изучение функций генов, от которых зависит работа нейронных сетей, ответственных за реализацию и регуляцию различных форм поведения, представляет собой важный аспект современной нейрогенетики. Поведение ухаживания самцов дрозофилы интересно тем, что оно представляет собой комплекс фиксированных действий (ритуал ухаживания), который подвержен модификациям в результате приобретения индивидуального опыта. Кроме того, такой компонент ритуала ухаживания, как брачная песня самцов, может изучаться не только путем наблюдения за поведением, но и путем анализа звукозаписи, что дает представление о запуске, остановке и интенсивности работы центрального генератора моторного паттерна импульсной песни. Интенсивность его работы отражается в межимпульсном интервале: чем он короче, тем интенсивнее работает генератор. Ранее нами был описан ген *factor of interpulse interval (fipi)*, он же *CG15630*, снижение экспрессии которого в нервной системе приводит к изменениям параметров импульсной песни ухаживания самцов дрозофилы, в частности к укорочению межимпульсного интервала (Fedotov et al. 2014). Анализ эффектов локального нокдауна *fipi* в различных типах нейронов

позволил заключить, что данный ген вовлечен в обработку ольфакторных сигналов, регулирующих межимпульсный интервал в песне ухаживания (Fedotov et al. 2018). В настоящей работе мы описали структуры нервной системы, в которых происходит экспрессия гена *fipi*, а также исследовали роль этого гена в реализации поведения ухаживания, включая его модификацию в результате предшествующего содержания с нерцептивной оплодотворенной самкой.

Ритуал ухаживания представляет собой врожденную последовательность действий, которые самец дрозофилы совершает перед попытками копуляции с самкой (Spieth 1974). При зрительном обнаружении самки он сближается с ней на расстояние 1–2 размеров тела (ориентация), идентифицируя вид, пол и рецептивность самки по обонятельным и вкусовым хемосигналам. Пусковым сигналом для дальнейшего ухаживания является детекция видоспецифичных афродизиаков (кутикулярных углеводов) на теле самки вкусовыми рецепторами передних лапок самца. Далее самец вибрирует отставленным крылом, генерируя при этом импульсную песню ухаживания (вибрация). Если самка убегает, то самец преследует ее (преследование), в том числе продолжая вибрировать крылом (вибрация на бегу). Восприятие самкой видо-

специфичной песни самца усиливает ее рецептивность и снижает скорость ее передвижения. В финальной стадии ритуала самец облизывает гениталии самки и совершает попытки копуляции, которые в конце концов завершаются успешным спариванием, если это зрелая девственная самка. Оплодотворенные и незрелые девственные самки нерцептивны, т. е. копуляция с ними невозможна.

Предварительное содержание самца с оплодотворенной самкой в течение 30–60 минут снижает интенсивность последующего ухаживания самца как за девственной (Siegel, Hall 1979), так и за оплодотворенной самкой (Tomprkins 1984; Kamyshev et al. 1999). При сравнении прошедших такую тренировку самцов с наивными, т. е. не имеющими предшествующего опыта ухаживания, самцами сниженный уровень ухаживания у тренированных самцов сохранялся до 3 часов, если тест проводился с девственной самкой, и по крайней мере до 8 часов, если объектом ухаживания была другая (не та, с которой проводили тренировку) оплодотворенная самка (Kamyshev et al. 1999). При этом степень подавления ухаживания в тесте с оплодотворенной самкой всегда была выше, чем в тесте с девственной. Что касается теста с девственной самкой, то с самых ранних работ этот эффект трактовался как условнорефлекторное подавление ухаживания (conditioned courtship suppression, или courtship conditioning). Стимулирующие ухаживание самца раздражители, исходящие от оплодотворенной самки, в ходе тренировки ассоциировались со стимулами, подавляющими ухаживание, в частности, с запахом антифродизиака цис-вакценил ацетата (цВА), который присутствует у самок только после их оплодотворения. В последующем тесте с девственной самкой запах цВА так же, как и другие аверсивные стимулы оплодотворенной самки, отсутствовал, т. е. подавление ухаживания происходило в результате выработки условного рефлекса. На основании экспериментальных данных в качестве механизма рассматривался преимущественно классический павловский условный рефлекс (ассоциация между стимулами), хотя против возможной выработки ассоциации стимул — действие — результат (самка — ухаживание — невозможность спаривания), соответствующей парадигме инструментального условного рефлекса, также никто не возражал. Аргументы в пользу ассоциативной природы этой модификации поведения суммированы в работе Л. С. Гриффит и А. Эдзимы (Griffith, Ejima 2009). В случае теста с оплодотворенной самкой, который мы использовали в данном

исследовании, к причинам подавления ухаживания добавляется неассоциативное обучение, сенситизация — увеличение чувствительности к цВА в ходе ухаживания за оплодотворенной самкой (Keleman et al. 2012), а также такой фактор, как перенос обучения, ведь тест с оплодотворенной самкой, по сути, является тестом повторного обучения (Kamyshev et al. 1999).

На сегодняшний день у дрозофилы детально описаны нейроны и их связи, через которые осуществляется запуск и регуляция поведения ухаживания (Auer, Benton 2016; Yamamoto et al. 2014; Zhang et al. 2019), а также его подавление в случае, если самец не смог добиться копуляции при ухаживании за самкой (Keleman et al. 2012; Zhao et al. 2018). Однако изучение на клеточном уровне молекулярных факторов, вовлеченных в реализацию данной формы поведения и его модификацию с учетом предыдущего опыта, отстает от описания нейронных сетей и необходимо для описания процессов, протекающих в этих сетях.

Ген *fipi* экспрессируется преимущественно в центральной нервной системе (Chintapalli et al. 2007) и кодирует ассоциированный с мембранами белок (Khanna et al. 2010), который относится к суперсемейству иммуноглобулинов, молекул клеточной адгезии и содержит 3 иммуноглобулиновых домена и домен фибронектина типа III (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9VR25>). У млекопитающих наибольшая гомология с геном *fipi* обнаруживается с генами нейрональных молекул клеточной адгезии NCAM (pantherdb.org), посттрансляционные модификации которых обеспечивают процессы нейронального ремоделирования и синаптической пластичности, в том числе в обонятельных луковицах и нейронах гиппокампа (Bonfanti, Theodosis 2009; Muller et al. 1996).

## Материалы и методы

### Линии мух

Во всех экспериментах использовали самцов *Drosophila melanogaster*. Условия содержания мух описаны ранее (Goncharova et al. 2016). Линия дикого типа *Canton-S* получена из Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC, США). Трансгенные линии мух, которые экспрессировали ген транскрипционного активатора GAL4 под контролем регуляторных областей, стоящих в геноме перед геном *fipi*, были созданы нами по схеме, описанной в работе Б. Д. Пфайффер с соавт. (Pfeiffer et al. 2008). Во всех экспериментах использовали потомство от скрещивания

