

© А. Н. Каминская<sup>1,2,3</sup>,  
Е. А. Никитина<sup>1</sup>, Т. Л. Паялина<sup>1,2</sup>,  
Д. А. Молотков<sup>1</sup>, Г. А. Захаров<sup>1,2</sup>,  
А. В. Попов<sup>3</sup>,  
Е. В. Савватеева-Попова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>3</sup> Учреждение Российской академии наук Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН

✿ **LIMK1** — ключевой фермент сигнального каскада ремоделирования актина, обеспечивающий в нервной системе перестройку шипиков дендритов, необходимую для синаптической пластичности при обучении. В данной работе приведены результаты комплексного анализа поведения ухаживания при обучении и формировании среднесрочной памяти самцов линий *Berlin*, *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>*, полиморфных по гену *limk1* *Drosophila*, с использованием 2 подходов: метода условно-рефлекторного подавления ухаживания и исследования звукопродукции самца при ухаживании в сопоставлении с оценкой содержания LIMK1 в мозге анализируемых линий.

✿ **Ключевые слова:** *limk1*, поведение ухаживания, звукопродукция, обучение, память.

Поступила в редакцию 26.07.2011  
Принята к публикации 20.10.2011

## ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ ИЗОФОРМ LIMK1 НА ПОВЕДЕНИЕ УХАЖИВАНИЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER*: КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД

### ВВЕДЕНИЕ

С помощью условного рефлекса организм может диаметрально менять свои реакции на одни и те же факторы среды, сочетая и мобилизуя необходимые внутренние адаптивные процессы в ответ на реальные и ожидаемые события во внешнем мире соответственно опыту, приобретенному в индивидуальном развитии. Условный рефлекс выполняет следующие функции: 1) увеличивает размах нормы реакции онтогенетических функциональных адаптаций, чем способствует повышению роли индивидуального приспособления; 2) выводит организм из-под контроля элиминирующих факторов; 3) важен при подборе скрещивающихся пар, т. е. 4) может приводить к нарушению панмиксии — свободного скрещивания особей в популяции (Лобашев, 1961). Это ведет к репродуктивной изоляции, когда для особей разных популяций снижается вероятность оплодотворения ввиду различий в поведении, например, при ритуалах ухаживания и брачных песнях. И если издавна считалось, что эти процессы лучше всего изучать у птиц, то с развитием тонких методов анализа поведения стало ясно, что наиболее подходящим объектом являются насекомые, не только цикады и сверчки, но и *Drosophila melanogaster*. То обстоятельство, что за поведением *Drosophila* удобно наблюдать не столько в природе, сколько в лаборатории, обеспечило создание совершенно новых способов анализа как условного рефлекса (Siegel and Hall, 1979; Kamyshev et al., 1999), так и параметров звукопродукции при ритуале ухаживания (Попов и др., 2000). Сам ритуал начинается с того, что привлекаемый феромоном самки, афродизиаком, самец начинает осуществлять последовательные этапы ухаживания (ориентация/преследование, вибрация крылом — брачная песня, ликинг, попытка копуляции), каждый из которых служит для повышения рецептивности самки и замедления ее движений, т. е. для обеспечения копуляции. Оплодотворенная самка в течение 10–12 дней откладывает яйца и уклоняется от новых копуляций, при попытке которых выпячивает яйцевод, испуская отталкивающий феромон, антиафродизиаком. Поэтому у самца возникает необходимость различения того, какая именно самка перед ним? При встрече с оплодотворенной самкой самец, основываясь на предыдущем индивидуальном опыте, вынужден остановить ритуал ухаживания, и именно такое его поведение легло в основу широко применяемого метода для изучения процессов обучения и формирования памяти, называемого условно-рефлекторным подавлением ухаживания (УРПУ). В лабораторных условиях самец, достигший половозрелости в возрасте 5 дней в отсутствии каких-либо контактов с другими особями, после пребывания с оплодотворенной самкой в течение 30 мин накапливает опыт отказов от копуляции. Память об этом, т. е. УРПУ, сохраняется в течение 1 часа, если последующая предъявленная самка будет девственной, и 8 часов — если оплодотворенной. Индекс ухаживания (ИУ) рассчитывается как процент времени, затраченного на исполнение всех элементов ухаживания. Индекс обучения (ИО) можно вычислить не только на основе учета всех элементов полового, но и неполового поведения

(двигательной активности, прининга (почесывания), отдыха), но и анализировать записанные этограммы поведения отдельно для каждого параметра (Kamyshov et al., 1999).

Важным компонентом ухаживания является брачная песня. Репертуар брачной песни самца *Drosophila* включает два типа звуковых сигналов — импульсную и синусоидальную песни, следующие друг за другом (Попов и др., 2000). Импульсная песня производится, когда самец вибрирует крыльями. Она несет основную семантическую нагрузку и выполняет триггерную функцию, запуская копуляцию (Schilcher, 1976a, b), а также является видоспецифичным сигналом, играющим важную роль в изоляции видов при выборе потенциального партнера (Ewing, 1989). Синусоидальная песня увеличивает восприимчивость самок (Schilcher, 1976a, b). Звукопродукция во время ухаживания, т. е. чередование импульсной и синусоидальной песни, требует четкого переключения программ работы двух моторных центров — импульсного и синусоидального пейсмейкеров (Попов и др., 2000). При генерации звуковых сигналов возникают их искажения. Процент искаженных импульсов характеризует стабильность работы пейсмейкеров пения, отражая частоту нарушений работы мышц крыла.

Имея в распоряжении обе эти методики, мы задались вопросом — возможно ли увидеть УРПУ при учете одного только элемента ухаживания — того, что при визуальной регистрации поведения называется «вибрация», а при автоматизированной — «звукопродукция»? Если да, то изменение каких параметров звукопродукции быстро и надежно указывает на нарушения процесса формирования памяти? Выделение такого параметра открывает возможность экспресс-скрининга терапевтических средств при условии знания ключевых компонентов биохимических путей процессов формирования памяти в норме и при патологии. Один из самых изучаемых — это каскад ремоделирования актина: рецепторы нейромедиаторов — малые GTPазы Rho-семейства — LIM-киназа 1 (LIMK1) — кофилин — актин. LIMK1, ключевой фермент каскада, фосфорилирует кофилин, тем самым блокируя деполимеризацию актина (Yang et al., 2000; Vamburg and Bloom, 2009). Это вызывает перестройку шипиков дендритов, обеспечивая синаптическую пластичность. LIMK1 в клетке представлена двумя изоформами, различающимися по функциональной активности. Изоформа С представляет собой полноразмерный белок, содержащий 1257 аминокислотных остатков (140 кД), включает два LIM и PDZ домены, которые отсутствуют в изоформе D, содержащей 1052 аминокислотных остатка (119 кД). D-изоформа LIMK1 обладает более высокой киназной активностью, чем С-изоформа, поскольку LIM- и PDZ-домены участвуют в инактивации киназной активности LIMK1 (Nagata et al., 1999). Наличие нескольких изоформ LIMK1 предполагает, что они могут быть по-разному использованы для реализации в популяции различных стратегий поведения, однако исследований такого рода не проводилось. Считается, что дисфункция LIMK1 вызывает нарушения когнитивных функций у па-

циентов с болезнью Альцгеймера (Masliah et al., 2000) вследствие дисрегуляции «актинового каскада». При этом в нейронах мозга этих пациентов происходит образование цитоплазматических включений, окруженных комплексами актин — кофилин (Maloney et al., 2007; Vamburg et al., 2010). Кроме того, при «геномных болезнях», таких как синдром Уильямса человека, делеции, приводящие к гемизиготности по гену *limk1*, вызывают когнитивные нарушения зрительно-пространственного ориентирования. Делеции возникают спонтанно за счет неравной рекомбинации в районе хромосомы со специфической архитектурой. В обоих случаях правила установления баланса различных изоформ LIMK1, реализуемые на уровне поведения, до конца неясны. Выяснению этого вопроса способствует то, что у *Drosophila melanogaster* ген *limk1* также расположен в районе со специфичной архитектурой хромосомы, в локусе *agnostic*: наличие А/Т-богатых областей вблизи локуса предрасполагает к встройке мобильных элементов, возникновению спонтанных перестроек в разных природных популяциях. Так, структура гена изменена у линий дикого типа *Oregon-R* и *Berlin*, а также у мутантной линии *agn<sup>ts3</sup>* (Медведева и др., 2008). И если у мутантной линии *agn<sup>ts3</sup>* с повышенной активностью LIMK1 и кофилина были детектированы значительные нарушения обучения/памяти и амилоидогенез, характерные особенности звукопродукции (Попов и др., 2009), то ничего неизвестно о том, как в остальных случаях измененная структура гена сказывается на активности его продукта и каким образом это реализуется на уровне поведения.

