

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 575.22,577.21

ОСЛАБЛЕННОЕ МАГНИТНОЕ ПОЛЕ ЗЕМЛИ: ВЛИЯНИЕ
НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОМА,
ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ У *Dr. melanogaster*

© 2017 г. Е. А. Никитина^{1,2,*}, А. В. Медведева¹, М. С. Герасименко², В. С. Проников²,
С. В. Сурма¹, Б. Ф. Щеголев¹, Е. В. Савватеева-Попова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург

*e-mail: 21074@mail.ru

Поступила в редакцию 24.10.2016 г.

Принята в печать 21.12.2016 г.

Нейродегенеративные заболевания являются результатом сложного взаимодействия неблагоприятных внешних факторов и индивидуальных особенностей генома, предрасполагающих к развитию болезни. Удобным объектом для изучения связи между организацией генома и архитектурой хромосом, реализуемой в когнитивных нарушениях, является дрозофила. Приведены результаты комплексного анализа влияния ослабленного экранированием магнитного поля Земли на транскрипционную активность генома, способность к обучению и формированию среднесрочной памяти у *Dr. melanogaster*. При стрессорном воздействии наблюдалась зависимость модификации транскрипционной активности от структуры гена LIMK1 – ключевого фермента каскада ремоделирования актина. Выявлены нарушения среднесрочной памяти при действии слабого статического магнитного поля у линии дикого типа *Canton-S*. Напротив, у мутанта *agn⁶³* данное стрессорное воздействие приводит к восстановлению способности к обучению и формированию памяти.

Ключевые слова: дрозофила, слабое статическое магнитное поле, нейродегенеративные заболевания, обучение и память, ацетилирование гистонов.

DOI: 10.7868/S0044467717020101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой современной нейрофизиологии и медицины является изучение механизмов возникновения социально значимых болезней с когнитивными патологиями, в том числе нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), таких как болезнь Альцгеймера (БА), Паркинсона (БП), Хантингтона (БХ) и делеционно-дупликационных синдромов. Эти заболевания возникают преимущественно спорадически. Как при спорадических, так и семейных заболеваниях происходят изменения экспрессии большого числа генов, в первую очередь контролирующих функции актинового цитоскелета.

Спорадические НДЗ, такие, как БА, БП, БХ, спинальная мышечная атрофия (СМА), амиотрофический латеральный склероз

(АЛС), прионные болезни и делеционно-дупликационные синдромы, называемые многофакторными болезнями (МБ) [Баранов, 2009], характеризуются нарушениями на уровне сигнального каскада ремоделирования актина: рецепторы нейротрансмиттеров – малые ГТФазы Rho-семейства – LIM киназа 1 (LIMK1) – кофилин – актин. По этой причине все они получили название “болезни актинового цитоскелета” или “кофилинопатии” [Bamburg et al., 2010].

Это утверждение основано на том, что гиперактивация кофилина сопровождается образованием кофилин-актиновых комплексов, которые накапливаются в аксонах и дендритах нейронов, блокируя везикулярный транспорт, что является причиной атрофии нейритов [Stokin, Goldstein, 2006]. Атро-

фия нейритов на ранних стадиях деменции приводит к потере краткосрочной памяти [Maloney, Bamburg, 2007; Bamburg, Zheng, 2010]. Синаптическая дисфункция напрямую коррелирует с нарушениями когнитивных функций у пациентов с БА [Masliah, 2000] и у млекопитающих [Davis et al., 2011].

Ключевую роль в регуляции каскада ремоделирования актина играет фермент LIMK1. LIMK1 фосфорилирует кофилин, что препятствует деполимеризации актина и приводит к накоплению F-актина. LIMK1 – это многофункциональный белок, который участвует в регуляции клеточной подвижности, клеточного цикла, цитокинеза и клеточной морфологии. LIMK1 также регулирует рост нейритов, синаптическую стабильность, подвижность конуса роста, формирование аксонов путем модуляции динамики комплекса Гольджи и нейрональную дифференцировку [Rosso et al., 2004; Saito et al., 2013].

Важную роль играет LIMK1 во внутриядерной динамике актина, что существенно для образования комплексов ремоделирования хроматина [Karoo, Shen, 2014]. Также актин регулирует транскрипцию генов на уровне элонгации цепи в составе комплекса с гистонацетилтрансферазой (НАТ), преимущественно ацетилирующей гистон H3, что обеспечивает поддержание гена в активном состоянии [Sjölander et al., 2006]. Мишенью LIMK1 могут быть транскрипционные факторы CREB и Nurr1 [Scott, Olson, 2007].

Еще одним уровнем регуляции активности гена является соотношение ДНК и гистонов. Так, для “закрытой” конформации характерно наличие всех фракций гистонов – H1/H2A/H2B/H3/H4. “Открытая” транскрипционно активная конформация характеризуется наличием только двух гистонов H3/H4 [Swaminathan et al., 2005].

Согласно гипотезе “гистонового кода”, тип модификации гистонов определяет последующее изменение структуры хроматина, передающееся в ряду клеточных поколений [Turner, 2002]. Гистоны могут подвергаться различным модификациям – ацетилрованию, метилированию, фосфорилированию, убиквитинированию (присоединение к лизинным остаткам убиквитина с последующей деградацией меченого белка). Было показано, что ацетилирование гистона H4 по лизину в положениях 5, 8, 12 и 16, а также гистона H3 в 9, 14, 18, 23 и 27 положениях связано с

активацией хроматина [Eberharter, Becker, 2002]. Показателем транскрипционно активных локусов является также метилирование гистона H3 по лизину в 4, 36 и 79 положениях [SantosRosa et al., 2002; Zegerman et al., 2002]. Однако метилирование программирует и инактивацию хроматина. Отмечено, что ди- и триметилирование H3 гистона по лизину в 9 положении, диметилирование в 27, метилирование по лизину 35, а также триметилирование гистона H4 в 20 положении является маркером гетерохроматинового состояния [Kourmouli et al., 2004]. Суммируя вышеизложенное, отметим, что H3-K4Me2, H3-K4Me3, H3-K36Me2, H3-K79Me2 связано с гиперацетилированием и активацией генов, в то время как H3-K9Me2, H3-K9Me3, H3-K27Me2, H4-K20Me2 – с гипoaцетилированием и репрессией генетического материала.

