



© Г. А. Захаров^{1,2},
А. В. Журавлев¹, Т. Л. Паялина^{1,2},
Н. Г. Камышев¹,
Е. В. Савватеева-Попова^{1,2}

¹ Институт Физиологии
им. И. П. Павлова, РАН

² Санкт Петербургский
Государственный Университет

✿ Дисбаланс кинуренинов, вызываемый мутациями кинуренинового пути обмена триптофана у дрозофилы, оказывает влияние на локомоторное поведение личинок. Наибольший эффект производит избыток кинуреновой кислоты у мутанта *cinnabar*, приводя к резкому падению общего уровня активности. Действие мутаций, по-видимому, связано с модулирующим влиянием кинуренинов на сигнальные каскады, управляемые ионотропными глутаматергическими и холинергическими рецепторами. Возрастная динамика экспрессии кодирующих их генов у мутантов свидетельствует о постепенном развитии последствий дисбаланса кинуренинов.

✿ **Ключевые слова:** дрозофила; кинуренины; кинуреновая кислота; 3-гидроксикинуренин; локомоторное поведение; экспрессия генов; NR1-субъединица NMDA-рецептора; никотиновые ацетилхолиновые рецепторы.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ КИНУРЕНИНОВОГО ПУТИ ОБМЕНА ТРИПТОФАНА У *D. MELANOGASTER* НА ЛОКОМОТОРНОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ И ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

ВВЕДЕНИЕ

Около 90 % триптофана у млекопитающих метаболизируется по кинурениновому пути обмена триптофана (КПОТ) (Gál, Sherman, 1978; 1980). Изменения в содержании метаболитов КПОТ (кинуренинов) сопровождают возникновение и развитие таких дегенеративных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона, (Лапин, 2004), а также острых состояний, возникающих в результате инсульта, энцефалита, менингита (Heyes et al., 1992), контузий (Blight et al., 1993) и травм спинного мозга (Blight et al., 1995).

Нейроактивное действие кинуренинов исследовано на таких объектах, как медоносная пчела и дрозофила (Savvateeva, 1991; Лопатина и др., 1997; Savvateeva-Popova et al., 2003; Лопатина и др., 2004), а также на многих видах позвоночных: лягушках, мышах, крысах, кроликах, кошках, собаках (Лапин, 2004).

Показано, что из метаболитов КПОТ нейротоксическим действием обладает 3-гидроксикинуренин (3-ГК). Избыточное содержание 3-ГК вызывает гиперпродукцию пероксида водорода (генератора свободных радикалов), индуцируя гибель нейронов по механизму апоптоза (Okuda et al., 1998). Пероксид водорода у дрозофилы также активирует ряд внутриклеточных сигнальных посредников, в том числе компоненты MAP-киназного каскада, регулирующего экспрессию генов (Ipoue et al., 2001). Накопление 3-ГК у дрозофилы вызывает нарушения среднесрочной памяти, начиная с 12 суток имагинального периода жизни (Savvateeva et al., 2000).

Кинуреновая кислота (КК) — единственный метаболит КПОТ, обладающий нейропротекторным действием (French et al., 1984; Beninger et al., 1986). КК является эндогенным конкурентным антагонистом ионотропных рецепторов глутамата (iGluR) с наибольшим сродством к глициновому сайту NR1-субъединицы NMDA-рецептора (NMDAR) (Kessler et al., 1989). Процессы, опосредованные NMDAR, рассматривают как молекулярно-физиологическую основу обучения и памяти (Cull-Candy et al., 2001). КК является также неконкурентным антагонистом $\alpha 7$ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) (Hilmas et al., 2001). Нейропротекторное действие КК на ЦНС опосредовано ингибированием процессов глутамат-зависимой эксайтотоксичности (Foster et al., 1984). Гиперстимуляция NMDAR вносит вклад в развитие болезней Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и других нейродегенеративных патологий (Беспалов, Звартау, 2000), в связи с чем предпринимаются попытки синтеза лекарственных средств на основе КК (Danysz, Parsons, 1998).

Поскольку КК и некоторые другие метаболиты КПОТ проявляют сродство к глутаматергическим и холинергическим рецепторам (Stone, 1991; Лапин, 2004), можно предположить, что действие 3-ГК также реализуется через них. Однако возможность связывания 3-ГК с iGluR и nAChR в качестве лиганда до настоящего времени не была исследована.

Поступила в редакцию 25.03.2011
Принята к публикации 15.06.2011

На данный момент молекулярные механизмы действия кинуренинов остаются не до конца изученными. Сложный характер их воздействия на физиологические и когнитивные процессы в ЦНС насекомых (Лопатина и др., 2004) обуславливает необходимость их дальнейшего изучения.

У *D. melanogaster* мутация *vermilion* (*v*, X: 9F11) инактивирует ключевой фермент КПОТ — триптофан 2,3-диоксигеназу, что влечет за собой полное отсутствие в организме кинуренинов и накопление триптофана (Linzen, 1974; Summers et al., 1982). У мутанта *cinnabar* (*cn*, 2R: 43E16) неактивен фермент кинуренин 3-гидроксилаза — соответственно, блокирована стадия превращения кинуренина в 3-ГК. У мутанта *cardinal* (*cd*, 3R: 94A1 94E2) инактивирован фермент распада 3-ГК феноксазидсинтетазы. Для *cn* показано двукратное увеличение содержания КК (Ferre, 1983), для *cd* — 2,9-кратное увеличение содержания 3-ГК (Howells et al., 1977) в тканях голов имаго. Накопление у мутантов метаболитов КПОТ имитирует их пролонгированное введение, что удобно для изучения механизмов физиологической активности кинуренинов.

