

УДК 575.22

Локус *agnostic* дрозофилы: вовлеченность в становление когнитивных нарушений при синдроме Уильямса

Е. А. Никитина^{1,2*}, А. В. Медведева^{1,3}, Г. А. Захаров^{1,3}, Е. В. Савватеева-Попова^{1,3}¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6²Российский государственный педагогический университет, 191186, Санкт-Петербург, наб. реки Мойки, 48³Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

*E-mail: 21074@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2013

После доработки 10.04.2014

РЕФЕРАТ Молекулярная основа патологических процессов, влекущих развитие геномных болезней, одинакова у высших беспозвоночных и млекопитающих. Поскольку когнитивные расстройства при такой геномной болезни, как синдром Уильямса, вызываются гемизиготностью по гену *limk1*, то может ли созданная нами на дрозофиле модель этого синдрома с привлечением аллелей дикого типа и мутантов локуса *agnostic*, несущего ген *limk1*, способствовать анализу двух диагностических признаков триады когнитивных нарушений синдрома Уильямса? К ним относятся дефектность зрительно-пространственной ориентации и необычайно высокая степень сосредоточенности на лицах при внутривидовых взаимодействиях с незнакомыми. Подходом к изучению первого симптома может быть анализ локомоторного поведения личинки, при котором реализуется исследование окружающей среды, непременно вовлекающее зрительно-пространственную ориентацию. Подходом к изучению второго симптома может быть анализ самого естественного для взрослых особей дрозофилы контактов самца и самки при реализации полового ритуала, первым этапом которого является ориентация самца по отношению к самке и преследование ее при постоянной фиксации на образе преследуемой. Решению данных вопросов и посвящено данное исследование. Моделирование синдрома Уильямса с привлечением мутантных и спонтанных вариантов локуса *agnostic* позволило выявить влияние изменения структуры гена *limk1* на локомоторные и когнитивные проявления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дрозофила, локомоторная активность, обучение, память, синдром Уильямса, LIMK1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИО – индекс обучения; ИУ – индекс ухаживания; УРПУ – условно-рефлекторное подавление ухаживания.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении последних 20 лет считалось, что одной из самых привлекательных моделей, позволяющих напрямую связать гены, мозг и поведение, является синдром Уильямса [1, 2]. К возникновению синдрома приводит делеция протяженностью 1500 т.п.н. в районе 7q11.23, специфическая архитектура которого предрасполагает к неравной рекомбинации. В делецию попадает около 20 генов, и их гемизиготность проявляется как нарушение развития, характеризующееся сердечно-сосудистыми проблемами, специфическими, эльфоидными чертами лица и несколькими типичными неврологическими аномалиями и когнитивными особенностями [3]. Гемизиготность по гену LIM-киназы 1 (LIMK1 – ключевой фермент ремоде-

лирования актина) вызывает когнитивные нарушения. Они описываются триадой проявлений: 1) резко выраженный дефект зрительно-пространственного ориентирования; 2) промежуточный, варьирующий в зависимости от сложностей языковой культуры вербально-лингвистический дефект; 3) необычайно высокая пристальность взгляда – прикованность к лицам.

Эксперименты на высших животных имеют крайне высокую стоимость, поэтому для поиска и тестирования лекарственных препаратов, способных корректировать возникающие нарушения, требуются простые животные модели.

Можно ли в этих целях использовать дрозофилу? С одной стороны, функции генов болезней человека

часто устанавливаются по характеру проявления мутаций в гене дрозофилы, когда его последовательность такая же, как и выявленная для гена человека. С другой стороны, у дрозофилы известны все гены, собранные у млекопитающих вместе в одном критическом районе, входящем в делецию при синдроме Уильямса (напомним, что ген *frizzled-9* был впервые описан у дрозофилы). Несмотря на другой способ эволюционной организации генома дрозофилы, при котором эти гены находятся в разных хромосомах, подход к анализу действия конкретного гена в генезе синдрома Уильямса возможен при следующих условиях: 1) должны быть известны мутации данного гена, гемизиготность по которым приводила бы у дрозофилы к проявлению мутантного фенотипа; 2) архитектура района хромосомы, в котором локализован ген дрозофилы, может предрасполагать к возникновению хромосомных перестроек за счет неравной рекомбинации; 3) в районе локализации гена должна быть зарегистрирована повышенная частота рекомбинации, что может приводить к спонтанной генерации делеций или других перестроек. Это должно выражаться в специфичном для района полиморфизме в линиях дикого типа. Всем этим условиям удовлетворяет обнаруженный и охарактеризованный нами локус *agnostic*, несущий ген, кодирующий LIMK1.

Локус *agnostic* был обнаружен в районе 11В X-хромосомы при проведении целенаправленного скрининга температурочувствительных (*ts*) мутаций, индуцированных этилметансульфонатом (ЭМС), которые могли бы нарушать активность ферментов синтеза и распада сАМР [4]. У мух с мутацией *agn^{ts3}* наблюдается необычайно высокая активность Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой фосфодиэстеразы 1 [5]. Гетерозиготы по делеции *Df(1)368* (обнажающей этот район) и *Df(1)112* (изолированной нами по признаку *ts*-летальности в сочетании с *agn^{ts3}*) также гибнут при развитии при 29°C, т.е. мутантный фенотип проявляется, как и при синдроме Уильямса, в гемизиготном состоянии. Молекулярно-генетические исследования показали, что ген *agnostic* кодирует фермент LIMK1, содержащий повтор из двух LIM-доменов, фланкированный протяженными АТ-богатыми повторяющимися последовательностями (The National Centre for Biotechnology Information, NCBI). В этом районе наблюдается повышенная частота неравной рекомбинации, чем и обусловлен ярко выраженный полиморфизм у линий дикого типа *Canton-S* (*CS*), *Berlin* и *Oregon-R* (*Or-R*) [6–8].