Гистоновые белки организуют ДНК в составе нуклеосом, делая ее недоступной для РНК-полимеразы и, как следствие, неактивной. Ремоделирование хроматина посредством ингибиторов гистоновых деацетилаз (HDAC) восстанавливает дефекты памяти. Ковалентные модификации ДНК, такие как ДНК-метилирование и ацетилирование гистонов, регулируют формирование памяти [Landry et al., 2013]. Нейрон-специфическое ремоделирование хроматина является недостающим звеном, связывающим эпигенетические механизмы с процессами синаптической пластичности, памяти, формирования интеллектуальных расстройств, с развитием депрессивных и антидепрессивных реакций на стресс [Vogel-Ciernia, Wood, 2014; Григорьян, Гуляева, 2015].

МБ и распространенные случаи сердечно-сосудистых, раковых, инфекционных заболеваний являются результатом сложного взаимодействия неблагоприятных внешних факторов и индивидуальных особенностей генома, предрасполагающих к развитию болезни. Таким образом, новые и комплексные подходы к раскрытию механизмов этих заболеваний внесут вклад в развитие персонализированной и предиктивной медицины.

Среди факторов, провоцирующих возникновение подобных заболеваний, большое значение имеют различные стрессорные воздействия. Одним из наименее изученных стрессорных факторов, которые способны оказывать заметное воздействие на живые организмы, в том числе и человека, является магнитное поле низкой интенсивности. Ра-

нее считалось, что слабые магнитные поля безопасны для человека. Однако за последние годы накопился большой массив данных, показывающий потенциальную опасность таких полей. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) признала, что долговременное воздействие низкочастотного магнитного поля интенсивностью 300 нТл и более “обладает возможным канцерогенным эффектом по отношению к людям” [WHO, 2002]. Помимо канцерогенной опасности, слабое статическое магнитное поле (ССМП) оказывает влияние на работу многих систем организма. Были обнаружены эффекты воздействия ССМП на деятельность сердечно-сосудистой, эндокринной, иммунной и нервной систем [Холодов, Лебедева, 1992; Леднев и др., 2008; Cook et al., 2006].

Вопрос о связи между организацией генома и архитектурой хромосом, реализуемой в когнитивных нарушениях, требует поиска моделей, позволяющих одновременно исследовать все эти аспекты. Такую возможность дает дрозофила, мутантные линии которой можно использовать не только для моделирования НДЗ, но и для изучения на уровне поведения целого организма последствий событий в динамической пространственной организации ядра.

В этой связи задачей нашего исследования было изучение роли гена *limk1* в формировании процессов обучения и памяти, а также структурно-функциональной организации ядра при стрессорных воздействиях у мутантной линии *agn^{ts3} Drosophila melanogaster*.

МЕТОДИКА

Материал исследования

В качестве материала исследования были использованы следующие линии *Drosophila melanogaster*:

Canton-S (CS) – контрольная линия дикого типа.

agn^{ts3} – линия, несущая температурочувствительную (ts) мутацию по гену *limk1* (1–38.9), который кодирует ключевой фермент ремоделирования актина LIMK1. Получена и поддерживается на генетическом фоне линии *Canton-S*.

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 поодиночке в стаканчики со средой. В качестве объектов ухода для самцов анализируемых линий использовали оплодотворенных за сутки до опыта самок линии *Canton-S*. Обучение и тестирование проводили в экспериментальных камерах из оргстекла (диаметр – 15 мм, высота – 5 мм). Исследования проводили на взрослых мухах в возрасте 5 сут при температуре $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ в первой половине дня.

Экранирование геомагнитного поля

Для экранирования магнитного поля Земли совместно с ФГУ ЦНИИ КМ “Прометей” была изготовлена цилиндрическая камера, покрытая экранирующим материалом из аморфного магнитомягкого сплава АМАГ 172 [Кузнецов и др., 2006]. Конструкция съемной крышки цилиндра с аналогичным покрытием позволяет избежать появления “магнитных дыр” в экране. Коэффициент экранирования по постоянной составляющей магнитного поля равен 35. Используемое покрытие эффективно экранирует и переменные составляющие магнитного поля, при этом существенное возрастание коэффициента экранирования наблюдается с МГц диапазона. Для обеспечения однородности ослабленного магнитного поля внутри экранирующей камеры выбирали практически безградиентную зону, расположенную по оси цилиндрической камеры и имеющую диаметр не более 4 см. В этой зоне и помещали личинки дрозофилы. Величину индукции магнитного поля измеряли трехкомпонентным магнитометром НВ0302.1А (Россия) с диапазоном измерений 0.1–100 мкТл. Экранирование проводили на разных стадиях развития дрозофилы: а) на стадии имаго (ССМП); б) на стадии личинки 3 возраста (ССМП1). Экранирование проводили в течение 12 ч. Нахождение в экранирующей камере совпадало по времени с темновой фазой циркадного ритма у мух. После воздействия ССМП мух оставляли в течение 1 ч при температуре $+25^\circ\text{C}$ и нормальном уровне магнитного поля, а затем использовали в эксперименте. Во всех вариантах опыта применяли интактный контроль (без воздействия).