Многие нейродегенеративные заболевания сопровождаются нарушениями локомоторного поведения. Поэтому одним из способов разработки стратегий терапевтического лечения этих заболеваний является поиск фармакологических агентов, корректирующих нарушения локомоции у животных с простой нервной системой (Braungart et al., 2004). Большая скорость и сравнительно невысокая цена исследований на дрозофиле делают ее практически идеальным объектом для предварительного экспериментального тестирования терапевтических средств. Автоматизированный анализ локомоторного поведения мутантов является удобным инструментом исследования воздействия кинуренинов на моторные и интегративные функции ЦНС. У взрослых насекомых-мутантов КПОТ этот анализ имеет ограничения, связанные с нарушениями у мутантов пространственного ориентирования вследствие зрительных дефектов из-за отсутствия экранирующих пигментов глаз — оммохромов. Эти ограничения отсутствуют, если анализ локомоторного поведения проводить на стадии личинок 3-го возраста, у которых из зрительных органов присутствуют только глазки, способные определять лишь общий уровень освещенности (Mizunami, 1994).

Поскольку КК взаимодействует с NMDAR и nAChR, молекулярные механизмы действия кинуренинов на процессы в ЦНС могут быть связаны в том числе и с регуляцией экспрессии генов субъединиц этих рецепторов. Ген *dNR1* (3R:83 AB), гомолог гена *nr1* млекопитающих, экспрессируется в голове взрослых дрозофил, регулируя процессы синаптической пластичности (Ultsch et al., 1993), тем самым участвуя в процессах формирования среднесрочной (Lin, 2005) и долговременной (Wu et al., 2007) памяти. Также весомый вклад в формирование памяти у дрозофилы вносят nAChR. Гомологами $\alpha 7$

и $\alpha 3$ nAChR человека у *D. melanogaster* являются *da7* (X:18C2 — 18C3) (Grauso et al., 2002) и *da3* (X: 7E) (Schulz et al., 1998).

Еще одним геном, тесно связанным с глутаматергическим и холинергическим каскадом, является *Lim* киназа 1 (*LIMK1*) — ключевой фермент ремоделирования актина. Активация *LIMK1* у млекопитающих опосредована iGluR (Yang et al., 2004). Уровень *LIMK1* в мозге *D. melanogaster* четко коррелирует с содержанием кинуренинов (Лопатина и др., 2007). Нарушение гена *dLimk1* в локусе *agnostic* (X: 11AB) приводит к дефектам процессов памяти и обучения у 5-суточных имаго (Савватеева-Попова и др., 2002; Медведева и др., 2008).

Изучение характера воздействия кинуренинов на экспрессию вышеуказанных генов должно пролить свет на механизмы регуляции моторных и когнитивных функций. В настоящей работе показано, что наиболее сильное влияние на локомоторное поведение оказывает избыток КК, приводя к резкому падению общего уровня локомоторной активности и дефектам пространственного ориентирования. С помощью метода ПЦР в режиме реального времени показано увеличение уровня экспрессии *dNR1* и *da7* у 13-суточных мутантов *cn* (избыток КК) сравнительно с 5-суточными. У 13-суточных мутантов *cd* (избыток 3-ГК) сравнительно с 5-суточными возрастает уровень экспрессии *da7*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии дрозофилы

В работе использовали следующие линии *D. melanogaster*: линия дикого типа *Canton-S* (*CS*) и мутанты КПОТ — *vermilion* (аллель *v1*), мутация гена триптофан-2,3-диоксигеназы, приводящая к отсутствию кинуренинов и накоплению триптофана (Linzen, 1974); *cinnabar* (аллель *cn1*), мутация структурного гена кинуренин-3-гидроксилазы, блокирующая превращение кинуренина в 3-ГК (Ghosh, Forrest, 1967; Warren et al., 1996) и приводящая к избытку КК (Ferri, 1983); *cardinal* (аллель *cd1*), мутация, приводящая к уменьшению активности феноксазидсинтетазы и 2,9-кратному накоплению 3-ГК по сравнению с диким типом (Howells et al., 1977). В результате 30 циклов скрещивания с линией *CS* все линии были приведены к единому генетическому фону.

Мух выращивали на стандартной среде (агар, изюм, дрожжи, сахар) в условиях постоянного цикла день/ночь (12 ч./12 ч.) при $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Регистрация локомоторного поведения

Для регистрации локомоторного поведения личинок дрозофилы использовали оригинальный автоматизированный метод, разработанный Г. А. Захаровым, Н. Г. Камышевым и Т. Л. Паялиной.

Локомоторное поведение личинки регистрировали в камерах, основу которых составляла стеклянная плас-



Рис. 1. 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

тина, покрытая влажной черной хлопчатобумажной тканью. Наложенная сверху пластиковая пластина с вырезанными отверстиями образовывала 8 отдельных лунок для каждой личинки. Диаметр лунки составлял 20 мм, а высота — 1,4 мм, таким образом, личинка могла двигаться только в одной плоскости. После помещения личинок в лунки их закрывали предметными стеклами. Точно сверху над лунками располагали вебкамеру Logitech QuickCam, соединенную через USB с компьютером. Эксперимент длился в течение 1 часа. В процессе регистрации в камерах поддерживали температуру 24 °C.

Для регистрации положения личинок использовали компьютерную программу, разработанную Г. А. Захаровым и Н. Г. Камышевым. Эта программа в реальном времени определяет координаты каждой личинки и записывает траекторию их движения. Для каждой камеры выбирали значение порога, равное 60 % разности между максимальной и средней яркостью всей совокупности пикселей. Все пиксели, яркость которых была больше порогового значения, считали принадлежащими личинке. Их координаты усредняли и принимали в качестве координат личинки. Затем при помощи разработанной Г. А. Захаровым компьютерной программы анализировали периоды покоя и движения. Общую запись разбивали на кванты, равные 1 с, и вычисляли среднюю скорость движения личинки на каждом кванте. Если полученное значение было меньше порогового (0,2 мм/с), то считали, что личинка в течение данного кванта времени находилась в покое, в противном случае считали, что личинка двигалась. Соседние кванты с одинаковым характером движения объединяли, в результате чего формировались периоды движения и покоя.