самок линии 2M2 (драйвер *fipi-GAL4*, генотип  $y1\ w67c23; P\{y[+t7.7]\ w[+mC]=fipi672-GAL4\}attP2$ ) с самцами, несущими тот или иной трансген под контролем промотора UAS (upstream activating sequence). Связывание GAL4 с UAS запускает экспрессию трансгена, стоящего за UAS (Duffy 2002). В контрольных скрещиваниях вместо 2M2 брали линию 1M1 (отрицательный контроль, генотип  $y1\ w67c23; P\{y[+t7.7]\ w[+mC]=pBPGw\}attP2$ ), в которой трансген *GAL4* не экспрессировался ввиду отсутствия промотора. Были использованы следующие линии с UAS-трансгенами из BDSC: #32186 ( $w[*]; P\{w[+mC]=10XUAS-IVS-mCD8::GFP\}attP40$ ), далее GFP, для маркирования клеток белком GFP, #28838 ( $w[*]; P\{w[+mC]=UAS\textit{TxLC.tnt}\}G2$ , далее TNT) для блокирования синаптической передачи легкой цепью столбнячного токсина, #28839 ( $w[*]; P\{w[+mC]=UAS\textit{TxLC.(-)Q}\}A2$ , далее TNT\*) с мутантным геном легкой цепи столбнячного токсина, не блокирующей синаптическую передачу, #9467 ( $y[1]\ w[*]; P\{w[+mC]=UAS\textit{NaChBac-EGFP}\}1/TM3, Sb[1]$ , далее *NaChBac*) для усиления возбужденности нейронов экспрессией бактериального натриевого канала. Для нокдауна гена *fipi* в скрещиваниях с самцами *fipi-GAL4* была использована линия мух #107797 ( $y\ w[11118]; P\{KK107002\}VIE-260B$ , далее RNAi), полученная из Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Австрия). Данная линия содержит UAS-трансген, кодирующий интерферирующую РНК (hpRNA) к гену *fipi*.

### Конфокальная микроскопия

Пятисуточных самцов обездвигивали на льду и извлекали ЦНС и антенны в фосфатном буфере (ФБ) путем механического препарирования (Fore et al. 2011; Karim et al. 2014). Образцы фиксировали в 4%-ном формальдегиде и инкубировали с антителами. Были использованы первичные моноклональные антитела к GFP (338001, BioLegend, крыса, 1:1000) и к Fas2 (1D4, DSHB, мышь, 1:100) и вторичные поликлональные антитела к IgG крысы с красителем Alexa Fluor 488 (112–545-003, Jackson, козел, 1:500) и к IgG мыши с красителем Alexa Fluor 647 (ab150115, Abscam, козел, 1:500). Для окраски ядер во вторую порцию отмывки добавляли краситель DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) в концентрации 300 нг/мл. После отмывки образцы помещали в среду GDP (70%-ный глицерин, 2,5 % DABCO в ФБ) для хранения и сканирования флуоресцентного сигнала на конфокальном микроскопе.

Анализ флуоресценции проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) в коллективном центре пользования «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И. П. Павлова. Анализ и редактирование полученных изображений выполнялся в свободно распространяемой версии ZEN 2011 (black edition, 64 bit, Carl Zeiss).

### Оценка уровня экспрессии

Оценка уровня экспрессии гена *fipi* осуществлялась как описано ранее (Fedotov et al. 2014). Вкратце, из самцов выделяли тотальную РНК, из которой в реакции обратной транскрипции получали образцы кДНК, вносимые в пробы полимеразно-цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (реал-тайм ОТ-ПЦР) с помощью флуоресцентного красителя EvaGreen® (Biotium, VT-31000). В реакции использовали праймеры к первому и второму экзонам *fipi* (5'-ATTTCGTTGAGATTCTCGCAA TGCG-3', 5'-CGGCGATTTC CAATGGAGCT-3'). В качестве внутреннего контроля количества матрицы использовался рибосомальный ген *RpL32*. Статистическая обработка данных выполнялась рандомизационным тестом с уровнем значимости  $\alpha = 0,05$  в программе REST 2009 методом  $\Delta\Delta C_t$  (Pfaffl et al. 2002).

### Тестирование и анализ поведения ухаживания самцов

Тестирование поведения ухаживания подробно описано в работе Гончаровой с соавт. (Goncharova et al. 2016). Экспериментальных самцов содержали поодиночке в течение 3 суток после вылупления. В день опыта самцов помещали на 1 час в экспериментальную камеру (диаметр 15 мм, высота 5 мм) с оплодотворенной самкой (тренировка). После этого проводили тест с другой оплодотворенной самкой в новой камере либо сразу после тренировки, либо через 1 час (в течение этого времени самцов содержали в стаканчике с питательной средой). Контролем служили мухи того же генотипа, которых перед тестом помещали на 1 час в камеру без самки (ложная тренировка). Этограмму поведения самцов регистрировали в течение 300 секунд, фиксируя время начала отдельных элементов ухаживания (ориентация, вибрация крыла в покое и на бегу, касание брюшка самки передними ногами, лизание, попытка копуляции), а также элементов, не связанных с ухаживанием (побежка, прининг, покой). Каждый эксперимент выполнялся минимум в двух повторностях

по 10 мух в каждой. Для регистрации поведения, анализа данных и статистической обработки использовали компьютерную программу «Drosophila Courtship» (автор Н. Г. Камышев). Для каждого самца вычисляли частоту разных элементов ухаживания и сеансов ухаживания в целом — число инициаций за 100 с. Сравнение средних значений проводили тестом рандомизации (Edgington 1995) при уровне значимости  $\alpha = 0,05$ . Доверительные интервалы средних значений оценивали методом бутстрэппинга с коррекцией смещения и акселерации в программном обеспечении IBM SPSS Statistics 20 (10000 итераций) (Efron, Tibshirani 1993).

Дополнительно рассчитывали доли переходов от каждого элемента поведения к другим элементам: число переходов конкретного типа относили к сумме всех переходов от данного элемента. Парное сравнение долей выполняли с помощью калькулятора в Statistica 8.0 (двусторонний тест,  $\alpha = 0,05$ ). Расчет стандартных ошибок для долей проводили по формуле ст. ош. =  $\sqrt{p * (1 - p) / n}$ , где  $p$  — доля конкретного перехода,  $n$  — число всех переходов от данного элемента.

## Результаты и обсуждение

### Анализ экспрессии GFP под контролем промотора гена *fipi*

Согласно литературным данным, ген *fipi* экспрессируется практически исключительно в ЦНС (Chintapalli et al. 2007). Для описания структур ЦНС, в которых экспрессируется ген *fipi*, был проанализирован паттерн экспрессии GFP в мозге и грудобрюшном ганглии (ГБГ) мух *D. melanogaster* с набором трансгенов *fipi-GAL4/UAS-GFP*. Трансген *fipi-GAL4* (драйвер) содержит ген транскрипционного активатора GAL4 под контролем промоторной области гена *fipi*. Трансген *UAS-GFP* кодирует ген белка GFP, экспрессия которого запускается при связывании активатора GAL4 с промотором UAS (upstream activating sequence). Так как синтез GAL4 управляется промотором *fipi*, то клеточные структуры, в которых экспрессируется *fipi*, маркируются белком GFP (рис. 1). В контрольных мухах, у которых трансген *GAL4* не содержал промоторной области гена *fipi*, GFP не выявлялся (см. «Методы»).

