*РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И. М. СЕЧЕНОВА*

*RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY*
*(formerly I. M. Sechenov Physiological Journal)*
*99 · N 1 · 2013*

## *ФИЗИОЛОГИЯ ДВИГАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ*

# ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ГЕНЕРАЦИИ МОТОРНОГО ПАТТЕРНА РИТМИЧЕСКИХ ДВИЖЕНИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© *С. А. Федотов*, *Ю. В. Брагина*, *Н. Г. Беседина*, *Л. В. Даниленкова*, *Е. А. Камышева*, *Н. Г. Камышев*

Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН,
Россия, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6,
e-mail: serg900@yandex.ru

Для изучения молекулярно-клеточных механизмов генерации моторного паттерна ритмических движений ранее нами были отобраны гены-кандидаты, мутации которых вызывают нарушения в двигательной активности *Drosophila melanogaster.* В настоящем исследовании проведено тестирование локомоторного поведения линий дрозофилы со сниженной экспрессией 12 генов-кандидатов в нервной системе. Супрессия целевых генов осуществлялась посредством синтеза интерферирующей РНК через систему GAL4/UAS под управлением промоторов генов *elav*, *nrv2*, *appl* и *tsh* (драйверы). Было показано, что РНК-интерференция практически для всех генов-кандидатов сопровождается изменениями по одному или нескольким локомоторным параметрам. Характер выявленных отклонений, возникающих под управлением различных драйверов, позволил определить гены, чья активность в клетках нервной системы необходима для нормального функционирования центрального генератора моторного паттерна локомоторных актов.

*Ключевые слова*: локомоция, дрозофила, РНК-интерференция, центральные генераторы моторного паттерна.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 99. № 1. С. 120—130. 2013

*S. A. Fedotov*, *Yu. V. Bragina*, *N. G. Besedina*, *L. V. Danilenkova*, *E. A. Kamysheva*, *N. G. Kamyshev.* GENETIC DETERMINANTS OF GENERATING THE MOTOR PATTERN OF RHYTHMIC MOVEMENTS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034, Makarova Emb., 6, Russia, e-mail: serg900@yandex.ru.

To investigate molecular and cellular mechanisms of central pattern generators (CPG) functioning, we previously selected candidate genes mutations of which are accompanied with deviations in Drosophila melanogaster motor activity. In this research we tested locomotor parameters in lines with post transcriptional silencing of 12 candidate gene in *Drosophila* central nervous system. Silencing was provided by synthesis of interfering RNA by means of GAL4/UAS system under control of CNS-specific gene promoters (*elav*, *nrv2*, *appl*, *tsh*). It was found that RNA interference of most genes are accompanied with changes in one or several locomotor parameters. Pattern of revealed deviations under control of different promotors makes it possible to determine the genes that activity in nervous system is necessary for proper functioning of locomotor CPG.

*Key words:* locomotion, *Drosophila*, RNA interference, central pattern generator.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 99. N 1. P. 120—130. 2013

Формирование моторного выхода в нервной системе животных определяется регуляторными и запускающими импульсами со стороны сенсорных и интегративных структур, а также собственными свойствами мотонейронов и их взаимодействием [6]. При этом моторный выход на одиночное раздражение может быть в виде кратковременной вспышки активности (например, коленный рефлекс) либо в виде продолжительной ритмически организованной последовательности импульсов (например, взмахи крыльев у насекомых). Второй вид ответа связывают с наличием в нервной системе центральных генераторов моторного паттерна (ЦГМП), представленных одиночными пейсмейкерами либо группами нейронов, взаимодействие между которыми обеспечивает ритмический выход. Ритмическая активность пейсмейкеров определяется колебаниями проницаемости мембраны для ионов натрия, кальция, калия, однако молекулярно-клеточные механизмы этих колебаний изучены крайне недостаточно [4].