Для изучения способностей личинок к зрительно-пространственному ориентированию проводили анализ траекторий движения (треков). Это позволяет охарактеризовать способность животного ориентироваться в окружающей среде при реализации исследовательской активности. Все проанализированные треки в зависимости от формы были визуально разделены на 6 классов. Образцы треков каждого класса представлены на рис. 1. Для каждой линии строили гистограмму распределения треков по классам.

Для каждой линии записывали траектории движения не менее 25 личинок. Для определения достоверности различий

между экспериментальными группами проводили дисперсионный анализ по Краскелу—Уоллису с последующим множественным сравнением средних рангов для всех экспериментальных групп. Для определения достоверности различий в распределении треков личинок использовали двусторонний *t*-критерий для долей. Достоверность всех различий рассчитана при 95-процентном уровне значимости.

Анализ сравнительного уровня экспрессии генов

РНК из голов мух (5- и 13-суточных самцов) выделяли с помощью набора TRI REAGENT™ (Sigma). После обработки ДНКазой I (Sigma) проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора случайных нонанмеров (Sigma), ингибитора РНКаз (Calbiochem) и обратной транскриптазы AMV Reverse Transcriptase (Fermentas). Реакцию ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием 2х смеси для ПЦР Universal PCR Master Mix (TaqMan) и смеси TaqMan Gene Expression Assays флуоресцентных ДНК-зондов и праймеров к генам *D. melanogaster* *dNr1*, *rp49*, *da7*, *da3* и *dLimk1* AB StepOnePlus (Applied Biosystems). Для определения относительного содержания РНК-матрицы в пробе использовали метод оценки значения $\Delta\Delta CT$, где CT — цикл амплификации на логарифмической стадии, при котором интенсивность флуоресцентного сигнала достигает пороговой величины, ΔCT — разность между CT для исследуемого продукта и эндогенного контроля, $\Delta\Delta CT$ — разность ΔCT для исследуемой и контрольной линий. В качестве эндогенного контроля использовали кДНК рибосомного белка *gr49*, в качестве контрольной линии — линию *CS*. Оценку достоверности различий осуществляли с использованием теста рандомизации (Sokal, Rohlf, 1995).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение параметров локомоторной активности

Интегральные параметры локомоторной активности личинок линий *CS*, *v*, *cn* и *cd* представлены на рис. 2.

Основным параметром, отражающим локомоторную активность личинок, является индекс активности, т. е. доля времени, занятого движением. Данный параметр достоверно снижен по сравнению с *CS* только у мутанта *cn*.

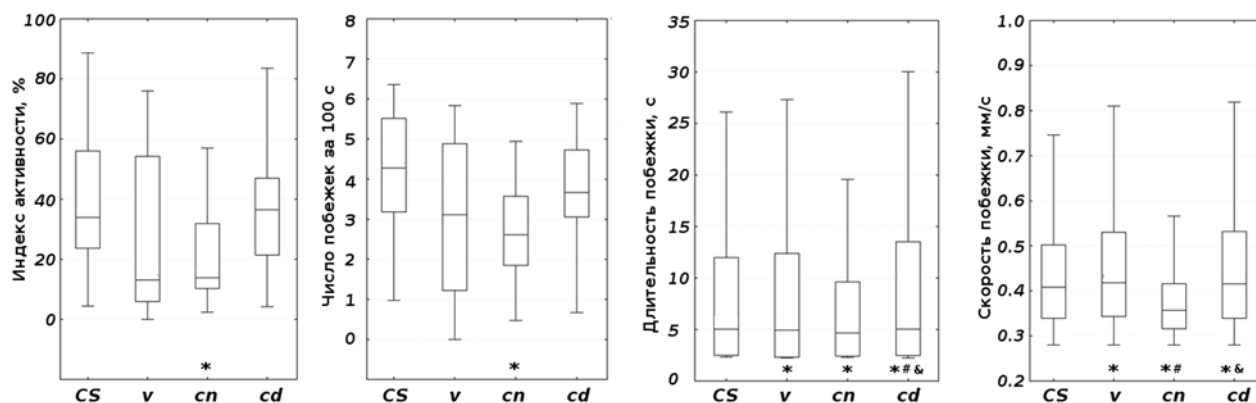


Рис. 2. Суммарные параметры локомоторной активности личинок *CS*, *v*, *cn* и *cd*. Данные представлены в виде ящика с усами. Горизонтальная линия внутри ящика — медиана, ящик — 25 % и 75 % квартили, усы — минимум и максимум. Достоверность различий: * — отличия от линии *CS*, # — отличие от *v*, & — отличие *cd* от *cn* (критерий Краскела–Уоллиса, множественное сравнение средних рангов, $P \leq 0,05$)