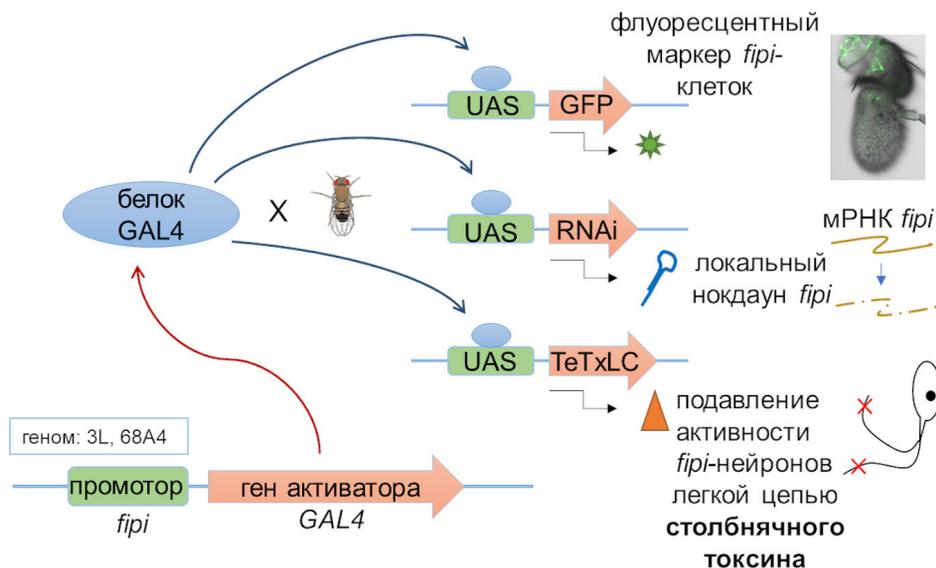


Рис. 1. Схема экспериментов с использованием системы трансгенов GAL4/UAS. Ген транскрипционного активатора GAL4 под контролем промотора гена *fipi* вставляется в геном дрозофилы в сайте 3L, 68A4. Полученные трансгенные мухи скрещиваются с линиями мух, которые содержат трансген под контролем промотора UAS. В потомстве GAL4 связывается с UAS и запускает транскрипцию трансгена под контролем UAS. Трансген экспрессируется лишь в клетках, где активен промотор *fipi*, и позволяет маркировать эти клетки (GFP), подавлять в них экспрессию *fipi* интерферирующей РНК (RNAi), блокировать синаптическую передачу TeTxLC, или (TNT)

Fig. 1. A scheme of experiments using the GAL4/UAS transgene system. The transcriptional activator GAL4 gene under control of the *fipi* gene promoter is inserted into the Drosophila genome at site 3L, 68A4. The resulting transgenic flies are crossed with flies that contain the transgene under control of the UAS promoter. In the offspring, GAL4 binds to UAS and initiates transcription of the transgene under control of UAS. The transgene is expressed only in cells where the *fipi* promoter is active. This allows to label these cells (GFP), suppress *fipi* expression with interfering RNA (RNAi), and block synaptic transmission TeTxLC, or (TNT)

В мозге экспрессия *GFP* была наиболее выраженной в нейронах оптических долей (ламина и медулла), в локальных интернейронах и их нейритах в антеннальных долях, а также в гамма-нейронах Кеньона (Kenyon cells, Aso et al. 2014) и их отростках в гамма-долях грибовидных тел (рис. 2). В ГБГ количество нейронов, маркированных *GFP*, было значительно меньше, однако тела и отростки этих нейронов обнаруживались во всех отделах ГБГ, включая область крылового нейропиля и брюшной сегмент ганглия. В последнем нейроны были наиболее крупные, с идентифицируемыми отростками, выходящими за пределы ганглия (рис. 2).

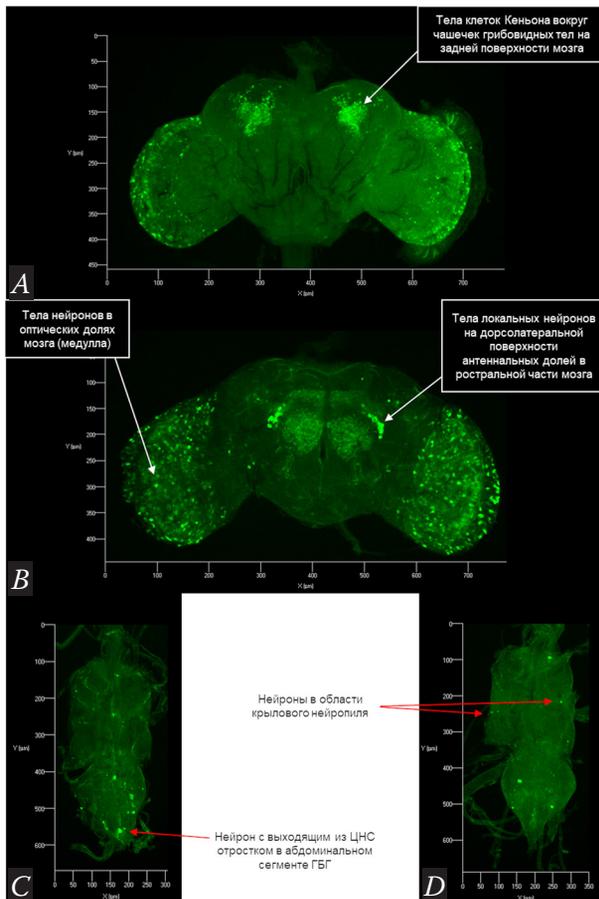


Рис. 2. Мозг и грудобрюшной ганглий (ГБГ) мух, экспрессирующих *GFP* под контролем драйвера *fipi-GAL4*. 3D-реконструкция из конфокальных срезов задней (A) и передней (B) частей мозга, вентральной (C) и дорсальной (D) частей ГБГ. Масштаб отображен на осях системы координат (ед. изм. — микрон). Пояснения см. в тексте

Fig. 2. The brain and the thoracoabdominal ganglion (TAG) of flies expressing *GFP* under control of the *fipi-GAL4* driver. 3D image stack reconstruction of confocal slices of the posterior (A) and anterior (B) brain, ventral (C) and dorsal (D) TAG. The scale is displayed on the axes of the coordinate system (given in microns). See the text for explanations

В исследовании Озкана с соавт. (Özkan et al. 2012) иммуноферментный анализ выявил физическое взаимодействие белка *Fipi* с белком *Fas2*, ген которого так же, как и *fipi*, ортологичен генам человека NCAM. Выполненное нами контрокрашивание образцов мозга антителами к *Fas2* белку не выявило его колокализации с *GFP* маркированными структурами. *Fas2* в наибольшей степени обнаруживался в альфа- и бета-долях грибовидных тел (рис. 3), что соответствовало описаниям паттерна распределения этого белка в работах других авторов (Keene, Waddell 2007). Возможно, взаимодействие белков *Fas2* и *Fipi* необходимо на этапах развития мухи для направленного роста нейритов, одной из основных функций *Fas2* (Kurusu et al. 2002). В пользу данного предположения свидетельствует непосредственная близость *Fas2*- и *Fipi*-структур, как, например, в ножках грибовидных тел (рис. 3).

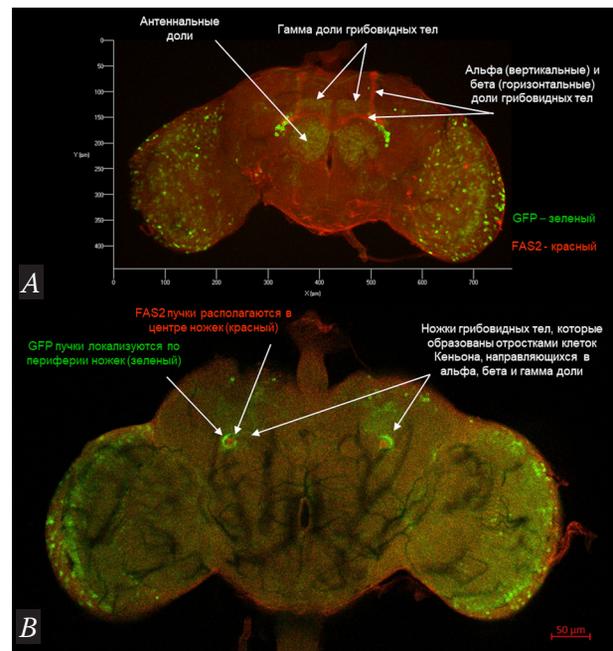


Рис. 3. Мозг самцов, экспрессирующих *GFP* под контролем драйвера *fipi-GAL4*. A, 3D-реконструкция из конфокальных срезов передней части мозга. B, конфокальный фронтальный срез в задней части мозга на уровне отхождения ножек от чашечек грибовидных тел. A — масштаб отображен на осях системы координат (ед. изм. — микрон); B — масштабная полоска: 50 микрон. Пояснения см. в тексте