Поэтому настоящая работа посвящена выявлению того, как соотношение изоформ LIMK1 у спонтанных и мутантных вариантов локуса *agnostic* предопределяет условно-рефлекторную деятельность при реализации ритуала ухаживания у дрозофилы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали линии *D. melanogaster*, проявляющие полиморфизм по гену *limk1*, обнаруженный в районе локуса *agnostic* (X-хромосома, 11АВ):

- 1) *Canton-S* — контрольная линия дикого типа.
- 2) *Berlin* — выделена из дикой популяции города Берлина и широко используется в поведенческих исследованиях в Европе. У данной линии при ПЦР-картировании гена *limk1* было обнаружено отсутствие ПЦР-фрагментов в области 3, 4 и частично 5 экзона, а также 2, 3 и 4 интронов (Медведева и др., 2008).
- 3) *Oregon-R* — линия из дикой популяции штата Орегон, США. На генетическом фоне этой линии дикого типа существуют многие известные линии-маркеры и балансеры. При ПЦР-картировании гена *limk1* у данной линии наблюдалось отсутствие ПЦР-фрагментов в области 2 экзона, 1 и 2 интронов (Медведева и др., 2008).
- 4) Линия *agn<sup>ts3</sup>* несет температурно-чувствительную (ts) мутацию, полученную и поддерживаемую на генети-

ческом фоне линии *Canton-S*. При ПЦР-картировании гена для *limk1* у данной линии была обнаружена инсерция 1,7 т. п. н. на расстоянии около 1 т. п. н. от 3'-UTR (Медведева и др., 2008).

Мух выращивали в стаканчиках объемом 160 мл на стандартной изюмно-дрожжевой среде при  $+25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , 60 % влажности и свето-темновом цикле 12 : 12 ч. Вылупившихся насекомых без наркотизации сортировали по полу. Отбирали самцов анализируемой линии и помещали их поодиночке в стаканчики со средой. В качестве объектов ухода для самцов всех анализируемых линий использовали виргинных и оплодотворенных за сутки до опыта самок линии *Canton-S*. Исследования проводили на взрослых мухах в возрасте 5 дней, при температуре  $+25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , в первой половине дня.

#### **ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПААГ**

Для экстракции белков отбирали 30–40 голов 5-суточных самцов для каждой линии *D. melanogaster*. Головы гомогенизировали на льду в 40 мкл раствора ингибитора протеаз (Sigma, США). Полученный гомогенат центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 2 мин. Отбирали надосадочную жидкость. К 30 мкл гомогената добавляли 10 мкл 4 × буфера Леммли для электрофореза. Приготовленные таким образом пробы хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . Определения в образцах концентрации белка проводили по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Концентрации белка с учетом данных фотометрирования выравнивали с использованием спектрофотометра (Eppendorf BioPhotometer, Германия).

#### **ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ**

Разделение белков по молекулярной массе проводили методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле, с концентрирующим (5 % акриламид/бис-акриламид, pH = 6,8) и разделяющим (10 % акриламид/бис-акриламид, pH = 8,8) гелями. Гель заливали в камеру для вертикального электрофореза Mini Protean Tetra Cell (BioRad, Италия) размером 10 × 8 см. В каждый кармашек добавляли по 10 мкл образца. Разделение проводили в течение 120 минут при силе тока 35 мА и напряжении 120 В в трис-глициновом буфере (pH = 8,3). Контрольный гель окрашивали реагентом Кумасси G-250 (Pierce, США) для оценки степени выравнивания концентраций белка на дорожках.

#### **ВЕСТЕРН-БЛОТТИНГ И БЛОТ-ГИБРИДИЗАЦИЯ**

После электрофоретического разделения белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану PROTRAN (Schleicher&Schuell, Германия) на блоттере Fastblot B 34

(Biometra, Германия) полусухим переносом в течение 1 ч. Затем мембрану инкубировали 12 ч в 5 % растворе обезжиренного сухого молока на буфере TBST (pH = 7,6), при  $+4^\circ\text{C}$ . После этого мембрану помещали в раствор первичных антител (SantaCruz, США), в разведении 1 : 400 и инкубировали в течение 1 ч при  $+22^\circ\text{C}$ , затем инкубировали с биотин-мечеными вторичными антителами (Santa Cruz, США), в разведении 1 : 2000 в течение 1 ч при  $+22^\circ\text{C}$ . Затем инкубировали с раствором АВС (авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена) (Vectastain ABC Elite kit, Vector peroxidase substrate kit, Vector, США) в течение 1 ч при  $+22^\circ\text{C}$ . Мембрану помещали в раствор Vector Nova Red substrate kit for peroxidase (Vector laboratories, США) и инкубировали в течение 10–15 мин до развития окраски. Изображение регистрировали с помощью сканера (Epson® ScanPriza) с разрешением 300 dpi. Полученный JPEG-файл анализировали с использованием программного обеспечения Gel analyzer-1.0 (Литех, Россия).

#### **РЕГИСТРАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ УХАЖИВАНИЯ САМЦОВ**

Для регистрации параметров ухода самца изучаемой группы и виргинную самку помещали в камеру диаметром 15 мм и высотой 5 мм, изготовленную из оргстекла. Продолжительность наблюдения за уходом самца составляла 10 мин.

Фиксировали латентный период ухода и время начала копуляции. Длительность ухода рассчитывали как разность времени копуляции и начала ухода. Эффективность ухода вычисляли как процент пар, копулировавших в течение периода наблюдения. В каждой линии тестировали не менее 20 пар мух.

Параметры ухода для *Canton S* были взяты из работы (Попов и др., 2006).

#### **РЕГИСТРАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ЗВУКОПРОДУКЦИИ ПРИ УХАЖИВАНИИ САМЦОВ**

Для регистрации звуковых сигналов самца и оплодотворенную самку помещали в камеру диаметром 8 мм и высотой 4 мм, изготовленную из оргстекла. Для одновременной регистрации пения четырех пар мух четыре микрофона были установлены внутри бокса из пенопласта (25 × 25 × 30 см) с толщиной стенок 3,7 см, расположенного в звукоизолирующей камере. Для гашения вибрации бокс устанавливали на поролоновой подушке толщиной 2 см. Встроенные электронные фильтры позволяли ограничить частотную полосу записи канала в пределах 100–800 Гц, для избежания посторонних шумов. На уровне микрофона устанавливали датчик электронного термометра (Greisinger electronic GTN 175/МО, Германия). Продолжительность регистрации звуков составляла 300 с. Регистрацию звуковых сигналов проводили с помощью аналого-цифрового преобразователя и записывали как

звуковые файлы с использованием программы Н. Г. Камышева. Анализ звуковых сигналов проводили с использованием программы Fly43, разработанной Н. Г. Камышевым и П. В. Озерским (Попов и др. 2000, 2006).

Проводили детальный анализ импульсной и синусоидальной песен звукопродукции самца при ухаживании по отдельным параметрам. В каждой линии тестировали не менее 12 пар мух.

При анализе параметров импульсного сигнала в каждой пятиминутной записи последовательно измеряли все посылки и межимпульсные интервалы. Интервалы короче 80 мс рассматривали как межимпульсные, а интервалы более 80 мс — как межпосылочные. Оценивали дисперсию межимпульсного интервала, процент искаженных импульсов, среднюю длительность импульсных посылок.

При оценке синусоидальной песни учитывали длительность синусоидальных отрезков, основную частоту синусоидальной песни и суммарное число пульсов. В анализ брали синусоидальные отрезки по длительности не менее 100 мс.

Параметры звукопродукции для *Canton S* были взяты из работы (Попов и др., 2006).

### ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ К ОБУЧЕНИЮ САМЦОВ *D. MELANOGASTER*

Оценку способности к обучению проводили, основываясь на методе условно-рефлекторного подавления ухаживания. Для этого самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру вместе с оплодотворенной самкой *Canton S* и оставляли на 30 минут. Обучение тестировали через разные интервалы времени: сразу после тренировки и через 3 часа. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения. В каждой группе (контрольной, сразу после тренировки и через 3 часа после тренировки) тестировали не менее 20 пар мух.

Использовали два подхода:

#### 1) Метод условно-рефлекторного подавления ухаживания

Для выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания (тренировки) пятисуточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру диаметром 15 и высотой 5 мм, изготовленную из оргстекла, вместе с оплодотворенной пятисуточной самкой *Canton S* и оставляли на 30 минут. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения. Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 секунд, фиксируя время начала отдельных элементов ухаживания (ориентация и преследование, вибрация, лизание, попытка копуляции), а также время выполнения элементов, не связанных с ухаживанием (побежка, прининг, по-

кой). Регистрацию начинали через 45 секунд после помещения мух в камеру. Для расшифровки и анализа данных использовали специально разработанные компьютерные программы (автор программ — Н. Г. Камышев).

Для каждого самца вычисляли индекс ухаживания (ИУ), 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:

$$\text{ИО} = [(ИУ_{\text{н}} - ИУ_{\text{т}})/ИУ_{\text{н}}] \times 100\% = (1 - ИУ_{\text{т}}/ИУ_{\text{н}}) \times 100\%,$$

где  $ИУ_{\text{н}}$  и  $ИУ_{\text{т}}$  — средние индексы ухаживания для независимых выборок самцов, не имеющих опыта полового поведения, и самцов, прошедших тренировку.

#### 2) Регистрация звукопродукции при ухаживании

Для оценки способности к обучению самцов *Drosophila* с использованием установки записи звуковых сигналов ухаживания регистрировали импульсную и синусоидальную песни ухаживания самцов, не имеющих опыта полового поведения, сразу после обучения и спустя 3 часа после обучения. Индекс ухаживания (ИУ) рассчитывали как процент времени, затраченного самцом на звукопродукцию импульсной и синусоидальной песен. Индекс обучения (ИО) — как разницу ИУ до тренировки и ИУ после тренировки. Для оценки вклада в обучение компонентов песни ухаживания — импульсной и синусоидальной составляющих — значения индексов импульсной (И) и синусоидальной (С) песен вычисляли по следующим формулам:

$$И = T_{\text{н}}/T_{\text{общ}},$$

$$С = T_{\text{с}}/T_{\text{общ}},$$

где  $T_{\text{н}}$  и  $T_{\text{с}}$  — время, затраченное самцом на звукопродукцию импульсной и синусоидальной компоненты песни ухаживания;  $T_{\text{общ}}$  — общее время тестирования.

Затем находили отношение И/С отдельно для каждого самца и рассчитывали среднее значение для каждой группы до и после обучения.

### СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Статистическую обработку полученных значений проводили с помощью программного обеспечения GraphPad InStat 3 и Statistica 6.0. Использовали тест Манн-Уитни для длительности импульсных посылок; критерий Фишера для эффективности ухаживания; тест Левина для дисперсии МИИ; рандомизационный анализ для соотношения индексов импульсной и синусоидальной песен, а также для оценки способности к обучению при помощи метода условно-рефлекторного подавления ухаживания и исследования звукопродукции самца при ухаживании. Дисперсионный анализ использовали при оценке значений интенсивности окрашивания белковых полос LIMK1. В остальных случаях применяли непарный t-критерий Стьюдента.

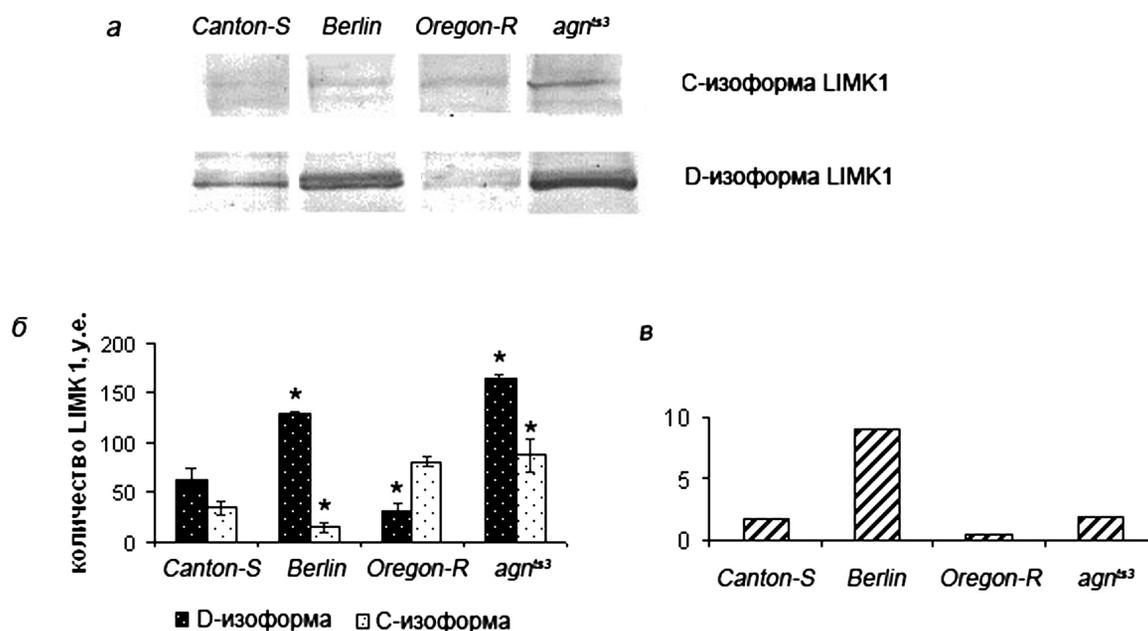


Рис. 1. Вестерн-блот анализ LIMK1 у самцов линий *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>*: а) С- и D-изоформы LIMK1; б) содержание D- и С-изоформ; в) соотношение количества изоформ D/С.  
\* — достоверные отличия от *Canton-S* (дисперсионный анализ,  $p < 0,05$ )

РЕЗУЛЬТАТЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА LIMK1 В МОЗГЕ САМЦОВ *D. MELANOGASTER*

С использованием метода иммуноблоттинга и последующей гибридизацией антител к С-концу LIMK1 был проведен количественный анализ содержания D- и С-изоформ LIMK1 в мозге самцов линии *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>* (рис. 1 а).

Соотношение между изоформами D и С LIMK1 и их количество в мозге самцов между анализируемыми линиями варьировало. Так, количество D- и С-изоформ LIMK1 у *agn<sup>ts3</sup>* в 3 раза превышало таковое у *Canton-S* (рис. 1 б), в то время как их соотношение у *agn<sup>ts3</sup>* не отличалось от такового у *Canton-S* (рис. 1 в). Количество D-изоформы у *Berlin* в 2 раза превышало таковое у *Canton-S*, а у *Oregon-R* было в 2 раза меньше, чем у *Canton-S* (рис. 1 б). Для линий дикого типа характерно различное соотношение D- и С-изоформ (рис. 1 в). Таким образом, в ходе наших экспериментов было впервые выявлено неодинаковое содержание и соотношение изоформ LIMK1 у линий дикого типа *Berlin*, *Oregon-R* и *Canton-S* и мутантной линии *agn<sup>ts3</sup>*, что, возможно, вызвано разными регуляторными механизмами сплайсинга у каждой линии.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВЕДЕНИЯ УХАЖИВАНИЯ САМЦОВ *D. MELANOGASTER*

Сравнительный анализ по трем параметрам поведения ухаживания: 1) латентному периоду ухаживания (ЛПУ),

2) длительности ухаживания (ДУ) и 3) эффективности ухаживания (ЭУ) самцов линии *agn<sup>ts3</sup>*, *Berlin* и *Oregon-R* выявил следующие особенности этих линий (табл. 1). ЛПУ у *Oregon-R* и у *agn<sup>ts3</sup>* достоверно был увеличен относительно такового у *Canton-S*, что не оказало влияния на эффективность ухаживания, которая у линий *agn<sup>ts3</sup>* и *Oregon-R* была сопоставима с таковой у *Canton-S*. В то же время увеличение ЛПУ у *Berlin* в 4 раза по сравнению с *Canton-S* сопровождается достоверным снижением величины эффективности ухаживания. ДУ *Berlin* и *Oregon-R* достоверно превышала таковую у *Canton-S*, в то время как для *agn<sup>ts3</sup>* статистически значимых различий выявлено не было.

