

# №9 1999 год НЕЙРОГЕНЕТИКА ДРОЗОФИЛЫ И ПРОБЛЕМЫ НЕЙРОБИОЛОГИИ

Функциональная организация мозга и его работа по обеспечению адекватного адаптивного поведения в течение многих столетий является и остается интригующей «вещью в себе». Это положение не удивительно, если учесть небыстрый прогресс в «ползучем эмпиризме» анализа мозга и его функций.

Реализуемый сегодня комплексный подход к решению конкретных проблем нейробиологии – чрезвычайно сложной и разветвленной области современной биологии, объединяющей нейроанатомию и ее клеточные аспекты, нейрохимию, нейрофизиологию, нейрогенетику и т.д., – стратегически верен, но требует многократного умножения интеллектуальных и материальных ресурсов для достижения позитивных результатов.

Механизмы обучения, памяти, реализации сознания, в том числе их интегративная клеточная, молекулярная и генетическая детерминация, являются острейшими вопросами современной нейробиологии, хотя не более острыми, чем синтез этих и других механизмов в актах мышления, например. Нейрогенетика решает свою часть указанных сложных вопросов, имея целью выявить генетическую компоненту разнообразных форм высшей нервной деятельности. При этом проблема взаимодействия нейрогенов, равно как проблема «надгенных комплексов» еще ждут своих программ. Важную помощь в этом оказывают модельные объекты.

В последние годы обмен идеями в нейробиологии явно интенсифицировался. Если 2–3 десятка лет назад этого не было заметно, Джеймс Уотсон даже полагал, что нейробиологией в XX веке заниматься просто рано (Уотсон, 1969), то в конце столетия ситуация начинает несколько меняться. В частности, патронаж Колд Спринг Харборской лаборатории в организации достаточно представительных и многочисленных конференций («Learning & Memory» [1994, 1999 гг.], «Neurobiology of *Drosophila*» [1996, 1998, 1999 гг.]), ряд конференций в России (в частности, V East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology «Simple nervous systems» [Москва, 1997], Международный симпозиум «Механизмы адаптивного поведения», посвященный 150-летию со дня рождения Ивана Петровича Павлова и поддержанный ЮНЕСКО [Санкт-Петербург, 1999], и др.), организуемых Институтом физиологии им. И.П.Павлова РАН и другими отечественными учреждениями, в совокупности ясно показывают, что нейробиология постепенно привлекает все больше и больше энтузиастов.

Действительно, модели *C.elegans*, *Aplysia*, *Drosophila* и др. позволили в известных случаях «физиологически» или «генетически» рассеять некоторые частные элементарные нейрофункции, связанные с синаптической передачей сигнала, отдельными элементами процесса обучения, консолидации памяти, контроля регуляции других сложных физиологических функций. И хотя успехи в интеграции элементарных актов подобного рода еще весьма проблематичны, частные аспекты указанных сложных явлений, несомненно, обогащаются значимыми фактами, цена которых, бесспорно, высока.

Нервная система *Drosophila* содержит более 100 тыс. нервных клеток, поэтому структурные и поведенческие свойства нервной системы мушки приближают ее к позвоночным (в сравнении с «червивой» или «улиточной»). *C.elegans*, по-видимому, будет наиболее полезен в качестве модели анализа генетической детерминации простейших рефлексов, равно как *Aplysia* оказалась необыкновенно удобной моделью выявления молекулярно-генетической детерминации нейронных связей. Действительно, нейроэндокринная система улитки помогла вскрыть клеточные и молекулярные механизмы межнейронных отношений, поскольку имеет относительно небольшое число и крупный размер структурных компонентов нейронов. С помощью *Aplysia* были выявлены гены, ответственные за синтез нейропептидов различного назначения, в том числе классических нейротрансмиттеров, связанных с высшими формами поведения.

В генетическом контроле регуляции нейральных функций, как известно, наибольшую ценность несут два экспериментальных подхода – селекционный и мутационный (Кайданов, 1979; Кайданов и др., 1997). Активная работа отечественных нейробиологов в указанных направлениях нейрогенетики до известных событий «перестройки» позволила экспериментаторам сделать некоторые важные заделы в указанных областях. В частности, в содружестве с ленинградскими нейрогенетиками авторам этой публикации также довелось прикоснуться к «нейробиологической интриге» с использованием обоих подходов и с привлечением *Drosophila melanogaster* в качестве экспериментальной модели.