Fig. 3. Male brain expressing *GFP* under the control of the *fipi-GAL4* driver. A, 3D image stack reconstruction of confocal slices of the anterior brain. B, confocal frontal slice in the posterior brain at the level of the pedunculi extending from the calyces of the mushroom bodies. A — the scale is displayed on the axes of the coordinate system (given in microns); B — scale bar: 50 microns. See the text for explanations

Ранее нами было установлено, что нокадаун гена *fipi* в ольфакторных сенсорных нейронах Or47b, Or67d, Ir84a, детектирующих феромоны, приводит к изменениям частоты импульсов в песне ухаживания самцов дрозофилы (Fedotov et al. 2018). Анализ паттерна экспрессии GFP в антеннах под контролем драйвера *fipi-GAL4* и драйверов, маркирующих нейроны Or47b, Or67d, Ir84a, показал отсутствие экспрессии *fipi* в нейронах, детектирующих феромоны, в том числе цВА. Драйвер *fipi-GAL4* маркировал лишь небольшое количество нейронов во втором сегменте и в основании третьего сегмента антенн (рис. 4).

Возможной причиной отсутствия в ольфакторных нейронах экспрессии GFP под контролем *fipi-GAL4* является то, что взятая нами промоторная область гена *fipi* лишь частично воспроизводит паттерн экспрессии гена. В пользу данного предположения свидетельствуют два факта. При нокадауне *fipi* под контролем драйвера *fipi-GAL4* не происходит сокращения межимпульсного интервала в песне ухаживания самцов дрозофилы (данные не показаны), как это происходит при использовании драйвера *Act5C-GAL4*, который экспрессируется во всех клетках организма (Fedotov et al. 2018). Во-вторых, нокадаун под контролем *fipi-GAL4* в меньшей степени подавляет экспрессию *fipi* в сравнении с драйвером *Act5C-GAL4*. Уровень экспрессии относительно контроля, принимаемого за 1, составляет 0,65 (95 % доверительный интервал: 0,58–0,7) и 0,11 (0,08–0,16) соответственно для *fipi-GAL4* и *Act5C-GAL4* (Fedotov et al. 2018).

Описанный нами паттерн экспрессии GFP под контролем промотора *fipi* указывает на вероятное участие *fipi* в процессах обработки обонятельных сигналов, что согласуется с нашими предыдущими выводами о вовлеченности данного гена в регуляцию песни ухаживания хемосигналами (Fedotov et al. 2018). Известно, что локальные интернейроны осуществляют регуляцию передачи обонятельных сигналов, в том числе и для феромонов, от сенсорных нейронов к проекционным нейронам в гломерулах антеннальных долей (Chou et al. 2010). В то же время активность в гамма-долях необходима для реализации выученных форм поведения, выработанных как на зрительные, так и на обонятельные условные сигналы (Vogt et al. 2014). Выявленная нами экспрессия *fipi* в клетках оптических долей согласуется с литературными данными о детекции транскрипта *fipi* в делящихся клетках в глазном имгинальном диске (Firth, Baker 2007), однако паттерн экспрессии в оптических долях требует дополнительных исследований для идентификации конкретных групп клеток.

Показано, что подавление активности гамма-нейронов приводит к нарушениям в запоминании в краткосрочном периоде (до 2 часов), а конкретно к реализации уже усвоенных элементов обучения (Trannoy et al. 2012). Более того, именно гамма-нейроны опосредуют на краткосрочном интервале (30 минут) подавление ухаживания самцов, вызываемое антиафродизиаком цВА, после безуспешного ухаживания за оплодотворенной самкой

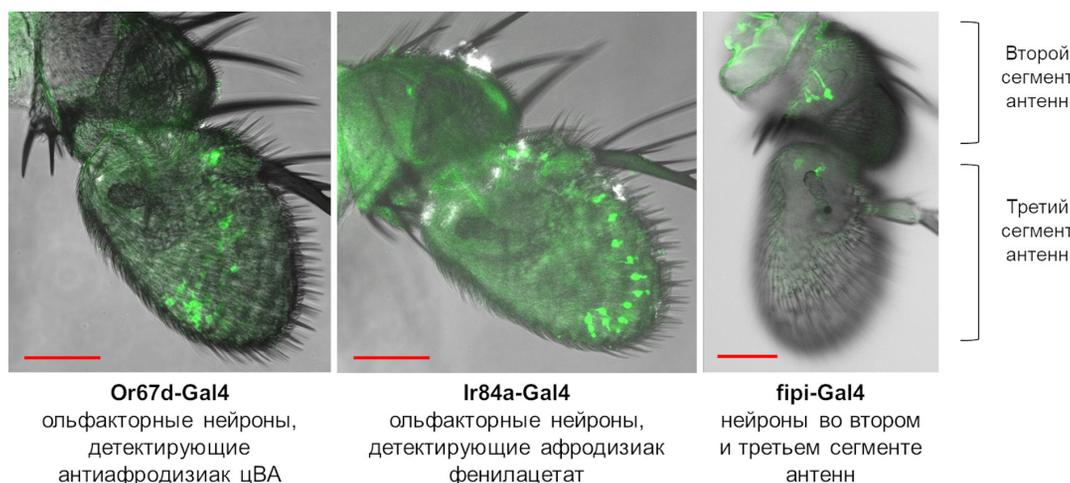


Рис. 4. Нейроны, экспрессирующие GFP на внутренней поверхности второго и третьего сегментов антенн под контролем драйверов *Or67d-Gal4*, *Ir84a-Gal4* и *fipi-Gal4*. Конфокальные срезы антенн, полученные в проходящем свете с одновременной флуоресцентной детекцией GFP (зеленый).

Масштабная полоска: 50 микрон

Fig. 4. Neurons expressing GFP on the inner surface of the second and third antenna segments under control of *Or67d-Gal4*, *Ir84a-Gal4* and *fipi-Gal4* drivers. Confocal slices of antennae are obtained in transmitted light with parallel fluorescence detection of GFP (green). Scale bar: 50 microns

(Keleman et al. 2012). На основании этих данных логично предположить участие *fipi*-нейронов в модификации самцами поведения ухаживания после их содержания с оплодотворенной самкой. Для проверки данного предположения нами был выполнено тестирование поведения ухаживания самцов дрозофилы, у которых с помощью системы трансгенов *GAL4/UAS* производилось либо блокирование синаптической передачи от *fipi*-нейронов, либо усиление возбудимости этих нейронов, либо подавление в них экспрессии самого гена *fipi*.

**Изменения в подавлении поведения ухаживания при блокировании или усилении активности нейронов, экспрессирующих *fipi***

Для оценки значения *fipi*-нейронов в поведении ухаживания и его регуляции было проанализировано потомство от скрещивания драйверной линии *fipi-GAL4* с линиями *UAS-TNT* и *UAS-NaChBac*. У мух *fipi-GAL4/UAS-TNT*

(далее *fipi-TNT*) блокируется синаптическая передача от нейронов, экспрессирующих *fipi* (Martin et al. 2002), у *fipi-GAL4/UAS-NaChBac* (далее *fipi-NaChBac*) усиливается возбудимость мембран *fipi*-нейронов (Nitabach et al. 2006). В контрольных скрещиваниях использовали драйверные линии, лишённые промотора перед геном *GAL4* (далее *CTRL-TNT* и *CTRL-NaChBac*). Дополнительным контролем служило потомство от скрещивания *fipi-GAL4* с трансгеном *UAS-TNT\**, продуцирующим неактивный мутантный столбнячный токсин (далее *fipi-TNT\**).