Оценка способности к обучению и формированию среднесрочной памяти самцов

Для оценки способности к обучению и формированию среднесрочной памяти ис-

пользовали метод условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ). При ухаживании самца за оплодотворенной самкой сочетаются два безусловных стимула — аттрактивный (стимулирующий ухаживание феромон — афродизиак) и аверсивный (подавляющий ухаживание феромон — антиафродизиак). Антиафродизиаком обладают только оплодотворенные самки и высвобождают его в ответ на ухаживание самца. В результате сочетания аттрактивный стимул становится аверсивным условным стимулом, что снижает его аттрактивные свойства. Степень аттрактивности или аверсивности стимула определяется по таким реакциям животного, как приближение к стимулу или удаление от него. Для выработки УРПУ (тренировки) пятисуточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру вместе с оплодотворенной пятисуточной самкой *Canton-S* на 30 мин. При оценке способности к обучению применяли немедленный тест после тренировки. Формирование среднесрочной памяти тестировали через 3 ч (180 мин) после тренировки. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения. Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 с, фиксируя время начала отдельных элементов ухаживания (ориентация и преследование, вибрация, лизание, попытка копуляции), а также время исполнения элементов, не связанных с ухаживанием (активность (побежка), прининг, покой). В каждой группе тестировали не менее 20 пар мух. 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:

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

где $ИУ_{\text{н}}$ и $ИУ_{\text{т}}$ — средние индексы ухаживания для независимых выборок самцов, не имеющих опыта полового поведения, и самцов, прошедших тренировку [Sokal, Rohlf, 1995; Kamyshev et al., 1999; Камышев и др., 1999].

Иммунофлуоресцентный анализ распределения ацетилованного по лизину 9/14 гистона H3 в клетках слюнных желез личинок дрозофилы

Для иммунофлуоресцентного изучения личиночных тканей производили выделение слюнных желез на стадии личинки 3 возраста в фосфатном буфере (PBS) на льду. Фиксировали в 4% растворе параформальдегида в PBS 20 мин. После отмывки фиксатора в PBS (3 раза — 1 мин и 3 раза — 5 мин) и PBT (PBS, 0.2% Tween 20, 0.2% Triton X-100; 3 раза — 1 мин и 3 раза — 5 мин) слюнные железы инкубировали в 10% блокировочной сыворотке (Normal donkey serum, Santa Cruz Biotechnology, USA) в PBT (pH 7.5) 1 ч при комнатной температуре. В работе использовались первичные антитела goat polyclonal IgG Ac-Histone H3 Antibody (Lys 9/14), Santa Cruz®; вторичные антитела donkey-anti-goat IgG-Rhodamine; Santa Cruz®. Инкубировали с первичным антителом в разведении 1 : 100 в 10% блокировочной сыворотке, приготовленной на PBS, 12 ч при +4°C. Для лучшей проницаемости первичного антитела в инкубационный раствор добавляли 1% раствор DMSO. Отмывали в растворе PBT 3 раза — 1 мин и 4 раза — 20 мин при комнатной температуре. Инкубировали с вторичным антителом в разведении 1 : 100 в 10% блокировочной сыворотке в PBT 4 ч в темноте при комнатной температуре. Отмывали в PBT 3 раза — 1 мин и 4 раза — 10 мин и в PBS 3 раза — 1 мин и 2 раза — 15 мин. Окраска ядер раствором DAPI (Roth, Германия) на PBS (pH 7.5) осуществлялась 40 мин при комнатной температуре. Отмывали в PBS 3 раза — 1 мин и 2 раза — 5 мин. Заключение в среду Vectashield (Vector Laboratories) для сохранения флуоресценции препараты анализировали при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SL (иммерсионный объектив 20×) (ЦКП “конфокальная микроскопия” ИФ РАН). Анализ и модификацию конфокальных изображений осуществляли с помощью программы Fiji. На каждую точку проанализировано по 10 особей.

Статистическая обработка

Для оценки способности к обучению и формированию памяти использовали рандомизационный анализ ($p < 0.05$). Программное обеспечение GraphPad InStat 3 и Statistica 6.0. Тест рандомизации основан на прямом вычислении вероятности отвергания нулевой

гипотезы методом Монте-Карло. Он имеет преимущества по сравнению с параметрическими методами, т.к. не зависит от предположений о нормальности распределения исследуемой переменной и равенстве дисперсий сравниваемых выборок; а также по сравнению с непараметрическими методами, т.к. последние основаны на сравнении рангов (огрубление), а данный тест использует точные числовые значения переменных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Способность к обучению и формированию среднесрочной памяти самцов дрозофилы

У исследуемых линий была изучена динамика условно-рефлекторного подавления ухаживания в интактном контроле и после воздействия ССМП на разных стадиях онтогенеза (рис. 1). У линии *Canton-S* в интактном контроле индекс обучения в течение 3 ч сохранялся на высоком уровне, выявленном сразу после тренировки, что свидетельствует о нормальном протекании процессов обучения и памяти. При действии ССМП как на стадии имаго, так и на стадии личинки 3 возраста наблюдали снижение активности ухаживания. Сразу после тренировки отмечено условно-рефлекторное подавление ухаживания. Однако через 3 ч ИО достоверно снижался, что позволяет говорить о нарушении процессов формирования среднесрочной памяти.

У мутанта *agn^{ts3}* в интактном контроле выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания не происходило — исследуемая линия неспособна к обучению, как было показано в наших предыдущих работах [Медведева и др., 2008]. После воздействия ССМП на стадии имаго после тренировки наблюдали высокий индекс обучения, сохранявшийся и через 3 ч, что свидетельствует о восстановлении процессов обучения и памяти после действия стрессорного фактора. После воздействия ССМП на стадии личинки 3 возраста ИО и сразу после тренировки, и через 3 ч достоверно не отличается от линии дикого типа *Canton-S*.

Таким образом, выявлен тормозящий эффект ССМП на деятельность нервной системы при действии на разных стадиях онтогенеза у линии дикого типа *Canton-S Drosophila melanogaster*. Напротив, у мутантной линии *agn^{ts3}* данное стрессорное воздействие на стадии имаго

приводит к восстановлению способности к обучению и формированию памяти.