Таблица 1

Параметры ухаживания самцов линии *Canton-S*, *Berlin* и *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>*

Линия	п	ЛПУ, с	ДУ, с	ЭУ, %
Canton-S	63	22 ± 3	145 ± 17	87
Berlin	66	80 ± 12*	324 ± 28*	50*
Oregon-R	61	54 ± 9*	264 ± 21*	77
agn <sup>ts3</sup>	51	55 ± 9*	162 ± 19	86

п — число тестированных самцов

ЛПУ — латентный период ухаживания

ДУ — длительность ухаживания

ЭУ — эффективность ухаживания

\* — достоверные отличия от *Canton-S* (непарный t-критерий Стьюдента, для ЭУ — сравнение долей по Фишеру,  $p < 0,05$ ).

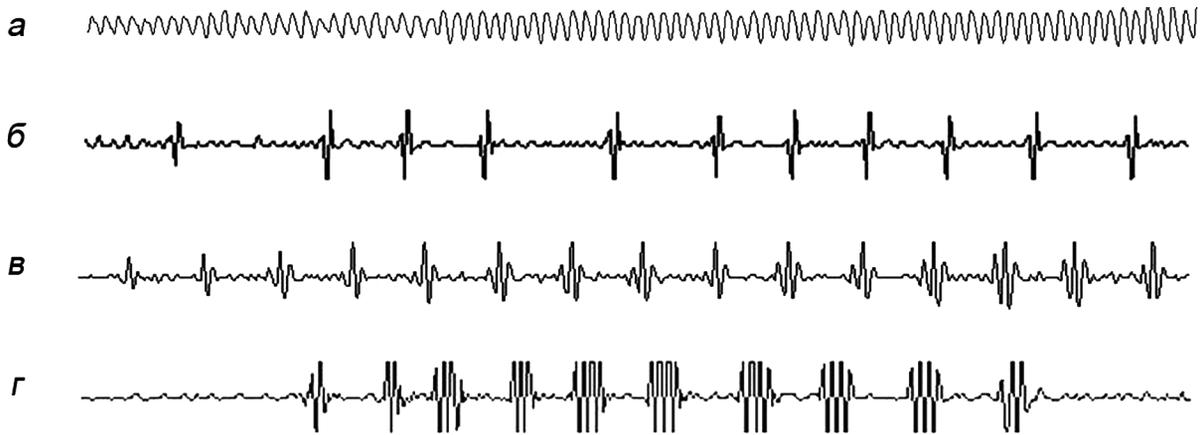


Рис. 2. Осциллограммы сигналов ухаживания самцов *D. melanogaster* синусоидальной песни (а) и импульсной песни с нормальными (б) и искаженными пульсами (в, г). Длительность каждой осциллограммы 500 мс

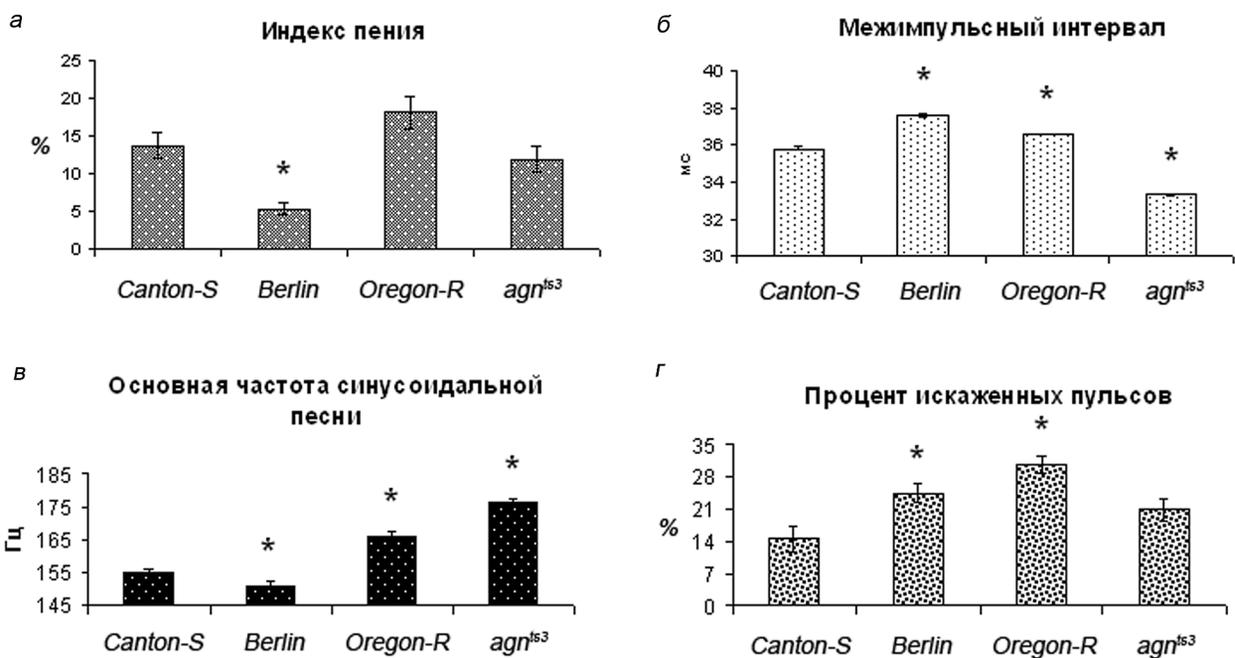


Рис. 3. Параметры звуковых сигналов самцов линий *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R* и *agn<sup>1s3</sup>*: а) индекс пения; б) межимпульсный интервал; в) основная частота синусоидальной песни; г) процент искаженных импульсов.

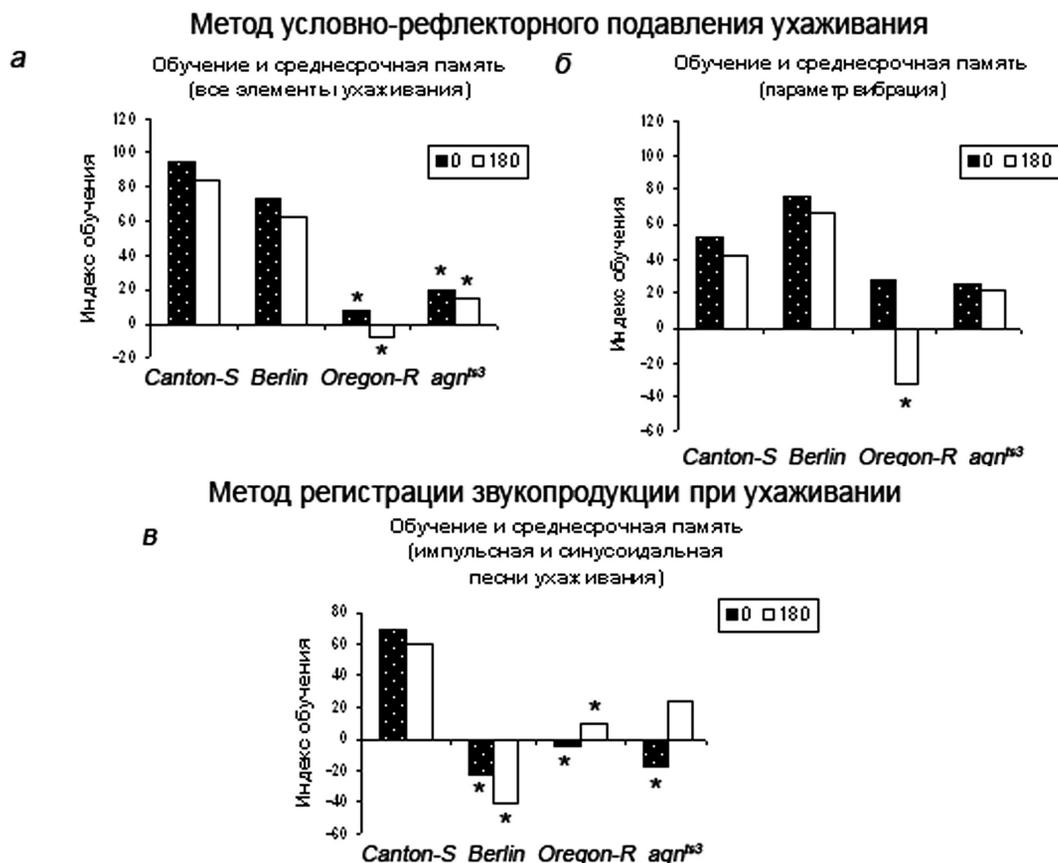
\* — достоверные отличия от *Canton-S* (непарный t-критерий Стьюдента,  $p < 0,05$ )