Подавление синаптической передачи у самцов *fipi-TNT*, подвергнутых ложной тренировке, не меняло частоту инициаций сеансов ухаживания (рис. 5А). После содержания с оплодотворенной самкой самцы *fipi-TNT* демонстрировали снижение интенсивности ухаживания, но в меньшей степени, нежели в контрольной группе *CTRL-TNT*. Анализ отдельных элементов ухаживания выявил у мух *fipi-TNT* также и ме-

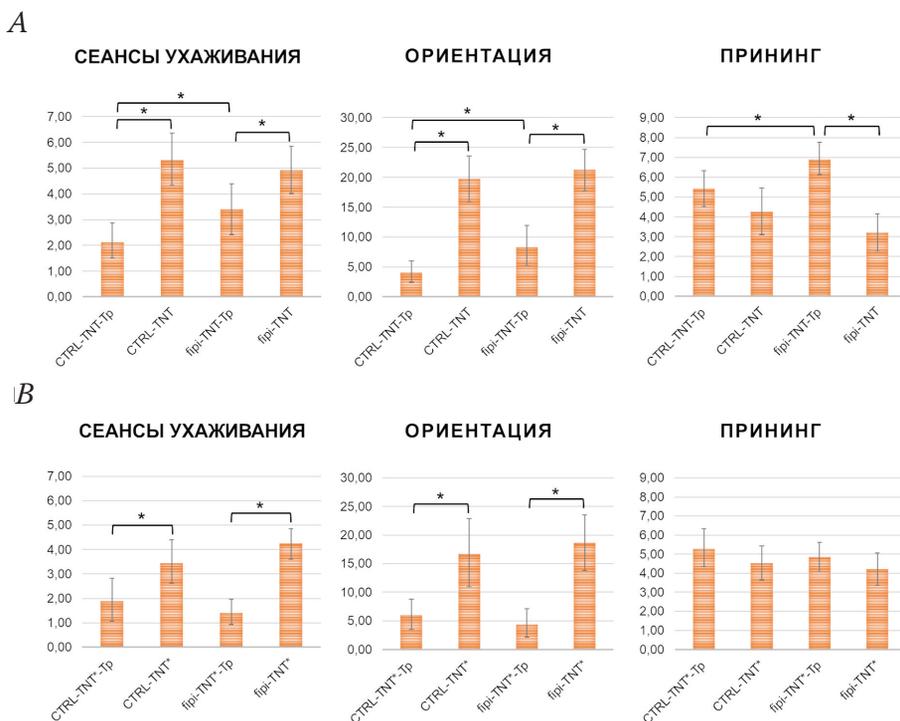


Рис. 5. Частоты сеансов ухаживания, ориентации и прининга (число инициаций за 100 с) после часового содержания самца с оплодотворенной самкой (тренировка) и в аналогичных условиях без самки (ложная тренировка). А — блокада синаптической передачи от *fipi*-нейронов столбнячным токсином: *fipi-TNT-Tr* — тренировка, *fipi-TNT* — ложная тренировка. Контроль без *fipi-Gal4* драйвера (отсутствие синаптической блокады): CTRL-TNT-Tr и CTRL-TNT. В — контроль с неактивным столбнячным токсином — TNT\*. Здесь и далее на рисунках 6–7 показаны средние значения и 95 % доверительные интервалы. Достоверные различия между группами отмечены звездочкой (двусторонний тест рандомизации,  $p < 0,05$ )

Fig. 5. Frequencies of courtship, orientation and preening sessions (number of initiations per 100 s) after an hour of keeping a male with a fertilized female (training) and under similar conditions without a female (false training). А — blockade of synaptic transmission from *fipi* neurons with tetanus toxin: *fipi-TNT-Tr* — training, *fipi-TNT* — false training. Controls without *fipi-Gal4* driver (lack of synaptic blockade): CTRL-TNT-Tr and CTRL-TNT. В — control with inactive tetanus toxin — TNT\*. Hereinafter, Figs. 6–7 show the mean values and 95% confidence intervals. Significant differences between the groups are marked with an asterisk (two-sided randomization test,  $p < 0.05$ )

нее выраженное подавление частоты ориентации (рис. 5А). Ориентация самца головой по направлению к самке на расстоянии, сравнимом с размерами тела, предположительно связана с восприятием ольфакторных сигналов (Ferveur 2005). Таким образом, менее эффективное подавление данного компонента ухаживания у самцов *fipi-TNT* может быть вызвано нарушениями в анализе или обусловливании ольфакторных стимулов, подавляющих ухаживание, что соотносится с нашими данными об экспрессии *fipi* в нейронах обонятельного анализатора и нейронах, ответственных за обучение. Кроме того, было выявлено усиление прининга после обучения у самцов *fipi-TNT* (рис. 5А). Прининг, или чистка тела лапками, не относится к элементам ухаживания, однако известно, что частота данного поведения возрастает у мух в группе и зависит от зрительного контакта (Connolly 1968). Показано, что прининг у самцов усиливается при прерывании ухаживания (Weidmann 1950), что рассматривается в данном контексте как смещенная активность. В нашем случае усиление прининга у самцов *fipi-TNT*

после обучения может быть связано с менее выраженным подавлением ухаживания: самец продолжает безуспешно ухаживать, что в итоге приводит к увеличению смещенной активности.

Отклонения в ухаживании и прининге после обучения отсутствовали в случае тестирования мух с неактивным столбнячным токсином (рис. 5В).

Усиление возбудимости *fipi*-нейронов у мух *fipi-NaChBac* не влияло на параметры поведения ухаживания. После содержания с оплодотворенной самкой частота сеансов ухаживания и ориентации снижались аналогично контрольным значениям, а прининг во всех тестируемых группах оставался неизменным (рис. 6А). Наряду с ориентацией уменьшались параметры преследования и вибрации крылом (данные не показаны).

Так как блокирование активности *fipi*-нейронов приводит к ослаблению подавления ухаживания (рис. 5А), то мы предположили, что усиление активности этих клеток может способствовать более длительному эффекту подавления, с учетом того, что часть этих *fipi*-клеток — это гамма-