Е.В.Савватеевой с соавторами в X-хромосоме были индуцированы нейробиологические мутации и созданы температурочувствительные линии дрозофил, изменения метаболизма циклического аденозин-монофосфата в которых коррелировали с модуляцией индекса обучения избегать запахов, ассоциирующийся с электрошоком (Savvateeva et al., 1985). Поскольку нельзя было исключить в этих линиях вовлечения в процесс модуляции обучения протеинкиназы A и/или субстратов цАМФ-зависимого фосфорилирования, мы изучили этот и смежные вопросы, развив микрометоды оценки паттерна полипептидов и их фосфорилирования в экстрактах головного мозга дрозофил линий *ts155*, *ts398*, *ts622*, *ts66*, *ts980*, в том числе аллелей гена *agnostic* с различной способностью к обучению (Karakin et al., 1987).

Сравнение содержания 60 нейробелков после их фракционирования в градиентном ДСН ПААГ ЭФ при перmissive и рестриктивных температурах не выявило различий между «глупыми» и «гениальными» мухами указанных линий. Изучение антигенного состава их головного мозга с использованием антител кролика к гомогенатам головы мух указанных линий и высокоразрешающего метода перекрестного иммуоэлектрофореза, выявляющего в экстрактах более 30 индивидуальных антигенных фракций, показало идентичность антигенов. С ожидаемым удовлетворением была также обнаружена высокая степень сходства нейропаттерна белков головного мозга дрозофилы и мыши.

Мы также исследовали содержание трех форм тирозин-протеинкиназы *c-src*-семейства и не обнаружили существенных различий в их содержании у мух изученных линий при обеих температурах, когда использовали микрометод количественной иммуно-электродиффузии с привлечением моноспецифических антител к синтетическому 12-членному C-концевому пептиду продукта гена *pp62c-src Drosophila melanogaster*, приготовленных нами в содружестве с В.В.Самуковым и его коллегами.

Далее мы детально изучили фосфорилирование нейробелков центральной нервной системы, экстрагированных из головы индивидуальных самцов мутантов дрозофил, в условиях *in vivo* и *in vitro*. Мы показали, что массив нейробелков в этих условиях содержит не менее 15 мембран-связанных фосфо-форм, 5 из которых фосфорилировались цАМФ-зависимо. Изучение линий, в том числе различных аллелей гена *agnostic*, показало, что при перmissive температурах индекс обучения у последних прямо коррелировал с уровнем фосфорилирования одного из субстратов цАМФ-зависимого фосфорилирования, а именно нейробелка *pp20*, который и является в данном случае «прямым фосфокоррелятом» их гениальности. В экстрактах головного мозга мутантов, содержащихся при рестриктивных температурах, уровень фосфорилирования *pp20* также коррелировал с их способностью к обучению. Различий в уровнях данного вида посттрансляционной модификации нейробелков для других субстратов цАМФ-зависимого фосфорилирования нами обнаружено не было.

Таким образом, мы показали, что нейробелок *pp20*, являясь эндогенным субстратом цАМФ-зависимого фосфорилирования, является также членом семейства белков «комплекса обучения», уровень фосфорилирования которого определяет, по-видимому, наряду с многочисленными, пока еще не выявленными членами этого «комплекса», повышенную способность мух обучаться избегать привычный привлекательный запах, если он ассоциирован с электрошоком. По-видимому, нейросубстраты протеинкиназы А могут принимать участие в генерации интегративной функции мозга, связанной с процессом обучения, и мы это показали.

Мы использовали также и селекционный подход к анализу регуляции нейральных функций. С целью выявления комплекса генов центральной нервной системы, участвующих в регуляции двигательной активности у дрозофилы, нами проведен скрининг известных линий (Dagan et al., 1975; Кайданов, 1979; Каракин и др., 1989), а также собственная селекция взрослых мух на различия в уровне двигательной активности (Прасолова, Каракин, 1989). Обоснованием к проведению этой работы было соображение о том, что, во-первых, передача сигналов к мышечной локомоторной системе контролируется моторными центрами центральной нервной системы и, во-вторых, что природный полиморфизм по содержанию нейробелков в центральной нервной системе может детерминировать набор «природно зафиксированных» регуляций уровня двигательной активности без видимого разрушения мутациями каскада регуляции движений со стороны центральной нервной системы.