Анализ модификации гистонов

При анализе интенсивности окрашивания ядер слюнных желез личинок дрозофилы антителами к ацетилованному по лизину 9/14 гистону H3 были выявлены как межлинейные различия, так и влияние ССМП на транскрипционную активность (рис. 2). В интактном контроле у мутанта *agn^{ts3}* показано резкое усиление свечения ядер, что свидетельствует о повышенной транскрипционной активности по сравнению с контрольной линией дикого типа. Под действием ССМП транскрипционная активность меняется разнонаправленно. У линии дикого типа *Canton-S* интенсивность свечения возрастает, у мутанта *agn^{ts3}* незначительно уменьшается.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Высокая проникающая способность магнитного поля Земли в биологические ткани позволяет отнести его к внешним факторам прямого действия, способным вызывать структурные изменения на любом иерархическом уровне организации биологических объектов и тем самым оказывать воздействие на весь организм в целом. По степени чувствительности различных систем организма к магнитному полю первое место занимает нервная система. Действие магнитного поля на нервную систему характеризуется изменением поведения организма, его условно-рефлекторной деятельности, физиологических процессов за счет стимуляции процессов торможения. Реакция организма на воздействие магнитного поля во многом зависит от исходного функционального состояния и в первую очередь от состояния нервной системы.

Нами показан тормозящий эффект ССМП на деятельность нервной системы на разных стадиях онтогенеза у линии дикого типа *Canton-S* [Савватеева-Попова и др., 2012]. Однако совершенно другой эффект ССМП выявлен для мутантной линии *agn^{ts3}*. У самцов этой мутантной линии в норме не происходит выработки УРПУ. Это является показателем того, что данная линия неспособна к обучению [Медведева и др., 2008]. В наших предыдущих работах показано, что стрессорное воздействие тепловым шоком оказывает на данного мутанта мобилизующее действие, что обеспе-

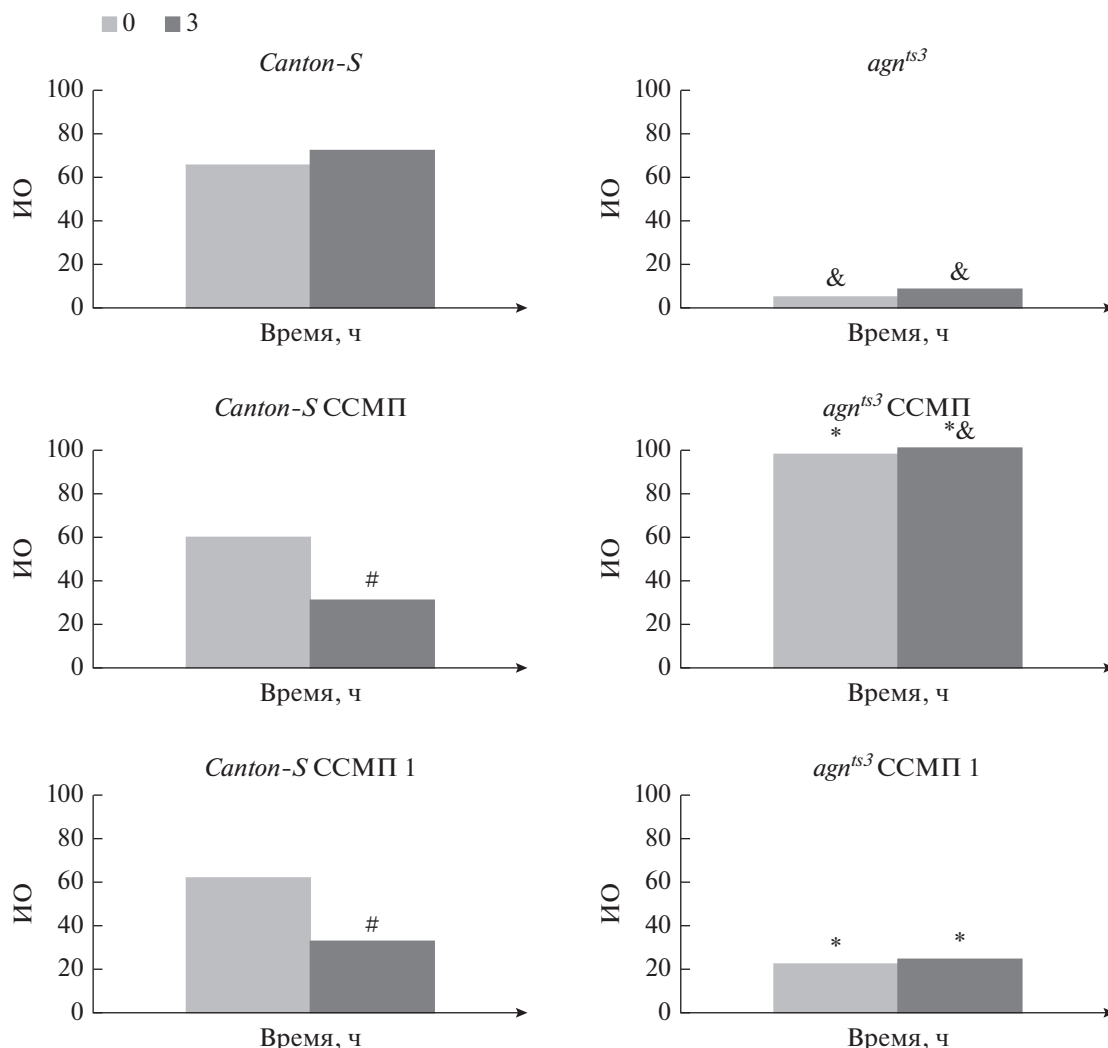


Рис. 1. Динамика условно-рефлекторного подавления ухаживания у линии дикого типа *Canton-S* и мутантной линии *agn^{ts3} Drosophila melanogaster* при действии ССМП. По оси абсцисс – время после завершения тренировки, часы; по оси ординат: ИО – индекс обучения, у.е. * – ИО после воздействия ССМП достоверно отличается от интактного контроля, # – ИО в отсроченном тесте достоверно ниже, чем в тесте сразу после тренировки, & – ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях (двусторонний тест рандомизации, $p < 0.05$).