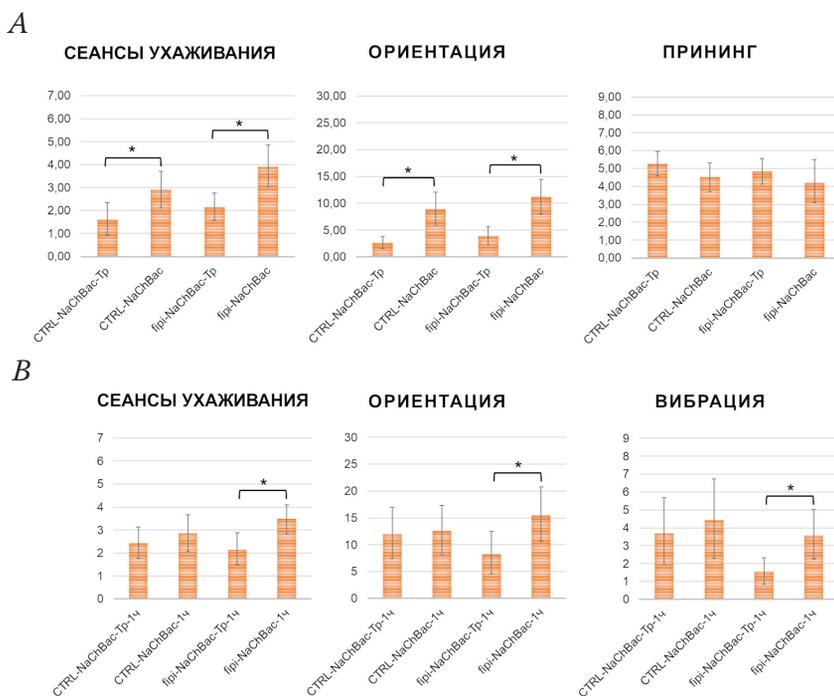


Рис. 6. Эффект усиления возбудимости мембран *fipi*-нейронов экспрессией бактериального натриевого канала. Показаны частоты сеансов ухаживания и отдельных элементов поведения (число инициаций за 100 с) после часового содержания самца с оплодотворенной самкой (тренировка) и в аналогичных условиях без самки (ложная тренировка). Опыт: *fipi*-NaChBac-Tr — тренировка; *fipi*-NaChBac — ложная тренировка. Контроль без *fipi-Gal4* драйвера: CTRL-NaChBac-Tr и CTRL-NaChBac. А — тест сразу после тренировки. В — тест через 1 час после тренировки. См. пояснения к рисунку 5

Fig. 6. Effect of an increased excitability of *fipi*-neuron membranes by expression of the bacterial sodium channel. Frequencies of courtship sessions and individual behavioral elements (number of initiations per 100 s) after an hour of keeping a male with a fertilized female (training) and under similar conditions without a female (false training). Experiment: *fipi*-NaChBac-Tr — training; *fipi*-NaChBac — false training. Controls without *fipi-Gal4* driver: CTRL-NaChBac-Tr and CTRL-NaChBac. A — test immediately after training. B — test 1 hour after training. See explanations for Fig. 5

нейроны, ответственные за реализацию краткосрочных модификаций поведения (Tranoy et al. 2012; Vogt et al. 2014). Для проверки данного предположения мы протестировали мух *fipi-NaChBac* не сразу, а через час после тренировки. Действительно, через час частота сеансов ухаживания у мух *fipi-NaChBac* сохраняла сниженные значения, в то время как в контрольной группе эффект подавления пропал (рис. 6B). Данное снижение отображалось также в параметрах ориентации и вибрации. Результаты этого эксперимента свидетельствуют о том, что *fipi*-нейроны могут участвовать в процессах сохранения следа памяти, по крайней мере, краткосрочной.

### Изменения в поведении ухаживания при нокадауне гена *fipi* под контролем драйвера *fipi-GAL4*

Ранее нами было показано, что нейроспецифичный нокадаун гена *fipi* приводит к усилению частоты инициации импульсной песни ухаживания (Fedotov et al. 2014). Нокадаун гена *fipi* под контролем *fipi-GAL4* (*fipi-RNAi*) также приводил к усилению частоты инициации вибрации крылом (коррелирует песенной активности) и ориентации у самцов, подвергнутых ложной тренировке (рис. 7). Нокадаун гена *fipi* не препятствовал обучению, при этом отличий между контролем и нокадауном у самцов после тренировки не обнаруживалось. Более того, если

в контроле сразу после тренировки происходило снижение частоты инициации вибрации в 2,3 раза, то при нокадауне это отношение составляло уже 8,1 (рис. 7).

Несмотря на отсутствие различий в параметрах ухаживания после тренировки, нокадаун *fipi*, однако, вызывал одно специфичное изменение в структуре ухаживания. Структурный анализ ухаживания выполнялся посредством оценки доли переходов от отдельного элемента ухаживания к другим элементам (число переходов конкретного типа относили к сумме всех переходов от данного элемента). Поведение ухаживания представляет собой комплекс фиксированных действий, т. е. запускаемую ключевым стимулом (феромоном) стандартную последовательность действий, которая начинается с ориентации и заканчивается попытками копуляции (Spieth 1974). В случае неудачной попытки самец чаще всего повторяет ритуал ухаживания, начиная снова с ориентации. Ни нокадаун *fipi*, ни изменения активности *fipi*-нейронов не вызывали после тренировки изменений в переходах между элементами в рамках отдельного цикла ухаживания (данные не показаны). Тем не менее нокадаун *fipi* сопровождался уменьшением доли переходов после неудачных попыток копуляции вновь к ориентации (рис. 8). Данный результат указывает на то, что при нокадауне *fipi* подавление ухаживания определяется не только снижением ча-

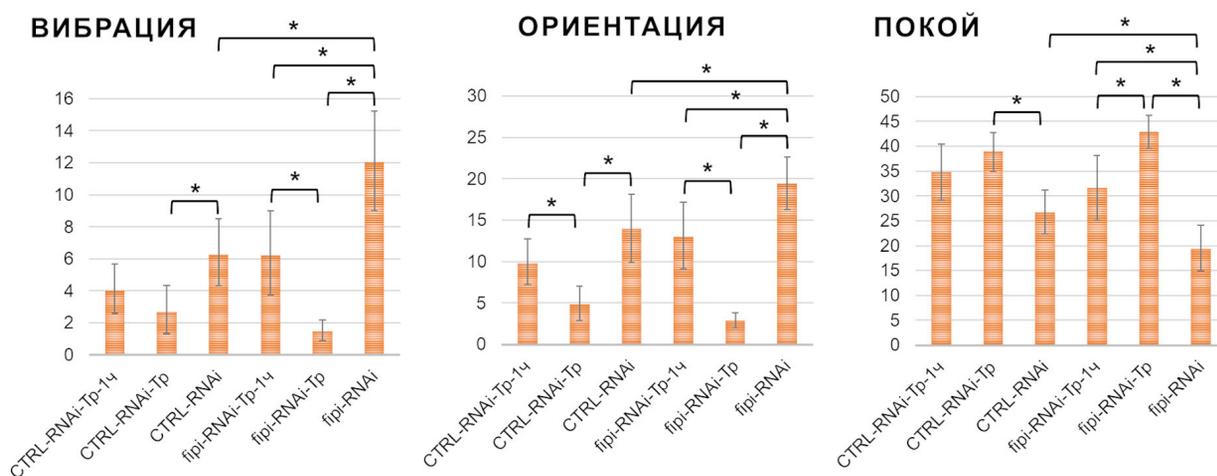


Рис. 7. Частота инициации вибрации (на бегу), ориентации и покоя при нокадауне гена *fipi* под контролем *fipi-GAL4* сразу и через час после тренировки (*fipi-RNAi-Tr*,  $n = 40$  и *fipi-RNAi-Tr-1ч*,  $n = 30$ ), а также при ложной тренировке (*fipi-RNAi*,  $n = 20$ , тест сразу). Контроль без *fipi-Gal4* драйвера: CTRL-RNAi-Tr ( $n = 40$ ), CTRL-RNAi-Tr-1ч ( $n = 30$ ) и CTRL-RNAi ( $n = 20$ ). См. пояснения к рис. 5

Fig. 7. Initiation frequencies of vibration (coupled with running), orientation and rest in *fipi* knockdown under control of *fipi-GAL4* immediately and one hour after training (*fipi-RNAi-Tr*,  $n = 40$  and *fipi-RNAi-Tr-1h*,  $n = 30$ ), as well as after false training (*fipi-RNAi*,  $n = 20$ , test immediately). Controls without *fipi-Gal4* driver: CTRL-RNAi-Tr ( $n = 40$ ), CTRL-RNAi-Tr-1h ( $n = 30$ ) and CTRL-RNAi ( $n = 20$ ). See explanations for Fig. 5

стоты инициации сеансов ухаживания, но и снижением частоты перехода к повторным циклам ухаживания, в случае если ухаживание завершилось неудачей.