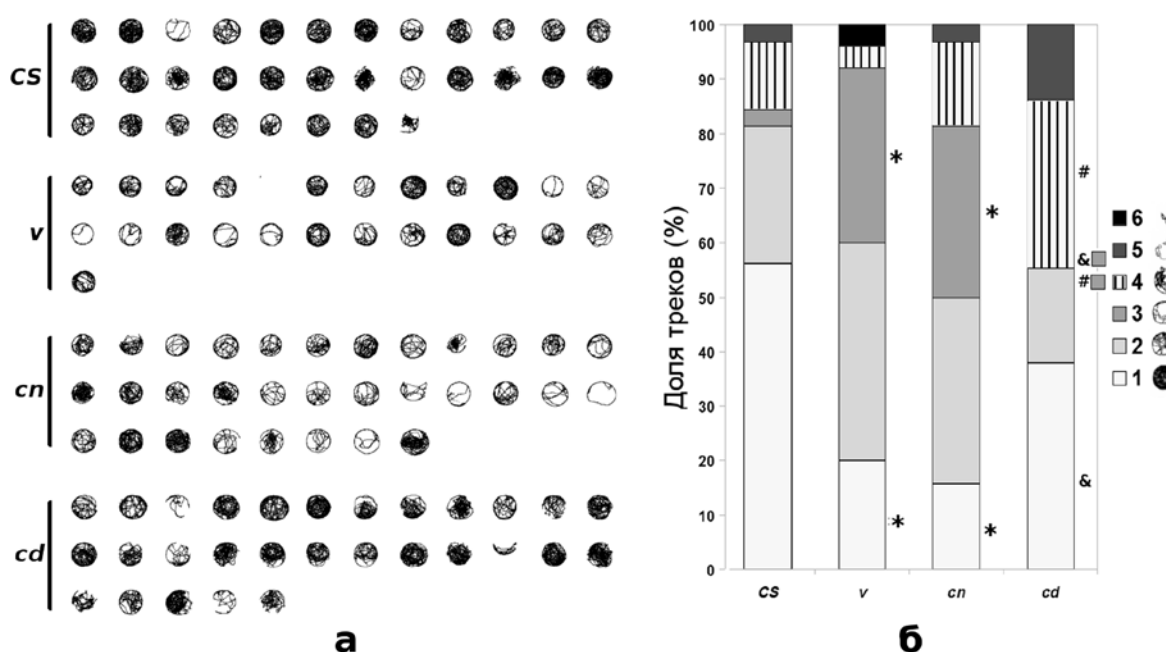


Рис. 3. а — треки движения личинок *CS*, *v*, *cn* и *cd*. б — сравнение распределений треков по классам. Достоверность различий: * — отличия от линии *CS*, # — отличие от *v*, & — отличие *cd* от *cn* (двусторонний t-критерий для долей, $P \leq 0,05$)

Изменение индекса активности может происходить за счет изменения двух параметров — частоты совершения побежки и ее длительности. Межлинейные различия по частоте побежки аналогичны таковым для индекса активности. У линии *cn* частота побежек ниже, чем у *CS*, что, по-видимому, и вносит основной вклад в снижение индекса активности. Для длительностей побежки показаны некоторые достоверные, но очень небольшие межлинейные различия.

Последним из рассматриваемых параметров является скорость побежки. У *v* и *cd* она несколько выше, чем у *CS*. Скорость побежки у *cn* заметно снижена по сравнению со всеми другими линиями.

Способность к зрительно-пространственному ориентированию демонстрирует ярко выраженные отличия. Записанные треки и гистограмма их распределения по классам представлена на рис. 3.

У личинок *v* и *cn* наблюдается резкое снижение (в 2,5 и 2,7 раза соответственно) числа треков класса 1 (полностью заполняющих экспериментальную камеру) и увеличение числа треков класса 3 (с существенными дефектами заполнения) по сравнению с *CS*. Подобные изменения могут говорить о нарушении способности к пространственному ориентированию. Мутанты *cd*, отличаясь от *cn* и *v* по этим же классам треков, не имеют достоверных отличий от дикого типа.

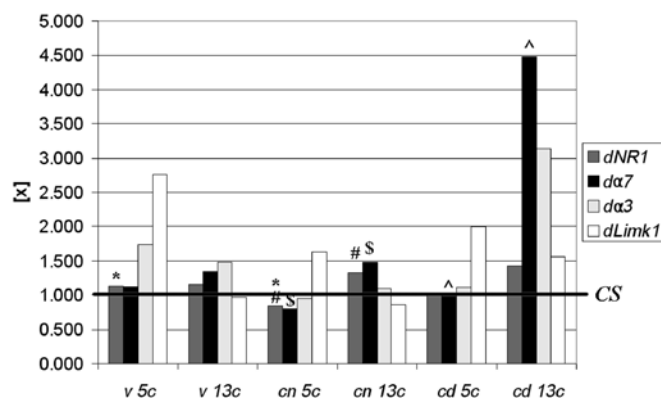


Рис. 4. Сравнительный уровень экспрессии генов, кодирующих субъединицу *dNR1* ионотропного глутаматного рецептора iGluR, субъединицы *da7* и *da3* никотинового ацетилхолинового рецептора nAChR и LIM-киназу 1 (*dLimk1*). [x] — уровень экспрессии, нормированный относительно уровня для CS. 5c — 5-суточные особи. 13c — 13-суточные особи. Знак ставится над двумя величинами, достоверно отличающимися друг от друга: * — отличие *v* от *cn* в возрасте 5 суток; # — отличие экспрессии *dNR1* у *cn* в возрасте 13 суток от *cn* 5 суток; \$ — отличие экспрессии *da7* у *cn* в возрасте 13 суток от *cn* в возрасте 5 суток, ^ — отличие экспрессии *da7* у *cd* в возрасте 13 суток от *cd* в возрасте 5 суток (двусторонний тест случайности, $P \leq 0,05$)

Таким образом, личинки линии *cn* демонстрируют существенное снижение индекса активности, частоты и скорости побегов, а также ограниченность перемещений в пространстве. Все это можно охарактеризовать как снижение общего уровня активности (что особенно хорошо видно по снижению скорости побегов), и нарушение способности к пространственному ориентированию.

Анализ уровня экспрессии генов глутаматергической (*dNR1*), холинергической (*da7*, *da3*) систем нейротрансмиссии и сигнального каскада ремоделирования актина (*dLimk1*)

Одним из возможных молекулярных механизмов снижения уровня двигательной активности является ингибирующее действие, оказываемое КК в повышенной концентрации на рецепторы iGluR и nAChR. Торможение связанных с этими рецепторами сигнальных путей может оказывать немедленное ингибирующее действие на поведенческую активность и отсроченное во времени воздействие на экспрессию рецепторных генов. Поскольку уровень кинуренинов в тканях голов *D. melanogaster* достигает максимума после вылупления имаго, нами был проведен анализ экспрессии генов, кодирующих субъединицу *dNR1* ионотропного глутаматного рецептора iGluR, субъединицы *da7* и *da3* никотинового ацетилхолинового рецептора nAChR и LIM-киназу 1 *dLimk1*, у взрослых 5- и 13-суточных самцов (рис. 4). Уровень экспрессии [x] у мутантов был нормирован по отношению к таковому у CS (принят за 1).