Прежде всего, мы обнаружили, что в известных линиях НА (Кайданов, 1979) селекция самцов дрозофилы на низкий уровень половой и двигательной активности коррелирует с возрастом содержания группы нейрополипептидов (*np1mm*, 6–10 kDa), а возвратная селекция сопровождается нормализацией содержания этой группы нейробелков наряду с возрастом содержания и/или фосфорилирования нейробелка *p87* (Каракин и др., 1989).

Мы провели также специальную селекцию мух из двух географических изолятов (Белоруссия и Узбекистан) на различия в уровне двигательной активности с параллельным анализом паттерна нейрополипептидов центральной нервной системы в составе экстрактов головного мозга и выделили уже после 2–3 генераций 5 линий мух с низким уровнем двигательной активности, которая не менялась далее в течение 11–16 поколений. Интересно отметить, что даже в исходных популяциях особи с пониженным уровнем двигательной активности характеризовались повышенным содержанием нейробелка *p87* по сравнению с активными из тех же популяций. Селекция на понижение уровня двигательной активности мушек привела также к падению содержания нейробелков *p75* и *p47*, однако в более поздних поколениях отбора ( $F_6 - F_9$ ), чем те, на которых происходит стабилизация уровня двигательной активности ( $F_2 - F_3$ , как уже упоминалось выше). Вариабельность содержания *p47*, *p75* и *p87* была также обнаружена в линиях D.Dagan с отклонениями в характере двигательной активности и линиях Н.Г.Камышева, любезно предоставленных нам из его коллекции.

Таким образом, селекция дрозофил из природных популяций Белоруссии и Узбекистана позволила вскрыть модификации в регуляции синтеза различных, но часто перекрывающихся нейробелков центральной нервной системы, связанных с селекцией на уровень двигательной активности. Можно полагать, что в центральной нервной системе дрозофил активен комплекс нейрогенов (гены нейробелков *p87*, *p75*, *p47*), функция продуктов которых связана с регуляцией двигательной активности. Если предположить, что «двигательный нейрополиген цнс» обширен, то обнаруженный нами комплекс является лишь его частью, хотя в разных линиях мы выявили перекрывающиеся фенотипы (в особенности это относится к вовлеченности в регуляцию движения нейробелка *p87*). Совершенно частным образом была также установлена потенциальная физиологическая функция нейробелков *p87*, *p75* и *p47*, что имеет самостоятельное значение.

Конечно, дрозофила, наряду с улиткой и нематодой, является наиболее «продвинутой» объектом нейробиологии, в частности, в отдельных исследовательских аспектах генетического анализа различных признаков поведения, хотя в генетической организации сложных поведенческих реакций многое остается неясным. Из полученных нами данных, кратко представленных в статье, становится ясно, что и мутационный и селекционный подходы к анализу отдельных элементов таких реакций вполне эффективны. Более того, совокупность известных результатов позволяет утверждать, что сочетание подходов может вскрыть как структурные, так и регуляторные элементы генетической детерминации поведенческих реакций, то есть понять модификации и взаимодействие нейрогенов.

При изучении цАМФ-мутаций нами вскрыта возможная роль обратимой посттрансляционной модификации субстратов цАМФ-зависимого фосфорилирования в процессах обучения и памяти, привязанная к конкретному гену *agnostic*.

В случае коррелятивного анализа «регуляция движения/содержание нейробелков» на основании нейробиохимического картирования центральной нервной системы у мух селективных линий с изменениями в регуляторных нейрогенах (а возможно, иных факторах модификации уровня экспрессии «нейрогенов движения») обозначены некоторые гены – члены «двигательного нейрополигена». Детальное исследование этой «обоймы» с помощью экспрессирующих «кДНК» библиотек, несомненно, представляет перспективный интерес и методически подготовлено, поскольку нами получены антитела к *p87*, *p75* и другим нейробелкам дрозофилы. С помощью этих антител возможно выявление «гистологических коррелятов движения» в ЦНС и картирование нейральных компартов, связанных с функцией обнаруженных нами «нейробелков регуляции движения».