Полученные в настоящем исследовании данные о влиянии гена *fipi* на поведение ухаживания и его модификацию после приобретения опыта ухаживания за оплодотворенной самкой несколько противоречивы. У самцов, подвергнутых ложной тренировке, нокаунт *fipi* приводил к существенному увеличению частоты инициации вибрации и ориентации (рис. 7). Это свидетельствует о том, что в норме экспрессия гена *fipi* может участвовать в механизмах, тормозящих запуск ухаживания. Также нокаунт способствовал более выраженному подавлению ухаживания после тренировки, что происходило, однако, только за счет более интенсивного ухаживания самцов, подвергнутых ложной тренировке, тогда как уровень ухаживания у тренированных самцов при нокауне не изменялся (рис. 7). Наоборот, при подавлении синаптической передачи от *fipi*-нейронов, где, в принципе, можно было ожидать эффект, сходный с эффектом

нокауна, наблюдалось менее эффективное снижение ухаживания после содержания с оплодотворенной самкой (рис. 5А). Активация (усиление возбудимости) *fipi*-нейронов способствовала сохранению следа памяти через 1 час после тренировки (рис. 6В). Эти достаточно убедительные результаты дают основание предполагать, что *fipi*-нейроны участвуют в механизмах формирования краткосрочной памяти после обучения с оплодотворенной самкой. Ксу Чжао с соавт. (Zhao et al. 2018) показали, что основой для ее формирования является устойчивая реверберация возбуждения в схеме с обратной связью, состоящей из трех классов нейронов: иннервирующих компартмент 5 гамма-долей грибовидных тел дофаминергических нейронов aSP13, холинергических гамма-нейронов грибовидных тел (клетки Кеньона) и их постсинаптических глутаматергических нейронов М6, имеющих возвратный синаптический вход на aSP13 нейроны. Обнаруженная нами экспрессия *fipi* в гамма-нейронах Кеньона (рис. 2А) позволяет предполагать, что продукт гена *fipi* может влиять либо на сам процесс реверберации

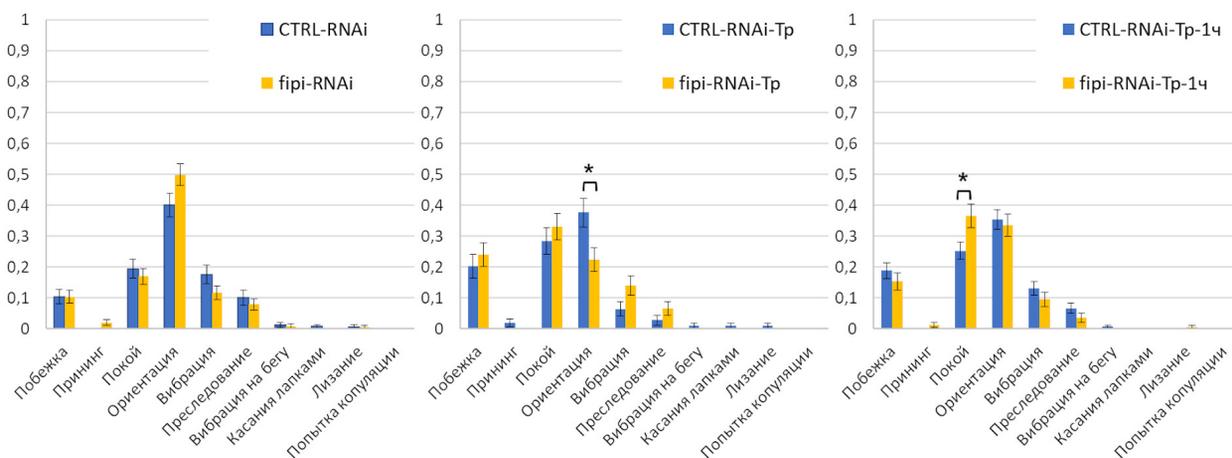


Рис. 8. Влияние нокауна *fipi* на частоту переходов от попытки копуляции к другим элементам поведения.

Показана доля каждого варианта перехода в общем количестве переходов от попытки копуляции и ее стандартная ошибка. Синим представлены данные по контрольным скрещиваниям с ложной тренировкой (CTRL-RNAi, n = 237), сразу (CTRL-RNAi-Tr, n = 109) и через 1 час после тренировки (CTRL-RNAi-Tr-1ч, n = 160); желтым — аналогичные данные для мух с нокауном *fipi* под контролем *fipi-GAL4*: ложная тренировка (*fipi*-RNAi, n = 162), сразу (*fipi*-RNAi-Tr, n = 121) и через 1 час после тренировки (*fipi*-RNAi-Tr-1ч, n = 212). При нокауне снижается доля переходов от попыток копуляции к ориентации сразу после тренировки и увеличивается доля переходов к покою через 1 час (отмечено звездочками, p < 0,05)

Fig. 8. The effect of the *fipi* knockdown on the frequency of transitions from attempted copulation to other elements of behavior. The proportions of each transition variant in the total number of transitions from attempted copulation and their standard errors are shown. Blue shows the control crosses with false training (CTRL-RNAi, n = 237), immediately (CTRL-RNAi-Tr, n = 109) and 1 hour after training (CTRL-RNAi-Tr-1h, n = 160); yellow — similar data for *fipi* knockdown under control of *fipi-GAL4*: false training (*fipi*-RNAi, n = 162), immediately (*fipi*-RNAi-Tr, n = 121) and 1 hour after training (*fipi*-RNAi-Tr-1h, n = 212). In knockdown, the proportion of transitions from attempted copulation to orientation decreases immediately after training, and the proportion of transitions to rest increases in 1 hour (marked with asterisks, p < 0.05)

возбуждения, либо на проистекающие из него процессы изменения синаптической пластичности, лежащие в основе формирования краткосрочной памяти. Однако выявленный нами паттерн экспрессии гена *fipi* предполагает возможность и других путей его влияния на поведение ухаживания.

### Благодарности

Мы благодарим Bloomington Drosophila Stock Center (NIH P40OD018537) на базе университета Индианы (США) и Vienna Drosophila RNAi Center на базе кампуса по обеспечению научной

поддержки (Австрия) за предоставление трансгенных линий мух с GAL4 и RNAi.

Моноклональные антитела 1D4, разработанные в университете Калифорнии, получены из Developmental Studies Hybridoma Bank, созданного национальным институтом здоровья НИИ и поддерживаемого на базе университета Айовы.

Мы крайне признательны доктору Константину Г. Илиади (Госпиталь для больных детей, Торонто, Канада) за разведение и пересылку мутантных линий в нашу лабораторию, а также ЦКП «Биоколлекция» при ИФ РАН за помощь в поддержании коллекции мух.