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЗВУКОВЫХ СИГНАЛОВ УХАЖИВАНИЯ САМЦОВ *D. MELANOGASTER*

С использованием установки автоматической регистрации звукопродукции самцов *Drosophila* был проведен сравнительный анализ звуковых сигналов ухаживания самцов *agn<sup>1s3</sup>*, *Berlin* и *Oregon-R* в сопоставлении с *Canton-S*. На рисунке 2 приведены осциллограммы сигналов ухаживания самцов: синусоидальной песни (рис. 2 а) и импульсной песни с нормальными (рис. 2 б) и искаженными (рис. 2 в, г) импульсами. Оценивали 4 параметра звуковых комму-

никационных сигналов: индекс пения, межимпульсный интервал, основную частоту синусоидальной песни и процент искаженных импульсов.

Основным параметром звуковых сигналов, характеризующим уровень половой мотивации, является индекс пения (ИП). ИП у *agn<sup>1s3</sup>* и *Oregon-R* не отличались от таковых у *Canton-S*, в то время как для *Berlin* было характерно почти трехкратное снижение этого параметра (рис. 3, а). Наиболее значимым параметром для распознавания самкой сигнала ухаживания самца своего вида является межимпульсный интервал (МИИ). У самцов *agn<sup>1s3</sup>* МИИ короче, чем



**Рис. 4.** Оценка способности к обучению и формированию среднесрочной памяти самцов линий *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>*. Метод условно-рефлекторного подавления ухаживания: а) обучение и среднесрочная память (все элементы ухаживания); б) обучение и среднесрочная память (параметр вибрации). Метод регистрации звукопродукции при ухаживании: в) обучение и среднесрочная память (импульсная и синусоидальная песни ухаживания). 0 — индекс обучения сразу после тренировки; 180 — индекс обучения через 3 часа после тренировки; \* — достоверные отличия от *Canton-S* (двусторонний тест рандомизации,  $p < 0,05$ )

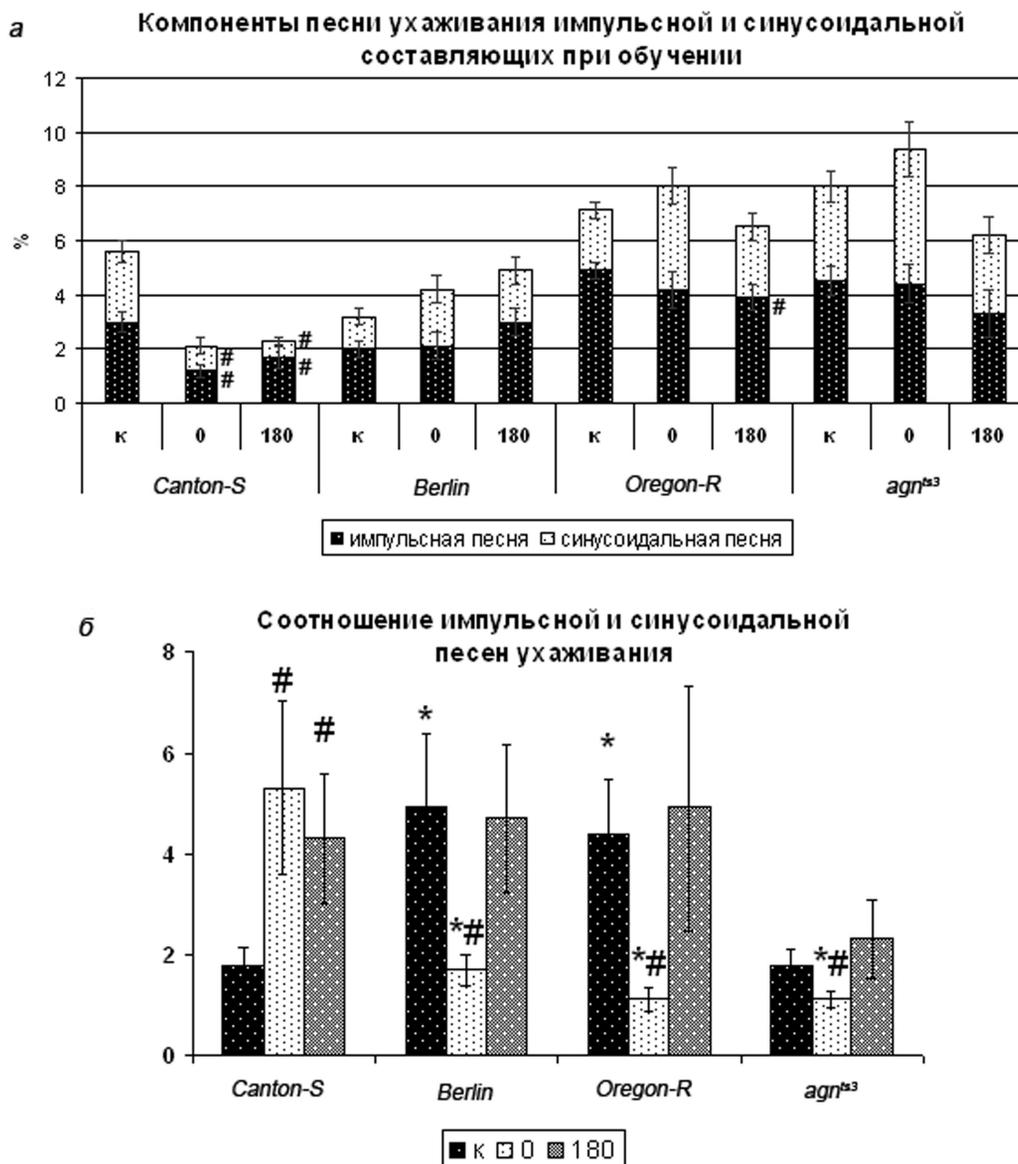
у самцов *Canton-S*, что свидетельствует о более высоком ритме пения самцов *agn<sup>ts3</sup>*. Для *Berlin* и *Oregon-R*, напротив, характерно увеличение этого параметра (рис. 3 б). Основная частота (ОЧ) синусоидальной песни анализируемых линий также отличается от таковой у *Canton-S*. Так, для *agn<sup>ts3</sup>* и *Oregon-R* характерно увеличение значения этого параметра, в то время как у самцов *Berlin* ОЧ короче, чем у *Canton-S* (рис. 3 в). При генерации звуковых сигналов в процессе ухаживания возникают искажения формы звуковых импульсов, в том числе и у мух дикого типа. Искажения с увеличенной длительностью импульса наиболее часто встречаются у самцов *Berlin* и *Oregon-R*, в то время как у *agn<sup>ts3</sup>* они возникают реже. У самцов *agn<sup>ts3</sup>* наиболее часто возникают искажения с полициклическими импульсами, вызванные, по-видимому, тремором мышц пения. Процент искаженных импульсов (% ИП) характеризует стабильность работы пейсмейкеров пения, отражая частоту нарушений режима работы крыловых мышц. *agn<sup>ts3</sup>* по этому параметру не отличается от *Canton-S*. *Berlin* и *Oregon-R* демонстрируют более высокие уровни ИП (рис. 3 г).

**ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ К ОБУЧЕНИЮ ПРИ УСЛОВНО-РЕФЛЕКТОРНОМ ПОДАВЛЕНИИ УХАЖИВАНИЯ САМЦОВ *D. MELANOGASTER***

Условно-рефлекторное подавление ухаживания является естественной формой обучения у дрозофилы, т. е. после ухаживания за нерцептивной оплодотворенной самкой (тренировки) у самца снижается интенсивность ухаживания за всеми последующими самками. На этом основана оценка способности к обучению самцов *D. melanogaster*. У исследуемых линий была изучена динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания (рис. 4 а).

У линий *Canton-S* и *Berlin* индекс обучения длительное время сохранялся на уровне, достигнутом сразу после окончания тренировки, что свидетельствует о нормальном протекании процессов обучения и формирования среднесрочной памяти.

У линии *Oregon-R* выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания не наблюдалось, при тестировании



**Рис. 5.** Покомпонентный анализ песни ухаживания при обучении: а) компоненты песни ухаживания (импульсная и синусоидальная составляющие); б) соотношение импульсной и синусоидальной песен  
 к — контрольная группа (самцы, не имеющие опыта полового поведения)  
 0 — тест сразу после тренировки (обучение)  
 180 — тест через 3 часа после тренировки (память)  
 \* — достоверные отличия от *Canton-S* (двусторонний тест рандомизации,  $p < 0,05$ ).  
 # — достоверные отличия от контрольной группы, (двусторонний тест рандомизации,  $p < 0,05$ )

сразу после тренировки значимый индекс обучения получен не был. Таким образом, исследуемая линия оказалась неспособной к обучению. Через 3 часа после тренировки подавления ухаживания также не наблюдалось, напротив, индекс обучения принимал отрицательное значение и статистически достоверно отличался от такового у *Canton-S*.

У мутантной линии *agn<sup>ts3</sup>* выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания не происходило, при тестировании сразу после тренировки значимый индекс обучения получен не был. Таким образом, исследуемая линия оказалась неспособной к обучению. Через 3 часа после

тренировки также не наблюдалось подавления ухаживания. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что у *agn<sup>ts3</sup>* по сравнению с *Canton-S* снижены не только 3-часовая память, но и способность к обучению.

Был проведен поэлементный анализ поведения ухаживания у исследуемых линий *Drosophila*, в частности, был проанализирован такой важный элемент ухаживания как вибрация (рис. 4, б).

У линий *Canton-S* и *Berlin* был выявлен значимый индекс обучения, который в течение 3 часов сохранялся на уровне, достигнутом сразу после окончания тренировки. По

компоненту вибрации у самцов линии *Berlin* статистически значимых отличий от линии *Canton-S* обнаружено не было.

У линии *Oregon R* при тестировании сразу после тренировки индекс обучения достоверно не отличался от такового у *Canton-S* — по параметру вибрации исследуемая линия оказалась способной к обучению. Напротив, через 3 часа после тренировки индекс обучения принимал отрицательное значение.

У мутантной линии *agn<sup>ts3</sup>* при тестировании как сразу, так и через 3 часа после тренировки индекс обучения достоверно не отличался от такового у линии *Canton-S* — исследуемая линия оказалась способной к обучению и сохранению памяти по параметру вибрации.

#### ОБУЧЕНИЕ САМЦОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УСТАНОВКИ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ЗВУКОПРОДУКЦИИ ПРИ УХАЖИВАНИИ САМЦОВ *D. MELANOGASTER*

С целью проведения детального анализа способности к обучению самцов *Drosophila* был применен метод оценки данного показателя с использованием установки записи звуковых сигналов ухаживания, автоматически регистрирующей звукопродукцию при ухаживании — вибрацию, соответствующую импульсной и синусоидальной песням.

У линии *Canton-S* наблюдалось условно-рефлекторное подавление ухаживания, и индекс обучения длительное время сохранялся на уровне, достигнутом сразу после окончания тренировки (рис. 4, в).

У самцов линии *Berlin*, *Oregon-R* и *agn<sup>ts3</sup>* при тестировании сразу после тренировки условно-рефлекторного подавления ухаживания не наблюдалось, значимый индекс обучения получен не был. Индекс обучения принимал отрицательные значения и статистически значимо отличался от такового у линии *Canton-S* (рис. 4, в).

Спустя 3 часа после тренировки индекс обучения у самцов линии *Berlin* и *Oregon-R* также принимал отрицательные значения и достоверно отличался от такового у линии *Canton-S*, чего не наблюдалось у линии *agn<sup>ts3</sup>* (рис. 4, в).

Далее нами были проанализированы отдельные компоненты песни ухаживания импульсной и синусоидальной составляющих после обучения (рис. 5, а). У самцов линии *Canton-S* как сразу, так и через 3 часа после тренировки отмечалось снижение импульсной и синусоидальной песен в 3 раза. У остальных линий не наблюдалось снижения индекса ни импульсной, ни синусоидальной составляющих песни ухаживания, за исключением варианта эксперимента через 3 часа после тренировки у линии *Oregon-R* (рис. 5, а).

Было проанализировано соотношение индексов импульсной и синусоидальной песен (И/С) для каждой линии (рис. 5, б). Для самцов линии *Canton-S* в контроле характерно преобладание импульсной над синусоидальной песней. Сразу после тренировки для самцов этой линии было характерно увеличение И/С, которое достоверно отличалось от контроля, подобное превалирование импульсной над синусоидальной песней сохранялось и при тестировании через 3

часа. У самцов линий *Berlin* и *Oregon* в контрольных группах импульсная песня преобладала над синусоидальной, И/С достоверно отличалось от *Canton-S*. Однако сразу после тренировки у линий *Berlin* и *Oregon* происходило значительное снижение И/С, а спустя 3 часа — восстановление до значений контроля. И/С самцов линии *agn<sup>ts3</sup>* в контрольной группе достоверно не отличалось от такового у *Canton-S*. Однако после тренировки у *agn<sup>ts3</sup>* наблюдалось достоверное снижение И/С. Через 3 часа после тренировки у *agn<sup>ts3</sup>* достоверных изменений зарегистрировано не было.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

М. Е. Лобашев сформулировал определение роли условного рефлекса как возможности животного «диаметрально менять свои реакции на одни и те же факторы среды, сочетая и мобилизуя необходимые внутренние адаптивные процессы в ответ на реальные и ожидаемые события во внешнем мире» (Лобашев, 1961). Эта формулировка как нельзя более подходит к описанию сущности условно-рефлекторного подавления ухаживания. Действительно, в природных популяциях при каждой встрече самцов и самок дрозофилы к ожидаемому самцом событию относится то, что самка является девственной, а к реальному — то, что в популяции многие самки уже оплодотворены. В любом случае высокая мотивация самца запускает ритуал ухаживания, при исполнении которого ему предстоит убедиться в том, может ли эта самка оставить потомство и, если нет, с учетом предыдущего опыта, прекратить ухаживание. А что же является сочетанием и мобилизацией «необходимых внутренних адаптивных процессов в ответ на реальные и ожидаемые события во внешнем мире»?

Все более возрастающее внимание нейробиологов и клиницистов к каскаду ремоделирования актина, объединение разных по этиологии, зонам поражения мозга нейродегенеративных заболеваний под названием «болезни актинового цитоскелета», или кофилинопатии, указывают на широкий спектр внутренних адаптационных процессов, сопряженных с тем или иным уровнем функционирования этого каскада. Ключевой фермент ремоделирования актина, LIMK1, оказывается на перекрестке многих регуляторных путей, так как содержит LIM и PDZ домены для осуществления межмолекулярных белок-белковых взаимодействий (Edwards, Gordon, 1999). LIMK1 влияет на транскрипцию через активацию CREB (Yang et al., 2004), участвует в перестройках актинового цитоскелета в дендритах (Endo, Ohashi, Mizuno, 2007). Активность LIMK1 регулируется микроРНК — miRNA-134, которая связывается с 3'-UTR мРНК для LIMK1, и этот комплекс транспортируется к синапсам дендритов, где в ответ на стимуляцию экстраклеточными нейротрофическими факторами происходит мРНК LIMK1 локальная трансляция (Schratt et al., 2006). Гиперэкспрессия miRNA-134 подавляет транскрипцию CREB, тем самым нарушая синаптическую пластичность, процессы обучения и формирования памяти.

ти (Gao et al., 2010). Ранее при ПЦР-картировании гена *limk1* дрозофилы мы показали, что линиям дикого типа *Oregon-R* и *Berlin*, а также мутантной линии *agn<sup>ts3</sup>* свойственны определенные модификации либо в структурной, либо в регуляторной областях гена (Медведева и др., 2008). Поэтому интересно проследить возможную взаимосвязь между содержанием и соотношением изоформ LIMK1, наблюдаемых у каждой из проанализированных линий, с организацией полового поведения.

Первое, что обращает на себя внимание при рассмотрении результатов вестерн-блот анализа — содержание D-изоформы у линии дикого типа *Berlin* двукратно превышает уровень *Canton-S*. Для этой линии также свойственно уникальное 5-кратное увеличение соотношения D/C изоформ. Наоборот, для линии дикого типа *Oregon-R* характерно 5-кратное уменьшение соотношения D/C изоформ относительно *Canton-S*. И только мутант *agn<sup>ts3</sup>* проявляет повышенное содержание обеих изоформ в 2,5 раза, хотя их соотношение сопоставимо с наблюдаемым у *Canton-S*.

Каковы последствия этого на уровне поведения? Первое, что важно с популяционной точки зрения — это эффективность ухаживания, резко нарушенная, как ни странно, у линии дикого типа *Berlin*. Для того, чтобы реализовалось это нарушение, по-видимому, важна длительность латентного периода ухаживания. Действительно, у всех линий этот параметр выше, чем у *Canton-S*, причем у линии *Berlin* в четыре раза. По-видимому, сама длительность ухаживания не столь критична для итоговой его эффективности, в то время как резкое, почти 3-кратное снижение индекса пения при исполнении брачной песни, отличающее эту линию от всех других, в наибольшей мере сказывается на эффективности ухаживания. Отражаются ли все эти характерные особенности линии *Berlin* на ее способности к обучению и сохранению памяти? Они незначительны при визуальной регистрации как всех элементов ухаживания, так и отдельно вибрации крыла, однако тут же дают о себе знать при переходе к более точному уровню анализа с использованием установки для автоматической регистрации звукопродукции, приводя к парадоксальному, отрицательному значению индекса обучения как сразу, так и через 3 часа после тренировки. По-видимому, это является результатом других характерных особенностей звукопродукции данной линии — уменьшение основной частоты синусоидальной песни наряду с повышением такого семантического компонента, как межимпульсный интервал.

К чему приводит дисбаланс изоформ LIMK1 в пользу более длинной и менее активной изоформы C у линии дикого типа *Oregon-R*? И эффективность ухаживания, и индекс пения у нее такие же, как у *Canton-S*, хотя и межимпульсный интервал, и основная частота синусоидальной песни значительно отличаются. Но уже при визуальной регистрации обнаруживается нарушение среднесрочной памяти как при учете всех элементов ритуала ухаживания, так и при учете только вибрации крыла. При использовании установки для автома-

тической регистрации звукопродукции выявляется также и неспособность к обучению сразу после тренировки.

Повышение содержания обеих изоформ LIMK1 в 2,5 раза у мутантной линии *agn<sup>ts3</sup>* при их сопоставимом с наблюдаемым у *Canton-S* соотношении, также не сказывается на эффективности ухаживания и индексе пения, хотя межимпульсный интервал наименьший из наблюдаемых, а основная частота синусоидальной песни наибольшая. И обучение, и среднесрочная память сильно нарушены, что вызвано не изменениями при генерировании вибрации, а модификациями другого компонента ритуала ухаживания — ориентации/преследования (неопубликованные данные). Применение установки для автоматической регистрации звукопродукции позволяет выявить нарушение обучения.

Анализ динамики импульсной и синусоидальной песен, а также их соотношения в норме, сразу после тренировки и через 3 часа интересен для сопоставления двух методик. Действительно, для *Canton-S* свойственно рефлекторное подавление ухаживания, что видно и при рассмотрении его динамики с учетом как всех элементов ухаживания, так и отдельно вибрации. Визуально регистрируемая вибрация крыла самца дрозофилы отражает импульсную песню, в связи с чем вполне закономерны ее изменения при обучении, а отклонения при звукоизлучении будут свидетельствовать о нарушениях условно-рефлекторного подавления ухаживания, что мы и видим для линии дикого типа *Oregon-R*. Одни и те же закономерности выявляются обеими методиками и для мутантной линии *agn<sup>ts3</sup>*. Только автоматическая регистрация звукопродукции, как более тонкий и точный способ анализа поведения, выявляет снижение способности к обучению, связанное, по-видимому, с серьезными нарушениями параметров ухаживания. По всей видимости, обнаруженное своеобразие линии *Oregon-R* является результатом уникального, 5-кратного уменьшения относительно *Canton-S* соотношения D/C изоформ LIMK1.

Выявляемое нами изменение соотношения изоформ LIMK1 в мозгу самцов *Berlin* и *Oregon-R*, возможно, является результатом изменений альтернативного сплайсинга гена *limk1*, причиной которого, по всей видимости, служат точечные мутации — трансверсии и трансцизии, а также инсерции и делеции у этих линий, выявляемые нами при проводимом секвенировании гена *limk1* (неопубликованные данные).

При сохранении баланса изоформ в мозгу самцов *agn<sup>ts3</sup>* отмечается высокий уровень LIMK1. Повышенный уровень содержания LIMK1 у самцов линии *agn<sup>ts3</sup>*, возможно, связан с наличием в 3'-некодирующей области гена *limk1* инсерции (Медведева и др., 2008), которая может изменять его регуляцию.

По современным представлениям, один ген может регулироваться несколькими miРНК, а одна miРНК способна регулировать большое число генов (Medvedeva, Zhuravlev, Savateeva-Popova, 2010). Кроме уже упомянутой miRNA-

134, регулирующей активность LIMK1, обнаружены miRNA-103 и miRNA-107, связывающиеся с 3'-UTR кофиллина, основного субстрата LIMK1 (Yao et al., 2010). Репрессию ряда мРНК детектируют как на пресимптоматической стадии развития болезни Альцгеймера, так и непосредственно при выявлении симптомов (Schonrock et al., 2010).

miRNA-134 была обнаружена при использовании программы для биоинформационного анализа MicroInspector (Rusinov et al., 2005), мы решили обратиться именно к такому способу анализа. В этой связи был поставлен вопрос — несет ли район 3'-UTR гена *limk1* дрозофилы, содержащий вставку транспозона, сайты связывания микроРНК, регулирующих активность LIMK1. С использованием программы MicroInspector было выявлено 13 сайтов связывания микроРНК (Medvedeva, Zhuravlev, Savvateeva-Popova, 2010).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Созданная модель позволяет обратиться к экспериментальному изучению процессов регуляции с участием микроРНК на примере *Drosophila melanogaster* (Botella et al., 2009; Moloney et al., 2009; Rincon-Limas et al., 2010). Нервные сети насекомых устроены существенно проще, чем у млекопитающих, но обладают сходными функциональными возможностями и их работа основана на использовании общих молекулярных компонентов, кодируемых гомологичными генами (параллелизм функций по Л. А. Орбели и М. Е. Лобашеву).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований №09-04-01208, проектом ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, Программой РАН Биологическое разнообразие и Госконтрактом с Минобрнауки НИР №1.37.124.2011.

### Литература

1. Лобашев М. Е., 1961. Сигнальная наследственность // Исследования по генетике. Л.: изд-во ЛГУ. Под редакцией М. Е. Лобашева. Т. 1. С. 3–11.
2. Медведева А. В., Молотков Д. А., Никитина Е. А., Попов А. А., Карагодин Д. А., Баричева Е. М., Савватеева-Попова Е. В. 2008. Системная регуляция генетических и цитогенетических процессов сигнальным каскадом ремоделирования актина: локус *agnostic* дрозофилы // Генетика. Т. 44. № 6. С. 669–681.
3. Попов А. В., Каминская А. Н., Савватеева-Попова Е. В., 2009. Поведение ухаживания, коммуникационное звукоизлучение и устойчивость к стрессу мутантов дрозофилы *Drosophila melanogaster* по гену *agnostic*, кодирующему LIMK1 // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. Т. 45. № 2. С. 184–190.