Таким образом, ген *agnostic* в силу своего строения и нуклеотидного окружения может служить генетическим резервом полиморфизма и быть удобной моделью геномных болезней, таких, как синдром Уильямса. Если так, то может ли эта модель спо-

собствовать анализу таких двух диагностических признаков триады когнитивных нарушений при синдроме Уильямса, как дефектность зрительно-пространственной ориентации и необычайно высокая степень сосредоточенности на лицах при внутрипарных взаимодействиях с незнакомыми?

Ответ на первый вопрос мог бы дать анализ локомоторного поведения личинок, при котором одновременно реализуется исследование окружающей среды, непременно вовлекающее зрительно-пространственную ориентацию, и питание, достигаемое при ползании личинки по субстрату. Второй вопрос также можно решить при анализе самого естественного для взрослых особей дрозофилы контакта самца и самки при осуществлении полового ритуала, первым этапом которого является ориентация самца по отношению к самке и преследование ее, сочетающее как двигательную активность, так и постоянную фиксацию на образе преследуемой.

В настоящей работе показаны изменения параметров двигательной активности личинок и резкие нарушения траекторий движений при ориентации в пространстве у самцов *Oregon-R* и *agn^{ts3}*. У имаго этих же линий выявлены сильные дефекты обучения и памяти при условно-рефлекторном подавлении ухаживания за счет резко повышенной ориентации по отношению к партнеру и его преследованию.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии дрозофилы

В работе использовали линии, проявляющие полиморфизм в районе локализации локуса *agnostic* (X-хромосома, 11В).

1. Линия дикого типа *Canton-S* (*CS*), на генетическом фоне которой поддерживается температурочувствительная (*ts*) мутация по локусу *agnostic* – *agn^{ts3}*.

2. Линия дикого типа *Berlin*, выделенная из природной популяции Берлина и имеющая существенные нарушения регуляции гена *limk1*.

3. Линия дикого типа *Oregon-R* (*Or-R*). ПЦР-картирование гена *limk1* выявляет отсутствие фрагмента между праймерами, ограничивающими район, куда попадают оба LIM-домена и часть PDZ-домена.

4. *agn^{ts3}* – мутант по содержащему ген *limk1* локусу *agnostic*, несущий вставку 1.7 т.п.н., удаленную приблизительно на 1 т.п.н. от 3'-нетранслируемой области гена *limk1* в области локализации А/Т-богатого района.

Изучение двигательной активности личинок

Локомоторное поведение личинок дрозофилы изучали при помощи оригинальной автоматизированной конструкции, созданной Г.А. Захаровым

и Т.Л. Паялиной (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН) на основе установки для регистрации локомоторного поведения имаго дрозофилы, сконструированной Н.Г. Камышевым и соавт. [9]. Для регистрации локомоторного поведения личинок использовали круглые камеры диаметром 20 мм. Перемещение личинки отслеживали с помощью видеокамеры Logitech QuickCam. Для автоматизированной регистрации поведения использовали оригинальную компьютерную программу, разработанную Г.А. Захаровым и Н.Г. Камышевым. Длительность эксперимента 1 ч, температура в камерах 23–24°C.

Для анализа периодов покоя и движения общую запись разбивали на кванты, равные 1 с. Затем вычисляли скорость движения личинки на данном кванте. Если полученное значение было меньше порогового (0.5 мм/с), то считали, что личинка в течение данного кванта времени находилась в покое, в противном случае – личинка двигалась. Соседние кванты с одинаковым характером движения объединяли, формируя периоды движения и покоя.

Для анализа динамики параметров локомоторной активности общее время записи разделяли на интервалы длиной 300 с. Каждый период покоя или движения считали принадлежащим тому интервалу, на котором он начался. Для каждого интервала также считали частоту побегов (количество инициаций движения за 100 с) и индекс активности (доля времени, проведенного в движении). Анализировали не менее 25 личинок каждой линии. Статистическую значимость различий между экспериментальными группами определяли с помощью дисперсионного анализа по Краскелу–Уоллису с последующим множественным сравнением средних рангов для всех экспериментальных групп. Распределение траекторий сравнивали с использованием парного *t*-критерия для долей. Статистическую значимость всех различий рассчитывали при уровне значимости $p < 0.05$.

Оценка способности к обучению и сохранению памяти

Для выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ) 5-суточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру из оргстекла (диаметр – 15 мм) с оплодотворенной 5-суточной самкой *Canton-S* и оставляли на 30 мин (тренировка). Обучение и память тестировали сразу (0 мин) и через 3 ч (180 мин) после тренировки, используя новых оплодотворенных самок *Canton-S* в возрасте 5 сут. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения (наивных). Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 с, фиксируя время начала отдельных эле-