Fig. 1. The dynamic of conditioned courtship suppression retention in wide type stock *Canton-S* and *agn^{ts3} Drosophila melanogaster* under the impact of a weak static magnetic field. X axis: time after training, hours; Y axis: LI (learning index), c.u. * – LI after weak static magnetic field is significantly different from the intact control; # – LI in delayed test is significantly lower than in test immediately after training; & – LI is significantly different from that in the wild type stock *CS* at the same conditions (two-sided randomization test, $p < 0.05$).

чивает эффективную адаптацию, нормальное обучение и формирование памяти [Никитина и др., 2013]. В связи с этим нами впервые было предпринято изучение влияния ССМП как стрессорного фактора на процессы обучения и памяти у мутантной линии *agn^{ts3}*. Согласно нашим данным, ССМП, как и тепловой шок, восстанавливает у *agn^{ts3}* способность к обучению и формированию памяти. Таким образом, стрессорные воздействия, как во

время формирования центрального комплекса, так и на стадии имаго для мутанта *agn^{ts3}* оказываются необходимыми и достаточными для восстановления способности к обучению и формированию памяти. В этой связи встает вопрос о механизмах данного феномена.

Мутация *agn^{ts3}* изначально была выделена как изменяющая функционирование систем вторичных посредников и приводящая к равному увеличению активности Ca^{2+} /калмо-

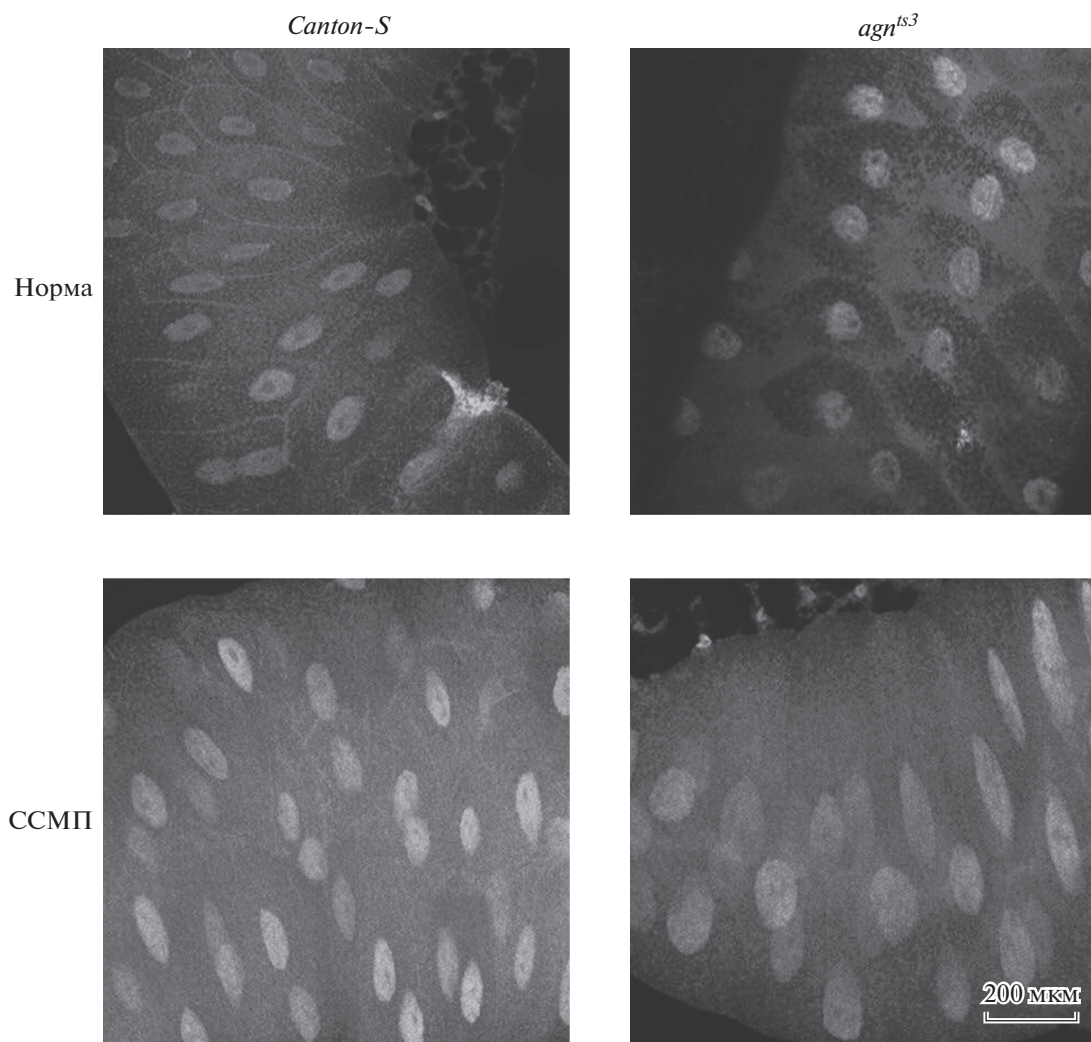


Рис. 2. Локализация антител к ацетилированному по лизину 9/14 гистону H3 в клетках слюнных желез личинок *Dr. melanogaster* у линии дикого типа *Canton-S* и мутантной линии *agn^{ts3}* до и после действия ССМП. Окраска Rhodamine-конъюгированным антителом к ацетилированному гистону H3 по лизину 9/14.

Fig. 2. Localization of antibodies to 9/14 histone of H3 acetylated on a lysine in larvae salivary glands in wide type stock *Canton-S* and *agn^{ts3}* mutant *Drosophila melanogaster* before and after the action of a weak static magnetic field. Coloring by the Rhodamine-conjugated antibody to 9/14 histone of H3 acetylated on a lysine.

дулин (КМ)-зависимой фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов (ФДЭ-I). На данный момент установлено, что локус *agnostic* расположен в пределах района 11В X-хромосомы дрозофилы, который содержит ген CG1848 для LIM-киназы 1, гомологичный у многих видов.