### References

- Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y. et al. (2014) The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife*, vol. 3, article e04577. DOI: 10.7554/eLife.04577 (In English)
- Auer, T. O., Benton, R. (2016) Sexual circuitry in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 38, pp. 18–26. DOI: 10.1016/j.conb.2016.01.004 (In English)
- Bonfanti, L., Theodosis, D. T. (2009) Polysialic acid and activity-dependent synapse remodeling. *Cell Adhesion & Migration*, vol. 3, no. 1, pp. 43–50. DOI: 10.4161/cam.3.1.7258 (In English)
- Chintapalli, V. R., Wang, J., Dow, J. A. T. (2007) Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature Genetics*, vol. 39, no. 6, pp. 715–720. DOI: 10.1038/ng2049 (In English)
- Chou, Y.-H., Spletter, M. L., Yaksi, E. et al. (2010) Diversity and wiring variability of olfactory local interneurons in the *Drosophila* antennal lobe. *Nature Neuroscience*, vol. 13, no. 4, pp. 439–449. DOI: 10.1038/nn.2489 (In English)
- Connolly, K. (1968) The social facilitation of preening behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour*, vol. 16, no. 2-3, pp. 385–391. DOI: 10.1016/0003-3472(68)90023-7 (In English)
- Duffy, J. B. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*, vol. 34, no. 1-2, pp. 1–15. DOI: 10.1002/gene.10150 (In English)
- Edgington, E. S. (1995) *Randomization tests*. 3<sup>rd</sup> ed., correct. and compl. New York: Marcel Dekker Publ., 409 p. (In English)
- Efron, B., Tibshirani, R. J. (1993) *An introduction to the bootstrap*. New York: Chapman and Hall, 456 p. (In English)
- Fedotov, S. A., Bragina, Ju. V., Besedina, N. G. et al. (2014) The effect of neurospecific knockdown of candidate genes for locomotor behavior and sound production in *Drosophila melanogaster*. *Fly*, vol. 8, no. 3, pp. 176–187. DOI: 10.4161/19336934.2014.983389 (In English)
- Fedotov, S. A., Bragina, Ju. V., Besedina, N. G. et al. (2018) Gene *CG15630 (fipi)* is involved in regulation of the interpulse interval in *Drosophila* courtship song. *Journal of Neurogenetics*, vol. 32, no. 1, pp. 15–26. DOI: 10.1080/01677063.2017.1405000 (In English)
- Ferveur, J.-F. (2005) Cuticular hydrocarbons: Their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behavior Genetics*, vol. 35, no. 3, article 279. DOI: 10.1007/s10519-005-3220-5 (In English)
- Firth, L. C., Baker, N. E. (2007) Spitz from the retina regulates genes transcribed in the second mitotic wave, peripodial epithelium, glia and plasmatocytes of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Developmental Biology*, vol. 307, no. 2, pp. 521–538. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.04.037 (In English)
- Fore, T. R., Ojwang, A. A., Warner, M. L. et al. (2011) Mapping and application of enhancer-trap flippase expression in larval and adult *Drosophila* CNS. *Journal of Visualized Experiments*, vol. 52, article e2649. DOI: 10.3791/2649 (In English)
- Goncharova, A. A., Bragina, Yu. V., Fedotov, S. A., Kamyshev, N. G. (2016) Vliyanie gruppovogo soderzhaniya na polovoe povedenie samtsov *Drosophila melanogaster* [Influence of group rearing on sexual behavior of *Drosophila melanogaster* males]. *Zhurnal evolyutsionnoj biokhimii i fiziologii — Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 52, no. 6, pp. 454–462. (In Russian)
- 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. DOI: 10.1101/lm.956309 (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. (In English)
- Karim, M. R., Endo, K., Moore, A. W., Taniguchi, H. (2014) Whole mount immunolabeling of olfactory receptor neurons in the *Drosophila* antenna. *Journal of Visualized Experiments*, vol. 87, article e51245. DOI: 10.3791/51245 (In English)

- Keene, A. C., Waddell, S. (2007) *Drosophila* olfactory memory: Single genes to complex neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 8, no. 5, pp. 341–354. DOI: 10.1038/nrn2098 (In English)
- Keleman, K., Vrontou, E., Krüttner, S. et al. (2012) Dopamine neurons modulate pheromone responses in *Drosophila* courtship learning. *Nature*, vol. 489, no. 7414, pp. 145–149. DOI: 10.1038/nature11345 (In English)
- Khanna, M. R., Stanley, B. A., Thomas, G. H. (2010) Towards a membrane proteome in *Drosophila*: A method for the isolation of plasma membrane. *BMC Genomics*, vol. 11, article 302. DOI: 10.1186/1471-2164-11-302 (In English)
- Kurusu, M., Awasaki, T., Masuda-Nakagawa, L. M. et al. (2002) Embryonic and larval development of the *Drosophila* mushroom bodies: Concentric layer subdivisions and the role of fasciclin II. *Development*, vol. 129, no. 2, pp. 409–419. (In English)
- Martin, J.-R., Keller, A., Sweeney, S. T. (2002) 1-targeted expression of tetanus toxin: A new tool to study the neurobiology of behavior. *Advances in Genetics*, vol. 47, pp. 1–47. DOI: 10.1016/s0065-2660(02)47001-0 (In English)
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G. et al. (1996) PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*, vol. 17, no. 3, pp. 413–422. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80174-9 (In English)
- Nitabach, M. N., Wu, Y., Sheeba, V. et al. (2006) Electrical hyperexcitation of lateral ventral pacemaker neurons desynchronizes downstream circadian oscillators in the fly circadian circuit and induces multiple behavioral periods. *The Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 2, pp. 479–489. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3915-05.2006 (In English)
- Özkan, E., Carrillo, R. A., Eastman, C. L. et al. (2013) An extracellular interactome of immunoglobulin and LRR proteins reveals receptor-ligand networks. *Cell*, vol. 154, no. 1, pp. 228–239. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.006 (In English)
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 9, article 36. DOI: 10.1093/nar/30.9.e36 (In English)
- Pfeiffer, B. D., Jenett, A., Hammonds, A. S. et al. (2008) Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 28, pp. 9715–9720. DOI: 10.1073/pnas.0803697105 (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 United States of America*, vol. 76, no. 7, pp. 3430–3434. DOI: 10.1073/pnas.76.7.3430 (In English)
- Spieth, H. T. (1974) Courtship behavior in *Drosophila*. *Annual Review of Entomology*, vol. 19, pp. 385–405. DOI: 10.1146/annurev.en.19.010174.002125 (In English)
- Tompkins, L. (1984) Genetic analysis of sex appeal in *Drosophila*. *Behavior Genetics*, vol. 14, no. 5, pp. 411–440. DOI: 10.1007/BF01065443 (In English)
- Trannoy, S., Redt-Clouet, C., Dura, J.-M., Preat, T. (2011) Parallel processing of appetitive short- and long-term memories in *Drosophila*. *Current Biology*, vol. 21, no. 19, pp. 1647–1653. DOI: 10.1016/j.cub.2011.08.032 (In English)
- Vogt, K., Schnaitmann, C., Dylla, K. V. et al. (2014) Shared mushroom body circuits underlie visual and olfactory memories in *Drosophila*. *eLife*, vol. 3, article e02395. DOI: 10.7554/eLife.02395 (In English)
- Weidmann, U. (1950) *Untersuchungen zur Ethologie von Drosophila. Die Balz- und Putzhandlungen [Studies of the Drosophila ethology. Courtship and preening]*. PhD dissertation (Biology) (as a manuscript). Zurich, Zurich University, 391 p. (In German)
- Yamamoto, D., Sato, K., Koganezawa, M. (2014) Neuroethology of male courtship in *Drosophila*: From the gene to behavior. *Journal of Comparative Physiology A*, vol. 200, no. 4, pp. 251–264. DOI: 10.1007/s00359-014-0891-5 (In English)
- Zhang, S. X., Rogulja, D., Crickmore, M. A. (2019) Recurrent circuitry sustains *Drosophila* courtship drive while priming itself for satiety. *Current Biology*, vol. 29, no. 19, pp. 3216–3228.e9. DOI: 10.1016/j.cub.2019.08.015 (In English)
- Zhao, X., Lenek, D., Dag, U. et al. (2018) Persistent activity in a recurrent circuit underlies courtship memory in *Drosophila*. *eLife*, vol. 7, article e31425. DOI: 10.7554/eLife.31425 (In English)