ментов ухаживания (ориентация, вибрация, лизание, попытка копуляции), а также время исполнения элементов, не связанных с ухаживанием (побежка, прининг, покой). Регистрацию начинали через 45 с после помещения мухи в камеру. Для расшифровки и анализа данных использовали специально разработанные компьютерные программы (автор программ – Н.Г. Камышев). Вычисляли индекс ухаживания (ИУ) для каждого самца, т.е. время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах от общего времени наблюдения. Для количественной оценки результатов обучения вычисляли индекс обучения (ИО) по следующей формуле:

$$\begin{aligned} \text{ИО} &= [\text{ИУ}_H - \text{ИУ}_T] / \text{ИУ}_H \times 100\% = \\ &= (1 - \text{ИУ}_T / \text{ИУ}_H) \times 100\%, \end{aligned}$$

где ИУ_H и ИУ_T – средние индексы ухаживания в независимых выборках самцов, не имеющих опыта полового поведения, и самцов, прошедших тренировку. Статистическую обработку результатов проводили при помощи рандомизационного анализа [10–12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Суммарные отличия параметров локомоторной активности

Наиболее общим параметром, отражающим локомоторную активность личинок, является индекс активности, представленный на рис. 1.

Линия *CS* имеет более высокий индекс активности (0.34), чем все другие линии. Это заметно по медиане и обоим квартилям. Статистически значимых различий между линиями *agn^{ts3}*, *Berlin* и *Or-R* по этому параметру не выявлено.

Изменения индекса активности могут происходить за счет изменения частоты совершения побегов и их длительности. Межлинейные различия по частоте побегов полностью аналогичны различиям в индексе активности. Это значит, что изменение индекса активности в основном можно объяснить снижением частоты побегов, однако могут существовать и различия в длительности побежки.

По этому параметру линия *CS* также отличается от всех остальных линий. Линия *CS* характеризуется большим средним временем побежки. Кроме того, выявлено отличие линии *Berlin* от *Or-R* и *agn^{ts3}*, которого не наблюдали при рассмотрении индекса активности.

Следующий параметр, независимый от рассмотренных ранее, – скорость побежки. Наибольшее значение скорости побежки также зафиксировано у личинок *CS*. Далее следует линия *agn^{ts3}*, затем

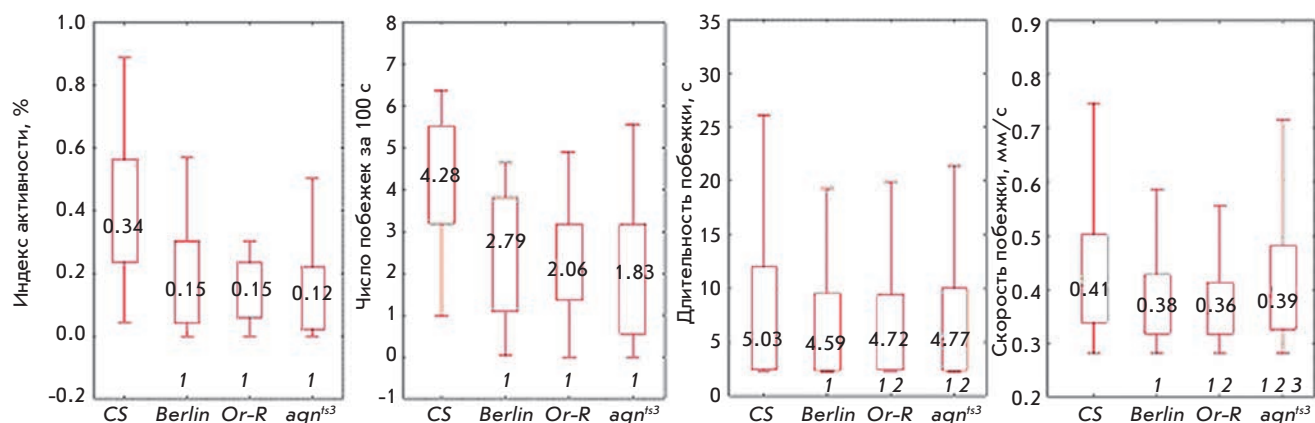


Рис. 1. Суммарные параметры локомоторной активности личинок. 1 – отличие от *CS*; 2 – отличие от линии *Berlin*; 3 – отличие *agn^{ts3}* от *Or-R*. Дисперсионный анализ по Краскелу–Уоллису с последующим множественным сравнением средних рангов для всех экспериментальных групп, $p < 0.05$

Berlin и *Or-R*. Такое же распределение имеют оба квартиля.

Временная динамика параметров локомоторной активности

Временная зависимость параметров локомоторной активности представлена на рис. 2. Личинки *CS* активно движутся в первый момент после их помещения в экспериментальные камеры. Медиана индекса активности составляет примерно 0.55. В дальнейшем активность плавно снижается. Начиная с 40-й мин эксперимента медиана индекса активности составляет 0.3 и далее не меняется.

Личинки линий *Berlin* и *agn^{ts3}* в нормальных условиях характеризуются существенно более низким уровнем подвижности, чем *CS*. Медиана индекса активности составляет 0.1–0.15. Различия значимы вплоть до 25-й мин эксперимента и на 35-й мин. Затем различия исчезают вследствие падения активности личинок *CS*. Мутанты *agn^{ts3}* имеют еще более низкую активность, отличия от *CS* статистически значимы в течение всего эксперимента. Линия *Or-R* изначально имеет более низкую подвижность, чем *CS*, хотя при этом она выше, чем у *Berlin* и *agn^{ts3}*. В ходе эксперимента активность личинок *Or-R* быстро падает, и начиная с 30-й мин значимо отличается от активности личинок *CS*.