Линия *agn^{ts3}* характеризуется измененной структурой гена *limk1*. При ПЦР-картировании гена *limk1* была обнаружена инсерция 1.7 тпн (S-элемент семейства Tc1/mariner) на расстоянии около 1 тпн от 3'-UTR [Медведева и др., 2008]. Показано, что измененная структура гена *limk1* сказывается на активно-

сти его продукта и оказывает влияние на реализацию нейрональной пластичности на уровне поведения — обучение, поведение ухода и звукопродукцию [Каминская и др., 2011].

В норме у мутанта *agn^{ts3}* наблюдаются дефекты обучения и памяти, что сопровождается формированием белковых агрегатов [Медведева и др., 2008]. Белковые агрегаты в нейронах часто представлены в виде актин-кофилиновых комплексов [Minamide et al., 2000]. Известно, что при стрессорном воздействии кофилин становится гиперактивным [Munsie et al., 2011], то есть после стресса активность

LIMK1 снижается. По-видимому, именно это служит причиной восстановления способности к обучению у мутантов *agn^{ts3}*, коррелирующей с исчезновением амилоидоподобных включений после действия теплового шока [Медведева и др., 2008].

Гены сигнальных каскадов, в том числе *limk1*, регулируют экспрессию генов при формировании памятного следа и обучения не только посредством активации эффекторных молекул, но и воздействуя на генетический аппарат. Возможно, этим объясняется согласованность биохимических каскадов в процессах адаптации и в ответ на стрессорные воздействия, а также многофакторность изменений, сопровождающих эти процессы.

Известно, что актин является составной частью комплексов ремоделирования хромосомы и транскрипционных событий, а также участвует в долгосрочных модификациях организации хромосом [Visa, Percipalle, 2010]. Поэтому можно предположить и влияние мутационного нарушения гена для LIMK1 в глобальных событиях экспрессии генов, а следовательно, и в ацетилировании гистонов.

Мы предполагаем, что наличие вставки в первом интроне и S-транспозона в некодирующем 3'-конце гена для LIMK1 у мутанта *agn^{ts3}*, способствует появлению новых сайтов гомологии между отдаленными генами и их пространственному сближению. Действительно, частота формирования негомологичных контактов, в которые вступает ген LIMK1 у мутантной линии *agn^{ts3}* в три раза выше, чем у дикого типа. Изменение архитектуры ядра с неизбежностью повлечет за собой модификации функционирования участвующих в контактах генов. Транскрипционно активные гены формируют в ядре особые локусы – “транскрипционные фабрики”, в состав которых может входить до тысячи генов и белковых факторов, обеспечивающих транскрипцию.

Наличие вставки S-элемента в некодирующем 3'-конце гена для LIMK1 у мутанта *agn^{ts3}* приводит к появлению сайта гомологии и пространственному сближению с геном, влияющим на структуру хроматина – *JIL* [Никитина и др., 2013]. Продукт гена *JIL* – JIL-1-киназа – специфически локализуется в междисках политенных хромосом и осуществляет фосфорилирование гистона H3 по серину в положении 10, что способствует поддержанию деконденсированного состояния междиска и препятствует распространению гетерохроматина и

формированию негомологичных контактов. В отсутствие JIL-1 происходит гетерохроматинизация хромосомы, укорочение, слияние дисков, исчезновение междисков и увеличение числа эктопических контактов. Взаимодействуя с междисковыми белками, JIL-1 определяют распределение и активность других молекул, влияющих на организацию хромосомы и регулирующих формирование гетерохроматина и его распространение по хромосоме [Rath et al., 2006; Никитина и др., 2013].

По-видимому, все вышесказанное имеет отношение к таким междисковым белкам, как факторы ремоделирования нуклеосом и модифицирования гистонов, что выражается в таких модификациях, как H2A2, H2AZ, H3K14Ac, H3K9Ac–K14Ac, H3K4Me3 [Vatolina et al., 2011].

Таким образом, можно предположить, что изменение локализации гена JIL-1 у *agn^{ts3}*, а также и нескольких других генов, участвующих в организации хроматина, может сказаться на ацетилировании гистона H3.

При исследовании влияния ССМП на ацетилирование гистона H3 и, соответственно, на транскрипционную активность генов оказалось, что интенсивность окрашивания антителом к ацетилированному гистону H3 модифицировалась в обеих линиях. Известно, что после воздействия ССМП у *CS* наблюдается индукция белка жирового тела (*Fbp2*) и уменьшение уровня белка теплового шока БТШ27. У *agn^{ts3}* также наблюдается увеличение уровня *Fbp2*, однако при этом изменений уровня БТШ27 не происходит. Кроме того, воздействие ССМП на *agn^{ts3}* приводит к индукции алкогольдегидрогеназы (*Adh*) и *polo like* киназы (*Plk4/Sak*), уровень которых восстанавливается до дикого типа. У *CS* воздействие ССМП не влияет на изначально высокий уровень *Adh* [Захаров, 2012]. По крайней мере, 2 из перечисленных белков влияют на транскрипционную активность. Это БТШ27 и *Plk4/Sak*. Известно, что БТШ27 влияет на экспрессию нейротрофического тирозинкиназного рецептора *TrkA*, изменение функционирования которого связано с нейродегенеративными заболеваниями [Friedman et al., 2009]. Кроме того, имеются данные о непосредственной связи БТШ27 с процессом ацетилирования белков, так как белок гистондеацетилаза (HDAC6) является белком-клиентом БТШ27 [Eckel et al., 2012]. Таким образом, изменение экспрессии белка БТШ27 при экранирова-

нии магнитного поля может сказаться на степени ацетилирования гистонов.