Ранее нами генетическими методами было определено более двух десятков генов-кандидатов, продукты которых предположительно участвуют в работе ЦГМП дрозофилы [2]. Мутации этих генов сопровождаются нарушениями в локомоторном поведении и песне ухаживания самца. В настоящем исследовании проведено тестирование двигательной активности линий дрозофилы со сниженной экспрессией 12 генов-кандидатов в нервной системе мух. Подавление экспрессии осуществлялось путем синтеза интерферирующих РНК через систему GAL4/UAS. Локализация РНК-интерференции в нервной системе обеспечивалась помещением активатора GAL4 под управление промоторами генов *elav*, *nrv2*, *appl* и *tsh*, которые экспрессируются исключительно или преимущественно в нервных структурах [8]. Было показано, что подавление экспрессии каждого из генов-кандидатов (за исключением *kermit*) в клетках нервной системы приводит к специфическим изменениям различных параметров локомоторной активности. Характер выявленных моторных отклонений с учетом паттерна экспрессии драйвера позволил определить возможные роли каждого гена-кандидата в процессах формирования и работы генераторов моторного паттерна. Из 12 исследованных генов-кандидатов особый интерес представляет ген *CG15630*, который экспрессируется преимущественно в нервной системе, где предположительно является компонентом клеточной поверхности нейронов, участвуя в ремоделировании цитоскелета клетки. Продукт гена CG15630 является обязательным компонентом нейрональных цепей, участвующих в реализации локомоторных актов, при этом функциональная значимость CG15630 определяется нервной структурой, в которой он экспрессируется.

## МЕТОДИКА

*Тестирование двигательной активности*. Мух разводили и содержали на стандартной изюмно-дрожжевой среде при 25 °C и 12-часовом световом дне. Регистрация локомоторной активности выполнялась по ранее описанной методике [2] одновременно для 20 особей с помощью двух веб-камер и программы *Drosophila tracks* (автор — Н. Г. Камышев), производящей определение координат каждой мухи с частотой 10 Гц, с последующей обработкой данных анализирующим модулем программы [1]. Статистический анализ параметров двигательной активности проводили тестом рандомизации [11].

*Система локального нокдауна генов-кандидатов*. Подавление экспрессии гена-кандидата в нервных клетках тестируемых линий осуществлялось интерферирующей РНК, синтезируемой в трансгенных мухах системой GAL4/UAS [10]. Мух с системой GAL4/UAS получали путем скрещивания двух трансгенных линий, одна из которых содержит ген транскрипционного активатора GAL4 (материнская линия), а другая — регуляторную по-

следовательность UAS. Связывание GAL4 с UAS включает транскрипцию трансгенного элемента, расположенного за UAS и кодирующего интерферирующую РНК (UAS/РНК-трансген). Тканеспецифичность интерференции достигалась постановкой гена активатора GAL4 под управление промоторами генов *elav*, *appl*, *nrv2*, *tsh*, экспрессирующихся преимущественно в нервной системе дрозофилы.

Трансгенные линии, несущие ген активатора GAL4, были получены из Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) на базе Indiana University (США) и имели следующие генотипы:

а) *w**; P{GAL4-elav.L}2/CyO;

б) P{Appl-GAL4. G1a}1, $y^1$ w*; $Mlf^{\Delta 10}$/CyO;

в) *w**; P{nrv2-GAL4.S}8 P{UAS-GFP.S65T}$eg^{T10}$;

г) $y^1$ $w^{1118}$; P{GawB}$tsh^{md621}$/CyO; P{UAS-y.C}MC1/TM2.

Линии, содержащие UAS/РНК-трансген и генетически идентичные им линии, лишенные UAS/РНК-трансгена и маркерного гена (контрольные родительские линии), были предоставлены The Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC) на базе Campus Science Support Facilities (Австрия). 9 линий с UAS/РНК-трансгеном имели генотип y $w^{1118}$; P{attP $y^+$ $w^{3`}$} и 3 линии (для генов *mesr4*, *Treh* и *jumu*) — генотип $w^{1118}$.