Теперь рассмотрим подробно параметры, вносящие вклад в изменение индекса активности. Динамика частоты побегов сходна с динамикой индекса активности. Линия *CS* характеризуется достаточно большой частотой побегов (медиана примерно 5.5×10^{-2} Гц), которая плавно снижается и достигает приблизительно 3.6×10^{-2} Гц к концу эксперимента.

Линия *Or-R* изначально имеет такую же частоту побегов, как и *CS* (на 5-й мин эксперимента она статистически значимо выше, чем у *Berlin* и *agn^{ts3}*). Частота побегов быстро падает и к 30-й мин эксперимента становится ниже, чем у *CS*. Линия *agn^{ts3}* имеет более низкую частоту побегов, чем *CS* в течение всего эксперимента. Линия *Berlin* изначально имеет более низкую частоту побегов, чем *CS*, однако после 25-й мин эти различия исчезают.

Таким образом, наибольшими по сравнению с *CS* дефектами характеризуется линия *agn^{ts3}*. Заметно также различие в динамике активности линий *Berlin* и *Or-R*. Более низкая подвижность *Or-R* связана с быстрым падением активности в ходе эксперимента. Линия *Berlin* имеет изначально более низкую активность, но она падает медленнее, чем у *CS*, поэтому во второй половине эксперимента статистически значимые различия исчезают.

Весьма интересной оказалась динамика продолжительности побегов. Мухи линии *CS* в течение всего эксперимента (за исключением первых 5 мин) имеют практически постоянное время побегов, равное 5 с. Линия *Berlin* также сохраняет постоянную длительность побегов, равную 4.5 с (различия статистически значимы до 55-й мин). Линия *Or-R* изначально имеет практически такую же длительность побегов, как и *CS*, и значимо большую, чем у *Berlin*. В интервале с 20-й по 25-ю мин длительность побегов резко падает и остается стабильной на уровне 2.5 с. Линия *agn^{ts3}* до 55-й мин имеет такую же длительность побегов, как и *CS*. Различия наблюдаются только на 60-й мин. В ряду точек (5–15, 25, 35 мин) длительность побегов *agn^{ts3}* статистически значимо выше, чем у *Berlin*. Значимых отличий от линии *Or-R* не обнаружено.