Серин/треонин polo like киназа (Plk4/Sak) также вовлечена в процессы экспрессии генов, ответственных за осуществление клеточных делений [Darieva et al., 2006], в каскады стрессорного ответа через митоген-активированную киназу MAP [George et al., 2007]. Существуют данные о функциональной связи Plk4/Sak и HDAC6 [Li et al., 2005]. В связи с этим, наблюдаемое при экранировании магнитного поля Земли изменение экспрессии Plk4/Sak также может сказаться на модификации гистонов, а, соответственно, на уровне экспрессии генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наблюдаемое при воздействии ССМП изменение транскрипционной активности может быть связано со множественными нарушениями работы различных клеточных сигнальных каскадов. В пользу этого предположения свидетельствуют полученные нами данные, что мутационное изменение гена для LIMK1 — ключевого фермента ремоделирования актина — приводит к модификации свойств эухроматиновых областей и к повышенной чувствительности к данному стрессорному воздействию.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 15-04-07738).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баранов В.С. Геномика на пути к предиктивной медицине. *Acta Naturae*. 2009. 1(3): 77–88.
- Григорьян Г.А., Гуляева Н.В. Стресс-реактивность и стресс-устойчивость в патогенезе депрессивных расстройств: роль эпигенетических механизмов. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова*. 2015. 65(1): 19–32.
- Захаров Г.А. Молекулярно-генетические исследования роли компонентов сигнального каскада ремоделирования актина в генезисе поведенческих нарушений *Drosophila melanogaster*. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург. 2012. 17 с.
- Каминская А.Н., Никитина Е.А., Паялина Т.Л., Молотков Д.А., Захаров Г.А., Попов А.В., Савватеева-Попова Е.В. Влияние соотношения изоформ LIMK1 на поведение ухаживания *Drosophila melanogaster*: комплексный подход. *Экологическая генетика*. 2011. 9(4): 3–14.
- Камышев Н.Г., Илиади К.Г., Брагина Ю.В., Савватеева-Попова Е.В., Токмачева Е.В., Преа Т. Выявление мутантов дрозофилы, проявляющих дефекты памяти после выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 1999. 85(1): 84–92.
- Кузнецов П.А., Фармаковский Б.В., Аскинази А.Ю., Песков Т.В., Бибииков С.Б., Куликовский Э.И., Орлова Я.В. Композиционный материал для защиты от электромагнитного излучения. Патент РФ № 2324989. 2006.
- Леднев В.В., Белова Н.А., Ермаков А.М., Акимов Е.Б., Тоневицкий А.Г. Регуляция вариабельности сердечного ритма человека с помощью крайне слабых переменных магнитных полей. *Биофизика*. 2008. 53: 648–654.
- Медведева А.В., Молотков Д.А., Никитина Е.А., Попов А.А., Карагодин Д.А., Баричева Е.М., Савватеева-Попова Е.В. Системная регуляция генетических и цитогенетических процессов сигнальным каскадом ремоделирования актина: локус *agnostic* дрозофилы. *Генетика*. 2008. 44(6): 669–681.
- Никитина Е.А., Медведева А.В. Долгая Ю.Ф., Журавлев А.В., Савватеева-Попова Е.В. Вклад свободных от нуклеосом районов гена для LIMK1 в пространственную организацию ядра полиморфных вариантов локуса *agnostic* дрозофилы — модели геномных заболеваний человека. *Сб.: Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения*. 2013. 8(II): 977–982.
- Савватеева-Попова Е.В., Никитина Е.А., Курочкина М.С., Сурма С.В., Щеголев Б.Ф. Воздействие ослабленного магнитного поля Земли как фактор регуляции полового поведения *Drosophila melanogaster*. Труды VI Международного конгресса “Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине”. 2012. 58.
- Холодов Ю.А., Лебедева Н.Н. Реакции нервной системы на электромагнитные поля. М.: Наука, 1992. 136 с.
- Bamburg J.R., Bernstein B.W., Davis R.C., Flynn K.C., Goldsbury C., Jensen J.R., Maloney M.T., Marsden I.T., Minamide L.S., Pak C.W., Shaw A.E., Whiteman I., Wiggan O. ADF/Cofilin-actin rods in neurodegenerative diseases. *Curr. Alzheimer Res*. 2010. 7(3): 241–250.
- Bamburg J.R., Zheng J.Q. ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nat. Neurosci*. 2010. 13(10): 1208–1215.
- Cook C.M., Saucier D.M., Thomas A.W., Prato F.S. Exposure to ELF magnetic and ELF-modulated radiofrequency fields: the time course of physiological and cognitive effects observed in recent