У *v* (отсутствие продуктов КПОТ) в возрасте 5 суток наблюдается более высокий уровень экспрессии *dNR1* сравнительно с *cn* (избыток КК). Других отличий в уровне экспрессии генов в возрасте 5 суток не наблюдается.

Показано также увеличение уровня экспрессии *dNR1* и *da7* у 13-суточных *cn* сравнительно с 5-суточными *cn*. У 13-суточных *cd* (избыток 3-ГК) сравнительно с 5-суточными возрастает уровень экспрессии *da7*. Таким образом, основные различия в уровне экспрессии проявляются у 13-суточных мутантов по сравнению с 5-суточными. Это свидетельствует о том, что эффект метаболитов КПОТ проявляется спустя значительное время после достижения достаточных концентраций метаболитов в мозге.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках данного исследования было показано, что накопление продуктов КПОТ у мутантов дрозофилы оказывает влияние на локомоторное поведение личинок и отсроченное воздействие на уровень экспрессии генов *dNR1* и *da7* в тканях голов имаго. По-видимому, существуют два основных молекулярных механизма действия кинуренинов на процессы в ЦНС. Первый связан с их влиянием на NMDA-рецепторы, а также *da7* и/или рецепторы ГАМК и стрихнин-чувствительные глициновые рецепторы (Mok et al., 2009), которые непосредственно отвечают за уровень возбудимости ЦНС и интенсивность синаптической нейротрансмиссии. Второй механизм представляет собой регуляцию экспрессии генов, являющихся мишенями активируемых метаболитами КПОТ внутриклеточных сигнальных каскадов.

Накопление 3-ГК у мутанта *cd* не оказывает существенного действия на локомоторное поведение (рис. 2): длительность и скорость побежки у *cd* выше, чем у CS, однако численное различие между ними мало (порядка 3 %). Распределение треков у *cd* не имеет достоверных отличий от CS (рис. 3). Отсутствие выраженного эффекта можно объяснить, принимая во внимание механизм действия 3-ГК. Согласно полученным ранее расчетным данным, 3-ГК не способен специфически взаимодействовать с NR1-субъединицей NMDA-рецептора (Захаров, Щеголев, 2004). Поэтому основной механизм его действия, по-видимому, связан с генерацией окислительных радикалов и оксидативным стрессом. Однако для достижения заметного эффекта требуются достаточно высокие концентрации 3-ГК в тканях мозга. У личинок 3-го возраста, так же как и у 5-суточных имаго, уровень 3-ГК сравнительно невелик. Токсическое действие 3-ГК у линии *cd* развивается лишь начиная с 12 суток имагинального периода (Savateeva et al., 2000).

Накопление КК у мутанта *cn* приводит к наиболее выраженным дефектам локомоторного поведения по сравнению с остальными мутантами КПОТ. Это проявляется в снижении средней скорости движения, снижении общего уровня локомоторной активности, а также в дефек-

тах пространственного ориентирования. Подобный эффект может быть связан с ингибирующим действием КК на рецепторные субъединицы *dNR1* *iGluR* и *da7* *nAChR*.

Отсутствие кинуренинов у мутанта *v* вызывает отличия в длительности и скорости побежки по сравнению с *CS*, однако численные различия невелики. Распределение треков указывает на сходные у *v* и *cn* дефекты пространственного ориентирования. Таким образом, нарушения локомоторного поведения у *v* напоминают таковые у *cn*, но выражены в меньшей степени. По-видимому, это связано с тем фактом, что нейрофизиологический эффект кинуренинов зависит не от наличия/отсутствия конкретного метаболита, а от баланса нейротоксических и нейропротективных метаболитов (Wu et al., 2000). Ферментативный блок у мутанта *v* приводит к полному отсутствию кинуренинов, в том числе и нейротоксических, поэтому у *v* можно ожидать отсутствие дегенеративной патологии и близкий к дикому типу характер локомоторного поведения. Отмеченные дефекты могут быть связаны с вызванным отсутствием кинуренинов снижением общего локомоторного уровня активности, не обнаруженным при данном размере выборки (медиана индекса активности *v* лежит ниже, чем у *cn*, хотя различие между ними недостоверно). Другой причиной может быть неспецифический стресс, вызванный 6-кратным избытком триптофана в нервной системе (Ryall, Howells, 1974).

Хроническое воздействие КК, эндогенного антагониста рецепторных субъединиц *dNR1* и *da7*, может вызывать компенсаторное усиление активности генов для этих рецепторов по механизму обратной связи. Уровень экспрессии *dNR1* в головах 5-суточных *cn*, однако, снижен сравнительно с 5-суточными *v*. В то же время у взрослых самцов *cn* на временном интервале 5–13 суток наблюдается увеличение экспрессии генов *dNR1* и *da7*. Следовательно, налицо положительное влияние избытка КК у *cn* (сравнительно с *CS*) на транскрипцию данных генов, развивающееся лишь с течением времени после достижения КК стабильно высокой концентрации в тканях головы в первый день после вылета имаго (Ferri, 1983).

Увеличение экспрессии *da7* у 13-суточных *cd* может быть обусловлено компенсаторным повышением активности этих рецепторов в мозге в ответ на пластические изменения в ЦНС. У 12–13-суточных *cd* объем каликов грибовидных тел, ответственных за процессы обучения и памяти у имаго (Krashes, Waddell, 2008; Krashes et al., 2007), снижен сравнительно с 5-суточными *cd*, а также 12–13-суточными *CS* и *cn* (Savvateeva et al., 2000). При этом *a* бунгаротоксин-чувствительные *nAChR* (к числу которых относятся *da7* и *da3*) у взрослых дрозофил в большом количестве представлены именно в каликсах грибовидных тел имаго дрозофилы (Su, O'Dowd, 2003).

Следует напомнить, что у дрозофилы среднесрочную память регистрируют в возрасте 5 суток через 3 часа пос-

ле тренировки, а долговременную — через 8 дней, т. е. в возрасте 13 суток, после массовой тренировки в возрасте 5 суток. Именно этим и диктуется выбор данных возрастов для оценки уровня экспрессии генов.