Нельзя исключить их эволюционной консервативности, поскольку *p87* и *p75* выявлены не только в мозге быка, но также у крыс (Zhao et al., 1992), мышей и человека (Harlan et al., 1991; Stumpo et al., 1998).

Представленные данные отражают не только интересы авторов, но также часть фронта работ, проводимых современной нейрогенетикой. В обозримом будущем направление её развития, связанное с выявлением генокомплексов, «обслуживающих» конкретные нейрпроцессы, по-видимому, завершится созданием «каталога генов нейральных функций». На очереди встанут задачи оценки генных взаимодействий, а также задачи расширения концептуальных рамок аналитических и утилитарных аспектов нейробиологии высших животных.

#### Литература

1. Кайданов Л.З. Анализ генетических последствий отбора и инбридинга у *Drosophila melanogaster* // Журн. Общ. Биол. – 1979. – Т. 40. – С. 834-850.
2. Кайданов Л.З., Мыльников С.В., Галкин А.П., Иовлева О.В., Кузнецова О.В., Зимина Н.В. Генетические эффекты дестабилизирующего отбора при селекции по адаптивно важным признакам в линиях *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1997. – Т. 33, N 8. – С. 1102-1109.
3. Каракин Е.И., Прасолова Н.В., Кайданов Л.З., Нейробелки *p87* и *nplmm* *Drosophila melanogaster* дифференциально характеризуют самцов инбредных линий, различающихся по уровню половой и двигательной активности // Доклады АН СССР. – 1989. – Т. 307. – С. 1246-1249.
4. Прасолова Н.В., Каракин Е.И. Селекция на низкую двигательную активность у *Drosophila melanogaster* изменяет регуляцию синтеза нейробелков // Изв. СО АН СССР (сер. биол. наук). – 1989. – Вып. 2. – С. 25.
5. Уотсон Дж. Двойная спираль – М.: Мир, 1969. – 152 с.
6. Dagan D., Kaplan W.D., Ikeda K. Analysis of single gene sex linked behavioral mutants in *Drosophila melanogaster* // Adv. Behav. Biol. – 1975. – Vol. 15. – P. 321-340.
7. Harlan D.M., Graff J.M., Stumpo D.J., Eddy R.L.Jr., Shows T.B., Boyle J.M., Blackshear P.J. The human myristoylated alaninerich C kinase substrate (MARCKS) gene (MACS). Analysis of its gene product, promoter, and chromosomal localization // J Biol. Chem. – 1991. – Vol. 26. – P. 14399-14405.
8. Karakin E.I. Prasolova N.V., Kaidanov L.S., Savvateeva E.V. Neuroproteins and their phosphorylated forms are involved in the learning in *ts3* «genial» agmutant males and in the sexual activity of LA males of *Drosophila melanogaster* selected for «quotimpotence» // 10th Europ. Drosophila Research Conf., Barcelona, Abstracts, 1987. – P. 69.
9. Savvateeva E.V., Pereslenny G.V., Granushina V.A. et al. Expression of adenylate cyclase and phosphodiesterase in development of temperature sensitive mutants with metabolism of cAMP in *Drosophila melanogaster* // Develop. genet. – 1985. – Vol. 5. – P. 157-172.
10. Stumpo D.J., Eddy R.L.Jr, Haley L.L., Sait S, Shows T.B., Lai W.S., Young W.S. 3rd, Speer M.C., Dehejia A., Polymeropoulos M., Blackshear P.J. Promoter sequence, expression, and fine chromosomal mapping of the human gene (MLP) encoding the MARCKS-like protein: identification of neighboring and linked polymorphic loci for MLP and MACS and use in the evaluation of human neural tube defects // Genomics. – 1998. – Vol. 49. – P. 253-264.
11. Zhao D., Hollenberg M.D., Severson D.L. Comparison of an endogenous protein kinase C substrate in rat aorta with rat brain MARCKS // Molecular and Cellular Biochemistry. – 1992. – Vol. 118, № 2. – P. 163-169.

*Е.И.Каракин*, д.б.н.

Институт цитологии и генетики СО РАН

*Н.В.Адоньева*, н.с.

Институт цитологии и генетики СО РАН

*Е.В.Савватеева-Полова*, д.б.н.

Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН

*Л.З.Кайданов*, д.б.н.,

Кафедра генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета