

Влияние изменения экспрессии гена *limk1* в дофаминергических, серотонинергических и *fruitless* нейронах на обучение и забывание

Заломаева Е.С.^{1, 2*}, Егозова Е.С.¹, Медведева А.В.², Журавлёв А.В.²,
Никитина Е.А.^{1, 2}

¹ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
Санкт-Петербург, Россия

² Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

* Zalomaeva.E@yandex.ru

Ключевые слова: *limk1*; *Drosophila melanogaster*; память; обучение; забывание

Мотивация и цель: В настоящее время одной из актуальных проблем современной нейробиологии является понимание этиологии и прогрессирования различных нейродегенеративных заболеваний. Это группа в основном медленно прогрессирующих заболеваний нервной системы, характеризующихся стремительной гибелью нейронов. Среди наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний выделяют болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и др. Данные заболевания могут быть результатом сложного взаимодействия неблагоприятных внешних факторов, а также индивидуальных особенностей генома, предрасполагающих к развитию болезни. На сегодняшний день не существует лекарств и методов лечения, которые бы смогли остановить развитие патологии. Даже поддержание пациента на поздних стадиях заболевания в ясном состоянии сознания представляется практически невозможным. Поэтому современная наука стремится к решению вопроса о причинах возникновения и прогрессирования данных заболеваний, чтобы в перспективе излечивать их еще на ранних стадиях или предупреждать их возникновение. Для лучшего понимания патогенеза нейродегенеративных заболеваний необходимо изучить основу механизмов и процессов памяти, таких как обучение и забывание [1]. Но поскольку сохранение памяти является результатом обоих процессов – обучения и забывания, возникает вопрос: как понять, что в действительности является причиной «когнитивной патологии» – дефект обучения и консолидации или же дефектность активного врожденного механизма забывания. Активное забывание регулируется сигнальным каскадом ремоделирования актина, ключевой фермент которого LIMK1 [2]. Изменения экспрессии гена *limk1* могут приводить к нейрокогнитивным патологиям. Цель исследования – изучение роли гена *limk1* в процессах обучения и забывания у *Drosophila melanogaster*.

Методы и алгоритмы: Исследование проводили на самцах линий дрозофилы с нейроспецифическим подавлением и активацией гена *limk1* в нейронах *fruitless*, а также в дофаминергических и серотонинергических нейронах. В качестве контроля использовали линию без изменения экспрессии гена *limk1*. Для изменения экспрессии применяли систему скрещивания Gal4-UAS. Для оценки способности к обучению и формированию памяти использовали методику условно-рефлекторного подавления ухаживания. Пятисуточного девственного

самца помещали в специальную камеру вместе с оплодотворенной самкой линии дикого типа *CantonS* на 30 минут. Самцов тестировали через разные интервалы времени после тренировки. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения. За поведением обученных и наивных самцов наблюдали в течение 300 секунд, фиксируя в специальной программе время начала и окончания отдельных элементов [3]. Элементы могли быть связаны с ухаживанием (ориентация, вибрация крыла, постукивание, лизание, попытка копуляции) или не связаны с ним (активность, прининг, покой). Для оценки эффективности обучения вычисляли индекс обучения (ИО) по следующей формуле:

$$\text{ИО} = \left[\frac{\text{ИУ}_\text{н} - \text{ИУ}_\text{т}}{\text{ИУ}_\text{н}} \right] \times 100\% = \left(1 - \frac{\text{ИУ}_\text{т}}{\text{ИУ}_\text{н}} \right) \times 100\%,$$

где ИО – индекс обучения; ИУ_н – средний индекс ухаживания для самцов, не имеющих опыта полового поведения; ИУ_т – средний индекс ухаживания для обученных самцов.

Для оценки активности процессов забывания провели анализ скорости снижения ИО на коротких временных интервалах (0, 15, 30, 60 минут после тренировки) и спустя 24 часа, когда ИО может оставаться высоким при нарушении активного забывания. В каждой группе тестировали по 20 пар мух. Для статистической обработки данных использовали двусторонний тест рандомизации ($p \leq 0.05$).

Результаты: При анализе ИО линий с изменением экспрессии гена *limk1* в нейронах *fruitless* выявили, что мухи контрольной линии оказались способны сохранять память в течение 15 минут. Подавление *limk1* в нейронах *fruitless* восстанавливает память на интервале 30–60 минут, таким образом снижая процесс забывания. У линий с активацией *limk1* в нейронах *fruitless* в большинстве временных точек значения ИО были низкими, а спустя 60 минут после тренировки ИО достоверно отличался от линии с подавлением *limk1*. Спустя 24 часа после тренировки ИО всех трех линий имели схожие значения. У контрольной линии ИО спустя 24 часа был достоверно ниже, чем сразу после тренировки, а у линии с активацией *limk1* – достоверно ниже, чем спустя 15 минут после тренировки.

При анализе ИО линий с изменением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах выявили, что контрольная линия проявляет способность к обучению и сохранению памяти вплоть до 30 минут. При этом спустя 24 часа память у данной линии резко нарушена, и ИО принимает отрицательное значение. Подавление *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах снижает ИО, которые статистически не отличаются от нуля уже сразу после тренировки. Мухи линии с активацией *limk1* в дофаминергических и серотонинергических нейронах способны к обучению, однако спустя 24 часа после тренировки ИО также принял отрицательное значение. Кривые забывания у мух всех трех линий сходны: на протяжении 60 минут ИО сохраняется на относительно постоянном уровне, а через 24 часа после тренировки приобретает отрицательные значения.

Выводы: Таким образом, полученные данные говорят о вовлеченности гена *limk1* в процессы обучения и забывания. При этом характер влияния нейроспецифического изменения экспрессии гена *limk1* на динамику ИО определяется конкретным типом нейронов. Полученные результаты открывают перспективы дальнейших исследований с целью выявления путей целенаправленного

терапевтического воздействия на белки и гены, вовлеченные в развитие нейродегенерации.

Финансирование: Исследование поддержано средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411629-7-3.1.4).

The effect of changes *limk1* gene expression in dopaminergic, serotonergic and fruitless neurons on learning and forgetting

Zalomaeva E.S.^{1, 2*}, Egozova E.S.¹, Medvedeva A.V.², Zhuravlev A.V.², Nikitina E.A.^{1, 2}

¹ Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, Russia

² Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia

* Zalomaeva.E@yandex.ru

Key words: *limk1*; *Drosophila melanogaster*; memory; learning; forgetting

Motivation and Aim: Nowadays one of the topical problems of neurobiology is the research of the etiology and progression of different neurodegenerative diseases. This is a group of diseases of the nervous system that are characterized by rapid death of neurons and slow progression. The most common neurodegenerative diseases are Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease. The causes of these disorders may be a complex interaction of unfavorable external factors, as well as individual features of the genome predisposing to the development of the disease. Today there are no medications or treatments which can stop the development of the pathology. Even maintaining a patient in the later stages of the disease in a clear state of consciousness seems almost impossible. Therefore modern science tries to find the causes of the onset and progression of these diseases. In perspective, it will help to cure these diseases at an early stage or to prevent their onset. To better understand the pathogenesis of neurodegenerative diseases, it is necessary to study the underlying mechanisms and processes of memory, such as learning and forgetting [1]. But since the preservation of memory is the result of both processes – learning and forgetting – there is a question: how to understand what is the cause of “cognitive pathology” – a defect in learning and consolidation or a defect in the active innate mechanism of forgetting. Active forgetting is regulated by the actin remodeling signaling cascade, the key enzyme is LIMK1 [2]. Changes in the expression of the *limk1* gene can lead to neurocognitive pathologies. The aim of the research was to study the role of the *limk1* gene in the processes of learning and forgetting in *Drosophila melanogaster*.