Увеличение транскрипционной активности генов *dNR1* и *da7*, возможно, является одним из факторов, обуславливающих изменение поведения у *cn* и *cd*. Оба эти мутанта в возрасте 5 суток не отличаются по параметрам обучения в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания от *CS* (Savvateeva et al., 2000). Однако только у мутанта *cd* начиная с 13 суток проявляется прогрессивная потеря среднесрочной памяти, заканчиваясь полной потерей памяти в возрасте 29 суток (Savvateeva et al., 2000).

Интересно, что, в отличие от среднесрочной, долговременная память в той или иной степени нарушается у всех вышеуказанных мутантов КПОТ (Никитина Е. А., готовится к печати). При этом лишь у *cn* экспрессия *dNR1* в мозге усиливается от момента тренировки в возрасте 5 суток до момента ее тестирования в возрасте 13 суток, что, возможно, и приводит к ее дефектности у 13-суточных имаго. Таким образом, сходные изменения поведенческой и когнитивной активности у разных кинурениновых мутантов могут быть обусловлены различными молекулярными механизмами, что объясняет сложный, множественный характер влияния кинуренинов на поведенческие процессы (Лопатина и др., 2004).

Что касается уровня экспрессии генов *da3* и *dLimk1*, у мутантов КПОТ не наблюдается достоверных различий на уровне транскрипции. Однако не следует забывать, что активность генов рецепторных субъединиц и *dLimk1* может регулироваться также и на уровне трансляции независимо от активации/репрессии транскрипции или параллельно с ней. Возможно локальное повышение содержания белков-рецепторов и сигнальных посредников в определенных структурах мозга. Методами иммуногистохимии было показано, в частности, что содержание белка *NR1* у 5-суточных *cn* возрастает, а у 5-суточных *cd* снижается в центральном комплексе мозга (Лопатина и др., 2007). Таким образом, зависящая от КК активация трансляции субъединицы *NR1*, по-видимому, опережает во времени активацию транскрипции ее гена.

На настоящий момент не известно, в каких из отделов мозга максимальны концентрации тех или иных продуктов КПОТ и где именно они способны оказывать наибольшее физиологическое воздействие. Изучение распределения продуктов КПОТ, а также специфических РНК-продуктов в мозге дрозофилы на разных стадиях жизненного цикла остается задачей будущих исследований. Более точно судить о характере воздействия метаболитов КПОТ на активность генов *iGluR*, *nAChR* и *Limk1* позволило бы проведение исследований с инъекцией мухам дикого типа экзогенных кинуренинов в различных концентрациях, с оценкой влияния их на уровень экспрессии рецепторных генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных результатов можно заключить, что дисбаланс кинуренинов оказывает непосредственное влияние на локомоторное поведение. По-видимому, это связано с модулирующим влиянием метаболитов КПОТ на сигнальные каскады, управляемые рецепторами iGluR и nAChR. Наиболее сильное влияние на локомоторное поведение демонстрирует избыток КК, приводя к резкому падению общего уровня локомоторной активности и дефектам пространственного ориентирования.

Вместе с тем влияние кинуренинов на экспрессию генов носит отложенный характер и развивается в течение длительного времени после достижения максимального уровня их содержания у имаго. Изменение экспрессии отдельных генов отчетливо проявляется к 13 суткам. Так, показано увеличение уровня экспрессии *dNR1* и *da7* у 13-суточных *cn* (избыток КК) сравнительно с 5-суточными. У 13-суточных *cd* (избыток 3-ГК) сравнительно с 5-суточными возрастает уровень экспрессии *da7*. Возможно, эти изменения вносят вклад в развитие когнитивных нарушений, которые у взрослых мутантов КПОТ проявляются примерно в этот же период жизни.

Создание автоматизированного метода регистрации локомоторного поведения личинок *D. melanogaster* открывает возможность для разработки метода экспрессии действия различных фармакологических агентов на поведенческую активность дрозофилы. Данный метод можно использовать для поиска лекарственных препаратов, корректирующих нарушения локомоторного поведения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантами РФФИ, подпрограммой «Динамика генофондов» программы Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов», Госконтрактом с Минобрнауки № П316 и федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

Литература

1. Beninger R. J., Jhamandas K., Boegman R. J. et al., 1986. Kynurenic acid-induced protection of neurochemical and behavioural deficits produced by quinolinic acid injections into the *nucleus basalis* of rats // *Neurosci. Lett.* Vol. 68. N 3. P.317–321.
2. Blight A. R., Cohen T. I., Saito K. et al., 1995. Quinolinic acid accumulation and functional deficits following experimental spinal cord injury // *Brain*. Vol. 118. P.735–752.
3. Blight A. R., Saito K., Heyes M. P., 1993. Increased levels of the excitotoxin quinolinic acid in spinal cord following contusion injury // *Brain Res.* Vol. 632. N 1–2. P.314–316.
4. Braungart E., Gerlach M., Riederer P. et al., 2004. *Caenorhabditis elegans* MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings // *Neuro-degenerative Diseases*. Vol. 1. N 4. P. 175–183.
5. Cull-Candy S., Brickley S., Farrant M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease // *Curr. Opin. Neurobiol.* Vol. 11. N 3. P.327–335.
6. Danysz W., Parsons C. G., 1998. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications // *Pharmacol. Rev.* Vol. 50. N 4. P.597–664.
7. Ferri J., 1983. Accumulation of kynurenic acid in the *cinnabar* mutant of *D. melanogaster* as revealed by thin-layer chromatography // *Insect Biochemistry*. Vol. 13. P.289–294.
8. Foster A. C., Vezzani A., French E. D. et al., 1984. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid // *Neurosci. Lett.* Vol. 48. N 3. P.273–278.
9. French E. D., Foster A. C., Vezzani A. et al., 1984. Quinolinic acid and kynurenate, two endogenous tryptophan metabolites with potential links to epileptic disorders // *Clin Neuropharmacology*. Vol. 7. P.456–457.
10. Gál E. M., Sherman A. D., 1978. Synthesis and metabolism of L-kynurenine in rat brain // *J. Neurochem.* Vol. 30. N 3. P.607–613.
11. Gál E. M., Sherman A. D., 1980. L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain // *Neurochem. Res.* Vol. 5. N 3. P.223–239.
12. Ghosh D., Forrest H. S., 1967. Enzymatic studies on the hydroxylation of kynurenine in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. Vol. 55. N 3. P.423–431.
13. Grauso M., Reenan R. A., Culetto E. et al., 2002. Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, *Dalpha5*, *Dalpha6* and *Dalpha7*, in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing // *Genetics*. Vol. 160. N 4. P.1519–1533.
14. Heyes M. P., Saito K., Markey S. P., 1992. Human macrophages convert L-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid // *Biochem. J.* Vol. 283. P.633–635.
15. Hilmas C., Pereira E. F., Alkondon M. et al., 2001. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications // *J. Neurosci.* Vol. 21. N 19. P.7463–7473.
16. Howells A. J., Summers K. M., Ryall R. L., 1977. Developmental patterns of 3-hydroxykynurenine accumulation in *white* and various other eye color mutants of *Drosophila melanogaster* // *Biochem. Genet.* Vol. 15. N 11/12. P.1049–1059.