4. Попов А. В., Переслени А. И., Комарова А. Ю., Савватеева-Попова Е. В., 2006. Устойчивость характеристик поведения ухаживания и коммуникационного звукоизлучения самцов *Drosophila melanogaster* к стрессорным воздействиям на разных стадиях онтогенеза // Сенсорные системы. Т. 20. №2. С. 131–140.
5. Попов А. В., Савватеева-Попова Е. В., Камышев Н. Г., 2000. Особенности акустической коммуникации у плодовых мушек *Drosophila melanogaster* // Сенсорные системы. Т. 14. С. 60–74.
6. Bamberg J. R., Bloom G. S., 2009. Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease // Cell Motil Cytoskeleton. Vol. 66. № 8. P. 635–649.
7. Bamberg J. R., Zheng J. Q., 2010. ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity // Nat Neurosci. Vol. 13. № 10. P. 1208–1215.
8. Botella J. A., Bayersdorfer F., Gmeiner F., Schnewly S., 2009. Modelling Parkinson's disease in *Drosophila* // Neuromolecular Med. Vol. 11. № 4. P. 268–80.
9. Edwards D. C., Gill G. N., 1999. Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton // J. Biol. Chem. Vol. 274. № 16. P. 11352–11361.
10. Endo M., Ohashi K., Mizuno K., 2007. LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension // J. Biol. Chem. Vol. 282. № 18. P. 13692–13702.
11. Ewing A. W., 1989. Arthropod bioacoustics: neurobiology and behavior // N. Y.: Cornell University Press.
12. Gao J., Wang W. Y., Mao Y. W., Gräff J., Guan J. S., Pan L., Mak G., Kim D., Su S. C., Tsai L. H., 2010. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134 // Nature. Vol. 466. № 7310. P. 1105–1114.
13. Kamyshev N. G., Iliadi K. G., Bragina J. V. 1999. *Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory // Learn Mem. Vol. 6 № 1. P. 1–20.
14. Maloney M. T., Bamberg J. R., 2007. Cofilin-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and other amyloidopathies // Mol Neurobiol. Vol. 35. № 1. P. 21–44.
15. Masliah E., 2000. The role of synaptic proteins in Alzheimer's disease // Ann N Y Acad Sci. Vol. 924. P. 68–75.
16. Medvedeva A. V., Zhuravlev A. V., Savvateeva-Popova E. V., 2010. LIMK1, the key enzyme of actin remodeling bridges spatial organization of nucleus and neural transmission: from heterochromatin via non-coding RNAs to complex behavior. In: Horizons in Neuroscience Research. Vol. 1. Ch. 4. P. 161–193.
17. Moloney A., Sattelle D. B., Lomas D. A., Crowther D. C., 2010. Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models // Trends Biochem Sci. Vol. 35. N 4. P. 228–235.
18. Nagata K., Ohashi K., Yang N., Mizuno K., 1999. The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1 // Biochem. J. Vol. 343 Pt1. P. 99–105.

19. Rincon-Limas D. E., Casas-Tinto S., Fernandez-Funez P., 2010. Exploring prion protein biology in flies: genetics and beyond // *Prion*. Vol. 4. № 1. P.1–8.
20. Rusinov V., Baev V., Minkov I. N., Tabler M., 2005. MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence // *Nucleic Acids Res.* Vol. 33 (Web Server issue): W. 696–700.
21. Schilcher F. von., 1976a. The role of auditory stimuli in the courtship of *Drosophila melanogaster* // *Anim. Behav.* Vol. 24. P. 18–26.
22. Schilcher F. von., 1976b. The function of pulse song and sine song in courtship of *Drosophila melanogaster* // *Anim. Behav.* Vol. 24. P. 622–625.
23. Schonrock N., Ke Y. D., Humphreys D., Staufienbiel M., Ittner L. M., Preiss T, Götz J., 2010. Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid-beta // *PLoS One*. Vol. 5. №6. P. e11070.
24. Schratt G. M., Tüebing F., Nigh E. A., Kane C. G., Sabatini M. E., Kiebler M., Greenberg M. E., 2006. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development // *Nature*. Vol. 439. №7074. P. 283–289.
25. Siegel R. W., Hall J. C., 1979. Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 76. № 1. P.3430–3434.
26. Yang C., Huang M., DeBiasio J., Pring M., Joyce M., Miki H., Takenawa T., Zigmond S. H., 2000. Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization // *J Cell Biol.* Vol. 150. №5. P. 1001–1012.
27. Yao Jiaqi, Hennessey Tom, Flynt Alex, Lai Eric, Beal M. Flint, Lin Michae T., 2010. MicroRNA-Related Cofilin Abnormality in Alzheimer's Disease // *PLoS ONE*. Vol. 5. №12. P. 15546–15554.

**EFFECT OF LIM KINASE 1 ISOFORM RATIO ON DROSOPHILA MELANOGASTER COURTSHIP BEHAVIOR: A COMPLEX APPROACH**

A. N. Kaminskaya, E. A. Nikitina, T. L. Payalina, D. A. Molotkov, G. A. Zakharov, A. V. Popov, E. V. Savvateeva-Popova

☼ **SUMMARY:** LIMK1 — is the key enzyme of actin remodeling which controls dendritic spine morphology necessary for synaptic plasticity during learning and memory formation. Conditioned courtship suppression paradigm and a set-up for communicative sound production during courtship were used to assess learning acquisition and memory formation in four *Drosophila* strains polymorphic for the *limk1* gene harbored by the agnostic locus: the wild type strains *Canton-S*, *Berlin*, *Oregon-R* and the mutant *agn<sup>ts3</sup>*. Behavioral performances were compared to the brain content and ratio of two LIMK1 isoforms in these *Drosophila* strains.

☼ **KEY WORDS:** *limk1*; courtship; sound production; learning; mem.

☼ Информация об авторах

**Каминская Алена Николаевна** — м. н. с.

Институт Физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. нейрогенетики. Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6, Россия. E-mail: kaminskayaan@mail.ru.

**Никитина Екатерина Александровна** — м. н. с.

Институт Физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. нейрогенетики. Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6, Россия. E-mail: 21074@mail.ru.

**Паялина Татьяна Львовна** — ст. лаб.

Институт Физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. нейрогенетики. Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6, Россия. E-mail: payalina@mail.ru.

**Молотков Дмитрий Андреевич** — ст. лаб.

Институт Физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. нейрогенетики. Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6, Россия. E-mail: momitek@mail.ru.

**Захаров Геннадий Александрович** — м. н. с.

Институт Физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. нейрогенетики. Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6, Россия. E-mail: Gennadiy.Zakharov@gmail.com.

**Попов Андрей Владимирович** — д. б. н., зав. лаб.

Институт Эволюционной Физиологии и Биохимии им. И. М. Сеченова, РАН, лаб. нейроэтологии насекомых. 194223 Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44, Россия. E-mail: office@iephb.ru.

**Саввateeva-Попова Елена Владимировна** — д. б. н., зав. лаб.

Институт Физиологии им. И. П. Павлова, РАН, лаб. нейрогенетики. Санкт-Петербург, 199034 наб. Макарова, д.6, Россия. E-mail: esavvateeva@mail.ru.

**Kaminskaya Alena Nikolaevna** — junior research worker.

Pavlov Institute of Physiology, RAS, Lab. of neurogenetics. Saint-Petersburg, 199034 Makarova emb., 6, Russia. E-mail: kaminskayaan@mail.ru.

**Nikitina Ekaterina Alexandrovna** — Ph.D., senior research worker.

Pavlov Institute of Physiology, RAS, Lab. of neurogenetics. Saint-Petersburg, 199034 Makarova emb., 6, Russia. E-mail: 21074@mail.ru.

**Payalina Tatyana Lvovna** — senior laboratory assistant.

Pavlov Institute of Physiology, RAS, Lab. of neurogenetics. Saint-Petersburg, 199034 Makarova emb., 6, Russia. E-mail: payalina@mail.ru.

**Molotkov Dmitry Andreevich** — senior laboratory assistant.

Pavlov Institute of Physiology, RAS, Lab. of neurogenetics. Saint-Petersburg, 199034 Makarova emb., 6, Russia. E-mail: momitek@mail.ru.

**Zakharov Gennady Aleksandrovich** — senior laboratory assistant.

Pavlov Institute of Physiology, RAS, Lab. of neurogenetics. Saint-Petersburg, 199034 Makarova emb., 6, Russia. E-mail: Gennadiy.Zakharov@gmail.com.

**Popov Andrey Vladimirovich** — Head of the laboratory.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Lab. of Neuroethology of Insects. 194223, Saint-Petersburg, pr. Torez 44, Russia. E-mail: office@iephb.ru.

**Savvateeva-Popova Elena Vladimirovna** — senior laboratory assistant.

Pavlov Institute of Physiology, RAS, Lab. of neurogenetics. Saint-Petersburg, 199034 Makarova emb., 6, Russia. E-mail: esavvateeva@mail.ru.