Methods and Algorithms: We conducted a study on male *Drosophila* lines with neurospecific suppression and activation of the *limk1* gene in fruitless neurons, as well as in dopaminergic and serotonergic neurons. The control line was used without changing the expression of the *limk1* gene. The Gal4-UAS crossing system was used to change the expression. Conditioned courtship suppression paradigm was used to assess learning ability and memory formation. A 5-day-old virgin male was placed in a special box together with a fertilized wild-type female for 30 minutes. The males were tested at different time intervals after training. Males with no experience of sexual behavior were used as controls. The behavior of trained and naive males was observed for 300 seconds,

recording the start and end times of individual elements in a special program [3]. The elements could be related to courtship (orientation, wing vibration, tapping, licking, attempt at copulation), or unrelated to it (activity, pruning, rest). To assess the effectiveness of training the learning index is calculated. Formula of learning index:

$$LI = \left[\frac{CI_n - CI_T}{CI_n} \right] \times 100\% = \left(1 - \frac{CI_T}{CI_n} \right) \times 100\%,$$

where LI – is the learning index; CI_n – is the middle Courtship index for control males; CI_T – is the middle Courtship index for males after training.

To assess the activity of the forgetting processes, an analysis of the rate of decrease in LI was performed at short time intervals (0, 15, 30, 60 minutes after training) and 24 hours later, when LI may remain high with a violation of active forgetting. 20 pairs of flies were tested in each group. A two-way randomization test ($p \leq 0.05$) was used for statistical data processing.

Results: When analyzing LI stock with a change in the expression of the *limk1* gene in fruitless neurons, it was revealed that flies of the control stock were able to retain memory for 15 minutes. Suppression of *limk1* in fruitless neurons restores memory in the range of 30–60 minutes, thus reducing the process of forgetting. In the *limk1* activation stock in fruitless neurons, LI values were low at most points, and 60 minutes after training, LI significantly differed from the stock with *limk1* suppression. 24 hours after training, the LI of all three stocks have similar values. The control stock has significantly lower LI after 24 hours than immediately after training, and the stock with *limk1* activation has significantly lower LI than 15 minutes after training.

When analyzing LI stocks with changes in the expression of the *limk1* gene in dopaminergic and serotonergic neurons, it was revealed that the control stock showed the ability to learn and retain memory up to 30 minutes. At the same time, 24 hours later, the memory of this stock is sharply disrupted, and LI has taken a negative value. Suppression of *limk1* in dopaminergic and serotonergic neurons reduces LI, which statistically do not differ from zero immediately after exercise. A stock with *limk1* activation in dopaminergic and serotonergic neurons showed the ability to learn, but 24 hours after training, LI also took a negative value. The forgetting curves in flies of all three stocks show a similar tendency. For 60 minutes, the LI remains at a relatively constant level, and 24 hours after training it acquires negative values.

Conclusion: Thus, the data obtained indicate the unconditional involvement of the *limk1* gene in the processes of learning and forgetting. At the same time, the nature of the effect of a neurospecific change in the *limk1* gene on the dynamics of LI is determined by a specific type of neurons. The results obtained require further research in order to identify ways of targeted therapeutic effects on proteins and genes involved in the development of neurodegeneration.

Funding: The study is supported by the State funding allocated to the Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences (No. 1021062411629-7-3.1.4).

Список литературы/References

1. Medina C., de la Fuente V., Dieck T.S. et al. LIMK, Cofilin 1 and actin dynamics involvement in fear memory processing. *Neurobiol Learn Mem.* 2020;173:107275. doi 10.1016/j.nlm.2020.107275
2. Davis R.L., Zhong Y. The biology of forgetting – a perspective. *Neuron.* 2017;95(3):490-503. doi 10.1016/j.neuron.2017.05.039
3. Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V. *Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory. *Learn Mem.* 1999;6(1):1-20