17. Inoue T., Takeshita K., Fukushima K., 2001. Effects of KE-758, an active metabolite of the new anti-rheumatic drug KE-298, D-penicillamine, bucillamine and auranofin on the proliferation of murine lymphocytes, and the production of nitric oxide by murine macrophages // *Int. Immunopharmacol.* Vol. 1. N 5. P. 833–842.
18. Kessler M., Terramani T., Lynch G. et al., 1989. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists // *J. Neurochem.* Vol. 52. N 4. P. 1319–1328.
19. Krashes M. J., Waddell S., 2008. Rapid consolidation to a *radish* and protein synthesis-dependent long-term memory after single-session appetitive olfactory conditioning in *Drosophila* // *J. Neurosci.* Vol. 28. N 12. P. 3103–3113.
20. Krashes M. J., Keene A. C., Leung B. et al., 2007. Sequential use of mushroom body neuron subsets during *Drosophila* odor memory processing // *Neuron.* Vol. 53. N 1. P. 103–115.
21. Lin W., 2005. NMDA receptors are required in memory formation in *Drosophila* mushroom body // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 334. N 3. P. 779–786.
22. Linzen B., 1974. Tryptophan — ommochrome pathway in insects // *Advances in Insect Physiology.* Vol. 10. P. 117–246.
23. Mizunami M., 1994. Information processing in the insect ocellar system: comparative approaches to the evolution of visual processing and neural circuits // *Advances in Insect Physiology.* Vol. 25. P. 151–265.
24. Mok M. H. S., Fricker A., Weil A. et al., 2009. Electrophysiological characterization of the actions of kynurenic acid at ligand-gated ion channels // *Neuropharmacology.* Vol. 57. N 3. P. 242–249.
25. Okuda S., Nishiyama N., Saito H. et al., 1998. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity // *J. Neurochem.* Vol. 70. N 1. P. 299–307.
26. Ryall R. L., Howells A. J., 1974. Ommochrome biosynthetic pathway of *Drosophila melanogaster*: Variations in the levels of enzyme activities and intermediates during adult development // *Insect Biochem.* Vol. 6. P. 135–142.
27. Savvateeva E., 1991. Kynurenines in the regulation of behavior in insects // *Adv. Exp. Med. Biol.* Vol. 294. P. 319–328.
28. Savvateeva E. V., Popov A. V., Kamyshev N. G. et al., 2000. Age-dependent memory loss, synaptic pathology and altered brain plasticity in the *Drosophila* mutant *cardinal* accumulating 3-hydroxykynurenine // *Journal of Neural Transmission.* Vol. 107. N 5. P. 581–601.
29. Savvateeva-Popova E. V., Popov A. V., Heinemann T. et al., 2003. *Drosophila* mutants of the kynurenine pathway as a model for ageing studies // *Adv. Exp. Med. Biol.* Vol. 527. P. 713–722.
30. Schulz R., Sawruk E., Mülhardt C. et al., 1998. D alpha3, a new functional alpha subunit of nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila* // *J. Neurochem.* Vol. 71. N 2. P. 853–862.
31. Sokal R. R., Rohlf F. J., 1995. *Biometry*, 3rd ed. — New York: H. Freeman & Co.
32. Stone T. W., 1991. Kynurenine and glycine enhance neuronal sensitivity to N-methyl-D-aspartate // *Life Sci.* Vol. 48. N 8. P. 765–772.
33. Su H., O'Dowd D. K., 2003. Fast synaptic currents in *Drosophila* mushroom body Kenyon cells are mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors // *J. Neurosci.* Vol. 23. N 27. P. 9246–9253.
34. Summers K. M., Howells A. J., Pyliotis N. A., 1982. Biology of eye pigmentation in insects // *Advances in Insect Physiology.* Vol. 16. P. 119–167.
35. Ultsch A., Schuster C. M., Laube B. et al., 1993. Glutamate receptors of *Drosophila melanogaster*. Primary structure of a putative NMDA receptor protein expressed in the head of the adult fly // *FEBS Lett.* Vol. 324. N 2. P. 171–177.
36. Warren W. D., Palmer S., Howells A. J., 1996. Molecular characterization of the *cinnabar* region of *D. melanogaster*: identification of the *cinnabar* transcription unit // *Genetica.* Vol. 98. P. 249–262.
37. Wu H., Guidetti P., Goodman J. et al., 2000. Kynurenergic manipulations influence excitatory synaptic function and excitotoxic vulnerability in the rat hippocampus *in vivo* // *Neuroscience.* Vol. 97. N 2. P. 243–251.
38. Wu C., Xia S., Fu T. et al., 2007. Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body // *Nat. Neurosci.* Vol. 10. N 12. P. 1578–1586.
39. Yang E. J., Yoon J., Min D. S. et al., 2004. LIM kinase 1 activates cAMP-responsive element-binding protein during the neuronal differentiation of immortalized hippocampal progenitor cells // *J. Biol. Chem.* Vol. 279. N 10. P. 8903–8910.
40. Беспалов А. Ю., Звартау Э. Э., 2000. Нейропсихофармакология антагонистов NMDA-рецепторов. СПб.: Невский диалект, 297 с.
41. Захаров Г. А., Щеголев Б. Ф., 2004. Агонисты и антагонисты NMDA-рецептора. Неэмпирические квантовохимические расчеты // *Материалы семинаров политехнического симпозиума «Молодые ученые промышленности северо-западного региона»*. С. 84.
42. Лапин И. П., 2004. Стресс. Тревога. Депрессия. Алкоголизм. Эпилепсия (Нейрокинурениновые механизмы и новые подходы к лечению). М.: ДЕАН, 220 С.
43. Лопатина Н. Г., Рыжова И. В., Чеснокова Е. Г. и др., 1997. Рецепторы L-глутамата в центральной нервной системе медоносной пчелы *Apis mellifera* и