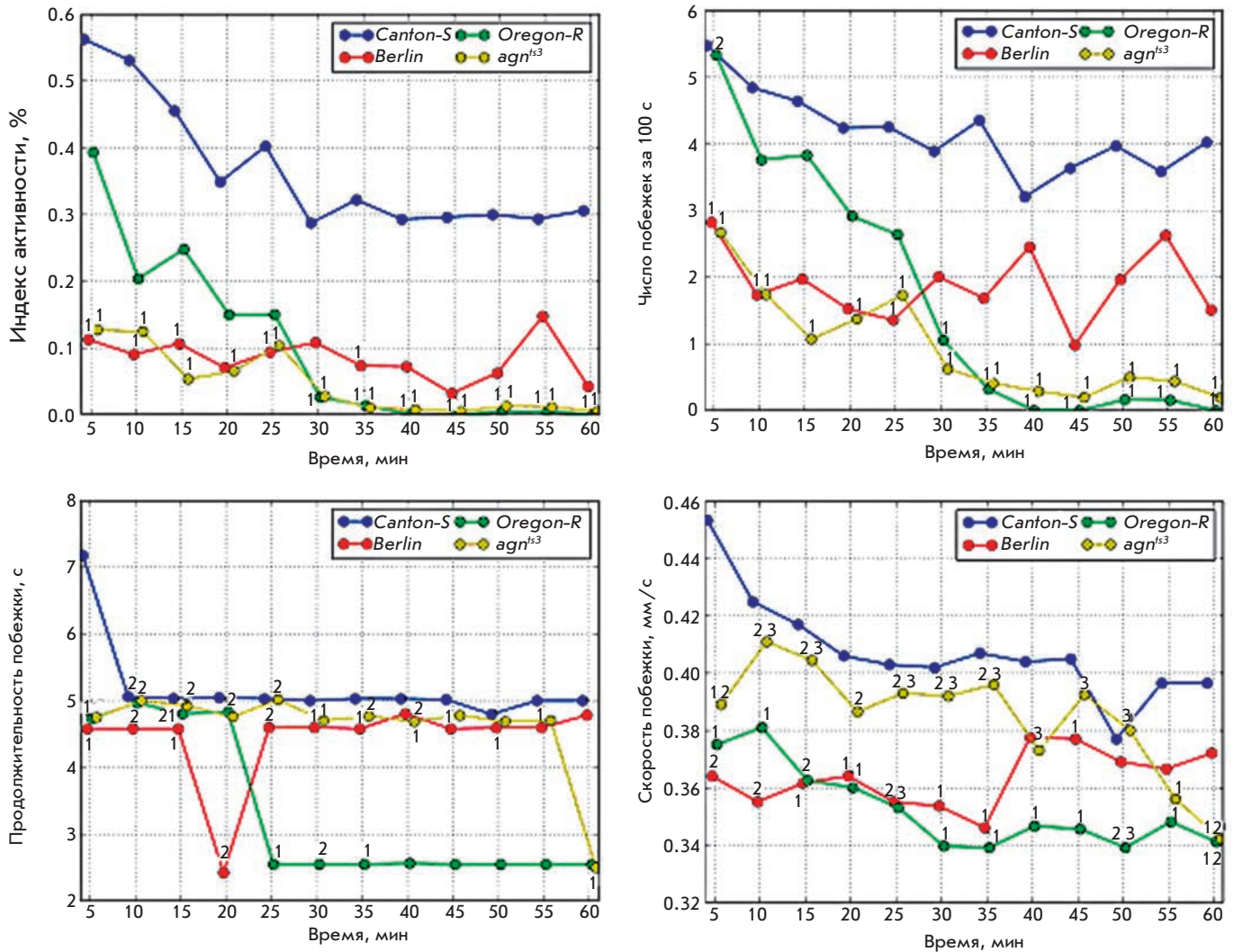


Рис. 2. Временная динамика индекса активности и скорости побежки личинок. Точки показывают медианы распределений. 1 – отличие от *CS*; 2 – отличие от линии *Berlin*; 3 – отличие *agn^{ts3}* от *Or-R*. Дисперсионный анализ по Краскелу–Уоллису с последующим множественным сравнением средних рангов для всех экспериментальных групп, $p < 0.05$

В начале эксперимента личинки линии *CS* имеют самую высокую скорость движения (порядка 0.45 мм/с), которая достаточно быстро снижается и достигает 0.4 мм/с к концу. Линия *Berlin* изначально имеет более низкую скорость движения, чем *CS* (порядка 0.36 мм/с). Но при этом скорость движения не падает, а, напротив, слегка возрастает к концу эксперимента. Поэтому, начиная с 40-й мин эксперимента, различия между *Berlin* и *CS* исчезают. Линия *Or-R* в течение всего эксперимента имеет более низкую скорость движения, чем *CS* (0.38 в начале и около 0.34 мм/с к концу). На 50-й и 60-й мин зафиксированы статистически значимые отличия от линии *Berlin*. При этом общая

скорость побежки у линий *Berlin* и *Or-R* отличается статистически значимо в течение всего эксперимента. Линия *agn^{ts3}* имеет высокую скорость побежки. С 10-й по 50-ю мин подобные отличия от линии *CS* отсутствуют. В целом ряде точек наблюдаются отличия от линий *Berlin* (55–15, 25–35, 60) и *Or-R* (10–50).

Таким образом, изучение временной динамики параметров локомоторной активности показало, что индекс активности личинок и частота побежек падают в ряду *CS* → *Berlin* → *Or-R* → *agn^{ts3}*. Причем у *Berlin* низкие значения индекса активности сохраняются в течение всего эксперимента, в то время как *Or-R* характеризуется очень быстрым падением изначально-



Рис. 3. Образцы классов треков. 1 – полностью заполняющие экспериментальную камеру – все доступное для передвижения пространство; 2 – с незначительными дефектами заполнения – передвижения в пространстве; 3 – со значительными дефектами передвижения в пространстве; 4 – не полностью очерченная окружность движений в пространстве; 5 – не имеющие полностью очерченной окружности и со значительными дефектами передвижения в пространстве; 6 – с ярко выраженными дефектами передвижения в пространстве

но высокого индекса активности. По длительности побегки наибольшее отличие демонстрирует линия *Or-R*, в то время как *agn^{ts3}* ближе к дикому типу. Повидимому, именно это перекрестное изменение длительности и частоты побегки приводит к отсутствию различий в индексе активности между линиями *Berlin*, *Or-R* и *agn^{ts3}*. Скорость побегки падает в ряду *CS* → *agn^{ts3}* → *Berlin* → *Or-R*.

Распределение по форме траекторий движения (треков)

Характеристика способности к зрительно-пространственному ориентированию, т.е. того, как животное способно ориентироваться в окружающей среде при реализации исследовательской активности и прекращает ее с течением времени, может быть получена при анализе треков (траекторий движения). Все проанализированные треки были разделены на шесть классов. Характерный вид треков каждого класса представлен на рис. 3.

Распределение треков личинок по классам выявляет существенные межлинейные различия. Наиболее заметно снижение количества треков класса 1 примерно в 3 раза у *Berlin*, *Or-R* и *agn^{ts3}* по сравнению с *CS* (рис. 4). У линии *Berlin* статистически значимо возрастает количество треков классов 3 и 6.

У линии *Or-R* также достоверно увеличивается только количество треков класса 4. У линии *agn^{ts3}* наблюдается уменьшение треков класса 2 и заметное возрастание количества треков класса 3.

Таким образом, каждая линия имеет свойственные ей дефекты локомоторного поведения. Для линии *Berlin* характерно снижение индекса активности и нарушение распределения треков. У линии *Or-R* наблюдается дефект спонтанной активности, что выражается в быстром падении индекса актив-

ности с течением времени. Мутанту *agn^{ts3}* свойственно падение индекса активности при сохранении скорости движения. Все эти нарушения могут свидетельствовать о существенных дефектах зрительно-пространственного ориентирования, проявляющихся у линий *Berlin*, *Or-R* и *agn^{ts3}*.

Изучение двигательной активности имаго и ее вклада в когнитивные способности

Регистрация поведения при условно-рефлекторном подавлении ухаживания позволяет вычислять индекс обучения (ИО) не только на основе учета всех элементов неполового (двигательная активность, принижение, отдых) и полового поведения (ориентация/преследование, вибрация крылом – брачная песня, тэппинг, ликинг, попытка копуляции), но и анализировать записанные этограммы поведения отдельно для каждого параметра. Рис. 5 иллюстрирует, что, как показано ранее, не только у мутантов *agn^{ts3}* [8], но и у самцов линии *Oregon-R* [13] драматически нарушены процессы обучения и формирования среднесрочной 3-часовой памяти.