- studies (2001–2005). *Bioelectromagnetics*. 2006. 27(8): 613–27.
- Darieva Z., Bulmer R., Pic-Taylor A., Doris K.S., Geymonat M., Sedgwick S.G., Morgan B.A., Sharrocks A.D.* Polo kinase controls cell-cycle-dependent transcription by targeting a coactivator protein. *Nature*. 2006. 23: 494–498.
- Davis R.C., Marsden I.T., Maloney M.T., Minamide L.S., Podlisny M., Selkoe D.J., Bamburg J.R.* Amyloid beta dimers/trimers potently induce cofilin-actin rods that are inhibited by maintaining cofilin-phosphorylation. *Mol. Neurodegener.* 2011. 6: 10.
- Eberhartner A., Becker P.B.* Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Rep.* 2002. 3: 224–229.
- Eckel B., Fasquelle L., Moulin M., Bouhallier F., Gonin V., Mellier G., Simon S., Kretz-Remy C., Arrigo A-P., Diaz-Latoud C.* Knock Down of Heat Shock Protein 27 (HspB1) Induces Degradation of Several Putative Client Proteins. *PLoS One*. 2012. 7(1): 297–319.
- Friedman M., Li S., Li X-J.* Activation of Gene Transcription by Heat Shock Protein 27 May Contribute to Its Neuronal Protection. *J. Biol. Chem.* 2009. 9: 27944–27951.
- George V.T., Brooks G., Humphrey T.C.* Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*. 2007. 18(10): 4168–4179.
- Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V.* *Drosophila* conditioned courtship: Two ways of testing memory. *Learn. Mem.* 1999. 6(1): 1–20.
- Kapoor P., Shen X.* Mechanisms of Nuclear Actin in Chromatin Remodeling Complexes. *Trends Cell Biol.* 2014. 24(4): 238–246.
- Kourmouli N., Jeppesen P., Mahadevhaiah S., Burgoyne P., Wu R., Gilbert D., Bongiorno S., Prantera G., Fanti L., Pimpinelli S., Shi W., Fundele R., Prim B.* Singh Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J. Cell Sci.* 2004. 117: 2491–2501.
- Landry C.D., Kandel E.R., Rajasethupathy P.* New mechanisms in memory storage: piRNAs and epigenetics. *Trends Neurosci.* 2013. 36(9): 535–542.
- Li J., Tan M., Li L., Pamarthy D., Lawrence T.S., Sun Y.* SAK, A New Polo-Like Kinase, Is Transcriptionally Repressed by p53 and Induces Apoptosis upon RNAi Silencing. *Neoplasia*. 2005. 7(4): 312–323.
- Maloney M.T., Bamburg J.R.* Cofilin-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and other amyloidopathies. *Mol. Neurobiol.* 2007. 35(1): 21–44.
- Masliah E.* The role of synaptic proteins in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000. 924: 68–75.
- Minamide L.S., Striegl A.M., Boyle J.A., Meberg P.J., Bamburg J.R.* Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat. Cell Biol.* 2000. 2: 628–636.
- Munsie L., Caron N., Atwal R.S., Marsden I., Wild E.J., Bamburg J.R., Tabrizi S.J., Truant R.* Mutant huntingtin causes defective actin remodeling during stress: defining a new role for transglutaminase 2 in neurodegenerative disease. *Hum. Mol. Genet.* 2011. 20(10): 1937–1951.
- Rath U., Ding Y., Deng H., Qi H., Bao X., Zhang W., Girton J., Johansen J., Johansen K.M.* The chromodomain protein, Chromator, interacts with JIL-1 kinase and regulates the structure of *Drosophila* polytene chromosomes. *J. Cell Science*. 2006. 119: 2332–2341.
- Rosso S., Bollati F., Bisbal M., Peretti D., Sumi T., Nakamura T., Quiroga S., Ferreira A., Cáceres A.* LIMK1 regulates goldgi dynamics, traffic of goldgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons. *Mol. Biol. Cell*. 2004. 15(7): 3433–3449.
- Saito A., Miyajima K., Akatsuka J., Kondo H., Mashiko T., Kiuchi T., Ohashi K., Mizuno K.* CaMKII β -mediated LIM-kinase activation plays a crucial role in BDNF-induced neuritogenesis. *Genes Cells*. 2013. 18(7): 533–543.
- SantosRosa H., Schneider R., Bannister A.J., Sherriff J., Bernstein B.E., Emre N.C.T., Schreiber S. L., Mellor J., Kouzarides T.* Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 2002. 419: 407–411.
- Scott R.W., Olson M.F.* LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J. Mol. Med.* 2007. 85: 555–568.
- Sjölander M., Bjork P., Soderberg E., Sabri N., Farrants A.-K., Visa N.* The growing pre-mRNA recruits actin and chromatin-modifying factors to transcriptionally active genes. *Genes Dev.* 2005. 19(16): 1871–1884.
- Sokal R.R., Rohlf F.J.* *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd ed. New York: W.H. Freeman, 1995. 887 p.
- Stokin G.B., Goldstein L.S.* Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2006. 75: 607–627.
- Swaminathan J., Baxter E., Corces V.* The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of *Drosophila* heterochromatin. *Genes & Develop.* 2005. 19: 65–76.
- Turner B.M.* Cellular memory and the histone code. *Cell*. 2002. 111: 285–291.
- Vatolina Yu.T., Boldyreva L.V., Demakova O.V., Demakov S.A., Kokoza E.B., Semeshin V.F., Babenko V.N., Goncharov F.P., Belyaeva E.S., Zhimulev I.F.* Identical Functional Organization of Nonpolytene and Polytene Chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2011. 6(10): 259–260.
- Visa N., Percipalle P.* Nuclear Functions of Actin. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 2010. 2(4): 620–634.

Vogel-Ciernia A., Wood M.A. Neuron-specific chromatin remodeling: A missing link in epigenetic mechanisms underlying synaptic plasticity, memory, and intellectual disability disorders. *Neuropharmacology*. 2014. 80: 18–27.

World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC. Non-ionizing radiation, Part 1: static and extremely low-frequency

(ELF) electric and magnetic fields, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2002. 80: 1–395.

Zegerman P., Canas B., Pappin D., Kouzarides T. Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J. Biol. Chem.* 2002. 277: 11621–11624.

Weakened Geomagnetic Field: Impact on Transcriptional Activity of the Genome, Learning and Memory Formation in *Dr. melanogaster*

**E. A. Nikitina^{a, b, #}, A. V. Medvedeva^a, M. S. Gerasimenko^b, V. S. Pronikov^b,
S. V. Surma^a, B. F. Shchegolev^a, and E. V. Savvateeva-Popova^a**

^a*Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg*

^b*Herzen State Pedagogical University, St. Petersburg*

[#]*E-mail: 21074@mail.ru*

Neurodegenerative diseases are caused by a complex interaction of unfavorable external factors and specific genome features that predispose to the development of a disease. *Drosophila* constitutes a convenient model for studying the link between genome organization and chromosome architecture observed in cognitive disorders. We analyzed the influence of weakened by shielding geomagnetic field on transcriptional activity of the genome, learning ability and medium-term memory formation in *Dr. melanogaster*. Under stress we observed the dependence of transcriptional activity modification on the structure of a gene LIMK1, the key enzyme of actin remodeling cascade. Disturbances of medium-term memory were observed under the impact of a weak static magnetic field in wild type stock *Canton-S*. On the contrary, in mutant *agn^{ts3}* this stress action results in the restoration of learning ability and memory formation.

Keywords: *Drosophila*, weak static magnetic field, neurodegenerative diseases, learning and memory, histone acetylation.