- их роль в процессе формирования условного рефлекса и следов памяти // Ж. эвол. биох. и физиол. Т. 33. № 4/5. С. 506–514.
44. Лопатина Н. Г., Чеснокова Е. Г., Смирнов В. Б. и др., 2004. Кинурениновый путь обмена триптофана и его значение в нейрофизиологии насекомых // Энтотомологическое обозрение. Т. 83. № 1. С. 499–518.
45. Лопатина Н. Г., Зачепило Т. Г., Чеснокова Е. Г. и др., 2007. Мутации структурных генов ферментов метаболизма триптофана по кинурениновому пути в модуляции звеньев сигнального каскада — рецепторы глутамата — актин цитоскелета // Генетика. Т. 43. № 10. С. 1396–1401.
46. Медведева А. В., Молотков Д. А., Никитина Е. А. и др., 2008. Системная регуляция генетических и цитогенетических процессов сигнальным каскадом ремоделирования актина: локус *agnostic* дрозофилы // Генетика. Т. 44. С. 669–681.
47. Савватеева-Попова Е., Переслени А. И., Шарагина Л. М. и др., 2002. Комплексное изучение мутантов *Drosophila melanogaster* по локусу *agnostic*: модель для сопряжения нарушений архитектуры генома и когнитивных функций // Журн. эвол. биохим. физиол. Т. 38. № 6. С. 557–577.

THE INFLUENCE OF *D. MELANOGASTER* MUTATIONS OF THE KYNURENINE PATHWAY OF TRYPTOPHAN METABOLISM ON LOCOMOTOR BEHAVIOR AND EXPRESSION OF GENES BELONGING TO GLUTAMATERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEMS

G. A. Zakharov, A. V. Zhuravlev, T. L. Payalina,
N. G. Kamyshev, E. V. Savvateeva-Popova

✳ **SUMMARY:** Disbalance of kynurenines produced by *Drosophila* mutations of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism influences the locomotor behavior in larvae. The most pronounced is the effect of accumulation of kynurenic acid in the mutant *cinnabar* manifested as sharp reduction of general level of locomotor activity. The mutations seem to act through modulatory influences of kynurenines on signal cascades governed by ionotropic glutamatergic and cholinergic receptors. Expression of receptor genes in the mutants shows age-related changes pointing to gradual evolvement of consequences of kynurenines disbalance.

✳ **KEY WORDS:** *Drosophila*; kynurenines; kynurenic acid; 3-hydroxykynurenine; locomotor behavior; gene expression; NR1 subunit of NMDA receptor; nicotinic acetylcholine receptors.

✳ Информация об авторах

Захаров Геннадий Александрович — м. н. с.
Институт физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. нейрогенетики.
Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6.
E-mail: Gennadiy.Zakharov@gmail.com

Журавлев Александр Владимирович — м. н. с.
Институт физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. нейрогенетики.
Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6.
E-mail: beneor@mail.ru

Паялина Татьяна Львовна — ст. лаб.
Институт физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. нейрогенетики.
Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6.
E-mail: payalina@mail.ru

Камышев Николай Григорьевич — д. б. н., зав. лаб.
Институт физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. сравнительной генетики поведения.
Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6.
E-mail: nkamster@gmail.com

Савватеева-Попова Елена Владимировна — д. б. н., зав. лаб.
Институт физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. нейрогенетики.
Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6.
E-mail: esavvateeva@mail.ru

Zakharov Gennady Aleksandrovich — junior research worker.
Pavlov Institute of Physiology, RAS, lab. of neurogenetics.
6 Makarova Nab., St. Petersburg, 199034 Russia.
E-mail: Gennadiy.Zakharov@gmail.com

Zhuravlev Alexander Vladimirovich — junior research worker.
Pavlov Institute of Physiology, RAS, lab. of neurogenetics.
6 Makarova Nab., St. Petersburg, 199034 Russia.
E-mail: beneor@mail.ru

Payalina Tatyana Lvovna — senior laboratory assistant.
Pavlov Institute of Physiology, RAS, lab. of neurogenetics.
6 Makarova Nab., St. Petersburg, 199034 Russia.
E-mail: payalina@mail.ru

Kamyshev Nikolai Grigorievich — Head of the laboratory.
Pavlov Institute of Physiology, RAS, lab. of comparative genetics of behavior.
6 Makarova Nab., St. Petersburg, 199034 Russia.
E-mail: nkamster@gmail.com

Savvateeva-Popova Elena Vladimirovna — head of the laboratory.
Pavlov Institute of Physiology, RAS, lab. of neurogenetics.
6 Makarova Nab., St. Petersburg, 199034 Russia.
E-mail: esavvateeva@mail.ru