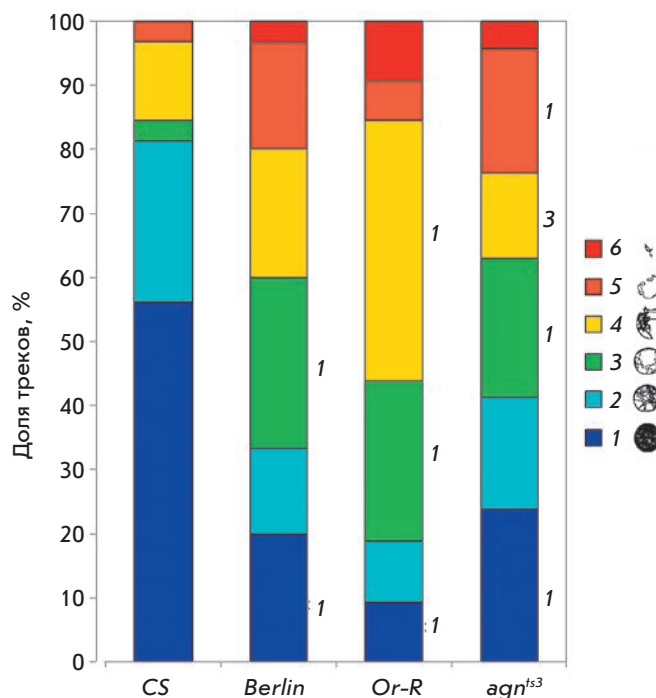


Рис. 4. Сравнение распределений треков по классам. 1 – отличие от *CS*; 3 – отличие *agn^{ts3}* от *Or-R*. Парный *t*-критерий для долей, $p < 0.05$

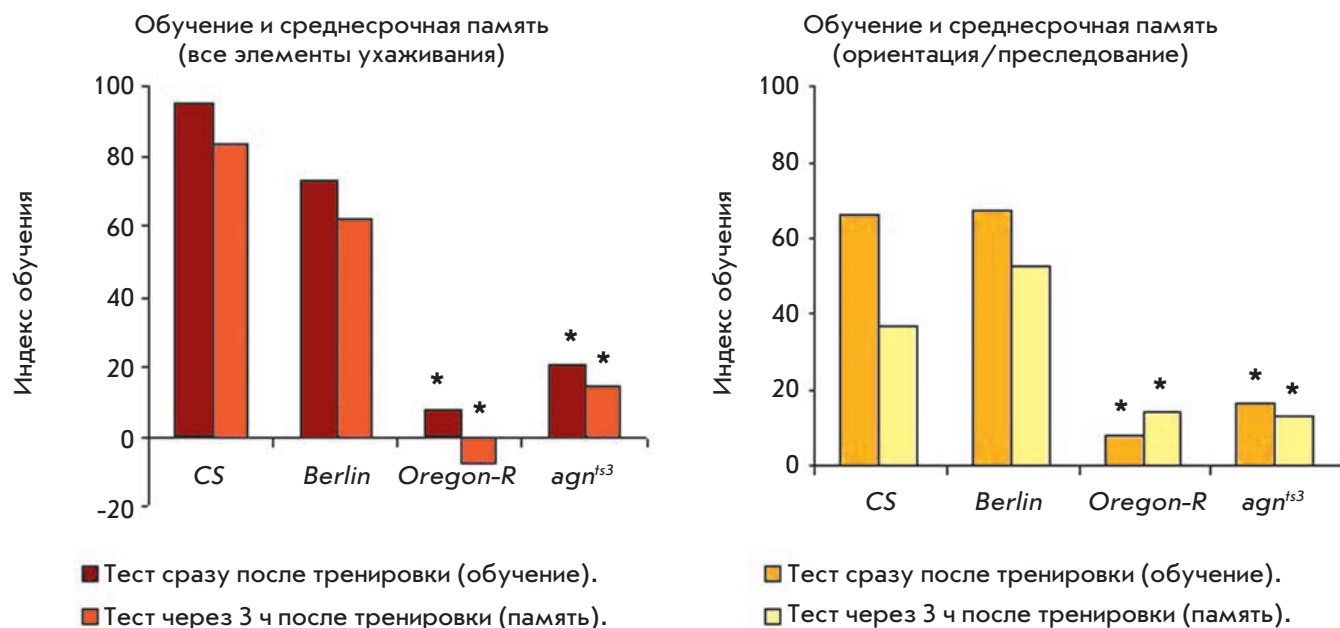


Рис. 5. Дефекты ориентации и преследования при нарушениях обучения и памяти. * – отличия от CS, $p < 0.05$, двусторонний тест рандомизации

Если вычислить индекс обучения с учетом какого-либо одного элемента полового поведения, то можно определить, за счет чего возникают дефекты обучения и памяти. Оказалось, что основной вклад в общее подавление ухаживания вносит подавление ориентации/преследования. По данному параметру самцы *Oregon-R* и *agn^{ts3}* оказались неспособными к обучению – сразу после тренировки выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания не происходило. Через 3 ч после тренировки индекс обучения сохранялся на том же уровне и также статистически значимо отличался от ИО у *Canton-S*. Из рис. 5 видно, что дефекты обучения и памяти у линий *Oregon-R* и *agn^{ts3}* объясняются нарушениями ориентации/преследования.

Рассмотрим это подробнее, уделяя внимание такому показателю локомоторного поведения имаго при внутривидовом взаимодействии, как двигательная активность самцов, не зависящая от полового поведения. Как следует из рис. 6, в контроле, у наивных самцов линий *Oregon-R* и *agn^{ts3}*, двигательная активность статистически значимо выше, чем у линии дикого типа *CS*; сразу после тренировки и через 3 ч после нее уровни активности были сопоставимы с уровнями у самцов *CS*.

Что касается связанной с половой деятельностью активности – ориентации/преследования (внутрипарное взаимодействие самца и самки), то она в 2 раза меньше у самцов *Berlin* и *Oregon-R*, но в 2 раза выше

уровня дикого типа у самцов *agn^{ts3}*. Именно эта форма активности должна резко уменьшаться после тренировки, когда наблюдается условно-рефлекторное подавление ухаживания, проявляющееся в резком уменьшении доли связанной с половой деятельностью активности и резком же возрастании доли обычной двигательной активности. Это и наблюдается сразу после тренировки у самцов *CS*, *Berlin* и *Oregon-R*, но не у мутантов *agn^{ts3}*, у которых активность, связанная с половой деятельностью, четырехкратно превышает таковую у *CS*, что свидетельствует о дефектности обучения. Через 3 ч после тренировки, когда показатели ориентации/преследования могут слегка падать, как у *CS*, у *agn^{ts3}* ориентация/преследование превышает уровень линии *CS* в 2 раза. При этом вклад данного компонента в традиционно рассчитываемые индексы ухаживания составляет у линии дикого типа *CS* 35% (обучение) и 42% (память), у линии дикого типа *Berlin* – 33% (обучение) и 34% (память), у линии дикого типа *Oregon-R* – 50% (обучение) и 40% (память), а у мутантов *agn^{ts3}* – 85% (обучение) и 83% (память).

Таким образом, каждая линия проявляет свойственное ей соотношение двух форм активности. Повидимому, это дает хорошую возможность для тестирования диагностического признака из триады когнитивных отклонений при синдроме Уильямса – пристальной фиксации на лицах, в данном случае на объекте ухаживания. Кроме того, такой способ

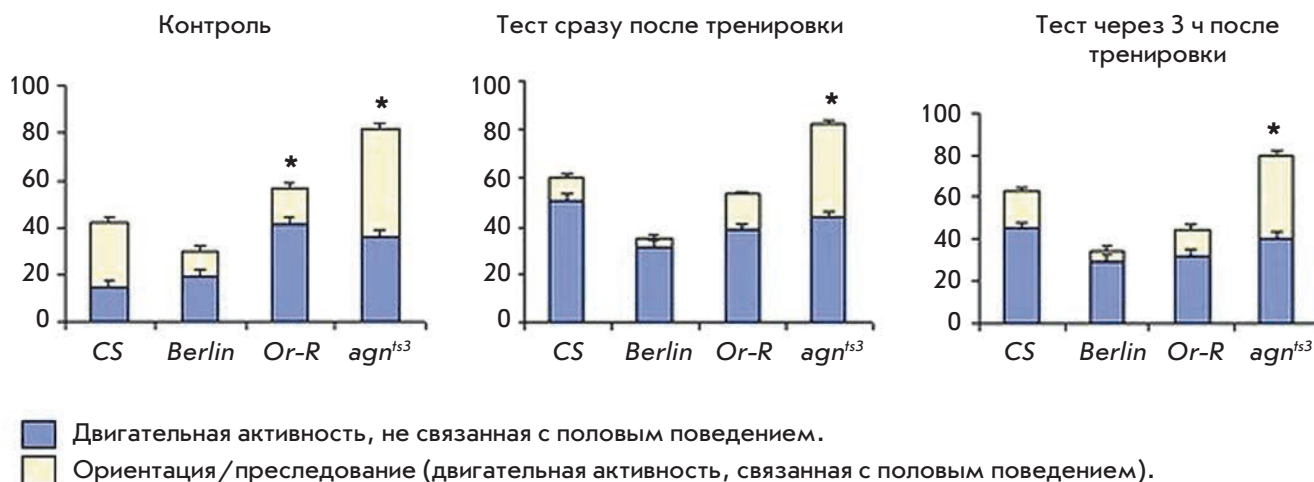


Рис. 6. Доли двигательной активности, связанные и не связанные с половым поведением сразу и через 3 ч после тренировок. * – отличие от CS, $\alpha \leq 0.05$, односторонний тест рандомизации

анализа позволяет учитывать и компонент обучения (индивидуального опыта). Напомним, что при синдроме Уильямса повышенная гиперсоциализация – фиксация взгляда на лицах незнакомцев – не служит установлению прочных контактов с ровесниками, товарищами по школе, обретению друзей. Иными словами, происходит постоянное обращение к одному и тому же стимулу – лицу, без правильной интерпретации ответных реакций.

Полученные нами результаты позволяют утверждать, что у самцов *Oregon-R* и *agn^{ts3}* выявлены когнитивные дефекты, обусловленные недостаточным подавлением ориентации/преследования (взаимодействия с партнером). Дефекты ориентации проявляются уже на стадии личинки, у личинок самцов при исследовании окружающей среды наблюдаются резкие нарушения траекторий движения в пространстве и временной динамики индекса активности и частоты побегов личинок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Линии дрозофилы, несущие разные варианты локуса *agnostic* с изменениями в регуляторных и структурных районах гена, кодирующего LIM-киназу 1 (LIMK1), использованы для моделирования делеционного синдрома Уильямса человека, при котором, как считается, гемизиготность по гену *limk1* приводит к нарушению моторных функций, когнитивным дефектам зрительно-пространственного ориентирования и повышенной фиксации взгляда на партнере [2].

Моделирование этого синдрома с привлечением мутантных и спонтанных вариантов локуса *agnostic* позволило выявить влияние изменения структуры гена *limk1* на локомоторные и когнитивные проявле-

ния. Среди них изменения параметров двигательной активности личинок и резкие нарушения траекторий движений при ориентации в пространстве у самцов *Oregon-R* и *agn^{ts3}*. У имаго этих же линий наблюдаются сильные дефекты обучения и памяти при условно-рефлекторном подавлении ухаживания за счет резко повышенной ориентации по отношению к партнеру и его преследованию.

Основываясь на результатах проведенного нами секвенирования гена *limk1* линий *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R*, *agn^{ts3}* (международная база генетических данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>, номера Dlimk1_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-CantonS JX987486 Dlimk1_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-agnosticts3 JX987487; Dlimk1_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-Oregon-R JX987488; Dlimk1_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-Berlin JX987489; Dlimk1_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-CantonS JX987486; Dlimk1_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-agnosticts3 JX987487; Dlimk1_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-Oregon-R JX987488; Dlimk1_allforGenbank.asn.1 dmel-limk1-Berlin JX987489), можно предполагать, что нарушение LIM- и PDZ-доменов у мух линии *Oregon-R* сопровождается изменениями локомоторного поведения и резкими когнитивными нарушениями. Также изменения в LIM- и PDZ-доменах LIMK1 снижают способность не только к зрительно-пространственному ориентированию, но и к обучению. Инсерция S-транспозона в 3'-нетранслируемую область гена *limk1* у мутанта *agn^{ts3}* также приводит к весьма любопытным эффектам. У мутанта *agn^{ts3}* выявлены дефекты в способности к ориентированию и значительные нарушения

в когнитивной сфере, что сопровождается сверхэкспрессией LIMK1 [8, 14].

Следует отметить, что результаты нашей работы создают предпосылки для разработки метода экспресс-оценки действия различных фармакологических агентов на локомоторные и когнитивные способности дрозофилы. Предложенные методики регистрации поведения личинок и имаго дрозофилы можно использовать для поиска лекарственных препаратов, корректирующих локомоторные и когнитивные нарушения. Большая скорость и сравнительно невысокая цена исследований на дрозофиле делают ее практически идеальным объектом для предварительного экспериментального тестирования тера-

певтических средств. Препараты, прошедшие отбор на такой системе, можно переводить на следующий этап тестирования с использованием более близких к человеку позвоночных животных.

Выявленная связь мутационного повреждения гена *agnostic* и нарушений в локомоторной и когнитивной сфере позволяет использовать данную модель для изучения геномных заболеваний и, в частности, синдрома Уильямса. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 12-04-01737-а), программами
Президиума РАН (№ 7 и 30).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bellugi U., Adolphs R., Cassady C., Chiles M. // *Neuroreport*. 1999. V. 10. № 8. P. 1653–1657.
- Järvinen-Pasley A., Bellugi U., Reilly J., Mills D.L., Galaburda A., Reiss A.L., Korenberg J.R. // *Dev. Psychopathol.* 2008. V. 20. № 1. P. 1–35.
- Pober B.R., Johnson M., Urban Z. // *J. Clin. Invest.* 2008. V. 118. № 5. P. 1606–1615.
- Савватеева Е.В., Камышев Н.Г., Розенблум С.Р. // *Докл. АН СССР*. 1978. Т. 240. С. 1443–1445.
- Savvateeva E.V., Kamyshev N.G. // *Pharmacol. Biochem. Behavior*. 1981. V. 14. P. 603–611.
- Савватеева-Попова Е.В., Переслени А.И., Шарагина Л.М., Токмачева Е.В., Медведева А.В., Камышев Н.Г., Попов А.В., Озерский П.В., Баричева Е.М., Карагодин Д. и др. // *Журн. эвол. биохим. физиол.* 2002. Т. 38. № 6. С. 557–577.
- Савватеева-Попова Е.В., Переслени А.И., Шарагина Л.М., Медведева А.В., Корочкина С.Е., Григорьева И.В., Дюжикова Н.А., Попов А.В., Баричева Е.М., Карагодин Д. и др. // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 6. С. 749–769.
- Медведева А.В., Молотков Д.А., Никитина Е.А., Попов А.А., Карагодин Д.А., Баричева Е.М., Савватеева-Попова Е.В. // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 6. С. 669–681.
- Брагина Ю.В., Молотова Н.Г., Камышева Е.А., Соболева С.А., Камышев Н.Г. // *Информ. вестник ВОГиС*. 2007. Т. 11. № 2. С. 436–444.
- Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V. // *Learn. Mem.* 1999. V. 6. № 1. P. 1–20.
- Камышев Н.Г., Илиади К.Г., Брагина Ю.В., Савватеева-Попова Е.В., Токмачева Е.В., Преа Т. // *Физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 1999. Т. 85. № 1. С. 84–92.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. New York: Freeman W.H., 1995. 887 p.
- Каминская А.Н., Никитина Е.А., Паялина Т.Л., Молотков Д.А., Захаров Г.А., Попов А.В., Савватеева-Попова Е.В. // *Экологическая генетика*. 2011. Т. 9. № 4. С. 3–14.
- Medvedeva A.V., Zhuravlev A.V., Savvateeva-Popova E.V. // *Horizons in Neuroscience Research*. 2010. V. 1. Ch. 4. P. 161–193.