*Определение эффективности работы системы GAL4/UAS*. Эффективность работы системы GAL4/UAS оценивали по наличию и локализации флуоресценции белка green fluorescent protein (GFP) в эмбрионах дрозофилы на последних стадиях развития перед вылуплением личинки. В скрещиваниях с драйверными линиями (elav-GAL4, appl-GAL4, tsh-GAL4) была использована линия, содержащая трансген *GFP* под управлением UAS-последовательности. Линия была получена из BDSC и имела генотип *w**; P{10XUAS-IVS-GFP-WPRE}attP2. Яйца дрозофилы дехорионизировали [25], помещали на предметное стекло в 50%-ный раствор фосфатного буфера в глицерине и проводили анализ флуоресценции GFP с использованием люминесцентного микроскопа МикМед2 (FITC-фильтр). Фото эмбрионов сделаны при 20-кратном увеличении видеокамерой CX05 Baumer Optronic. В качестве контроля были использованы родительские линии.

Для драйверной линии nrv2-GAL4, в геноме которой уже присутствовал трансген UAS/*GFP*, эффективность системы GAL4/UAS дополнительно оценивали скрещиванием с линией, содержащей трансген бета-галактозидазы под управлением UAS (генотип $y^1$ $w^{1118}$; P{UAS-lacZ.Exel}2, BDSC). В потомстве от скрещивания 10 взрослых самцов получали белковый экстракт, который использовали для оценки эффективности GAL4/UAS по уровню активности бета-галактозидазы [22]. Активность определялась как оптическая плотность образца через 2 ч ферментативной реакции. Выравнивание концентрации общего белка в исследуемых образцах осуществляли с использованием метода Бредфорд.

*Определение уровня экспрессии генов-кандидатов*. Уровень экспрессии генов-кандидатов в тестируемых линиях оценивали методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием флуоресцентного красителя EvaGreen (Biotium, Inc.). РНК выделяли из 20—30 самцов дрозофилы [9]. Полученные образцы обрабатывали ДНКазой (Fermentas) и использовали для синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции по протоколу и с реактивами компании «СибЭнзим» (http://russia.sibenzyme.com). ПЦР с пробами кДНК проводили в термоциклере StepOnePlus (Applied Biosystems) с детекцией количества амплифицируемого продукта в режиме реального времени. В качестве внутреннего контроля использовали ген *RpL32*. Отрицательным контролем служил образец, для которого была проведена ложная реакция обратной транскрипции без транскриптазы. ПЦР осуществляли при следующих условиях: 95 °C (5 мин) Ч 1; [95 °C (30 с), 63 °C (30 с), 72 °C (60 с)] Ч 35. Были использованы праймеры:

**ген *CG15630*** — прямой (ATTCGTTGAGATTCTCGCAATGCG),
обратный (CGGCGATTTCCAATGGAGCT);

**ген *sps2*** — прямой (TGAGAAGGAACGCGACGTTGTG),
обратный (GCTGCGCGTTTGACGGTAGTATTAT);

**ген *RpL32*** — прямой (TATGCTAAGCTGTCGCACAAATGGC),
обратный (GTTCTGCATGAGCAGGACCTCCA).

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью свободно распространяемого программного продукта REST 2009 [18].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Двигательная активность линий с локальным нокдауном генов-кандидатов*. Проведено тестирование локомоторной активности линий дрозофилы со сниженной экспрессией генов-кандидатов в нервной системе. Всего проанализировано 12 генов: *jumu*, *Treh*, *mesr4*, *CG15630*, *sps2*, *Dgp-1*, *CG34460*, *CG6746*, *CG8708*, *cf2*, *ext2*, *kermit*. В каждой линии была осуществлена супрессия одного из генов при помощи интерферирующей РНК, синтезируемой под управлением одного из четырех промоторов генов, чья экспрессия максимальна в нервной системе (*elav*, *nrv2*, *appl* и *tsh*). Анализ двигательной активности проводили по трем основным параметрам: длительности побежки (с), частоте побежек (количество побежек за 100 с), скорости побежек (мм/с). Нокдаун каждого из анализируемых генов приводил к достоверным изменениям в двигательной активности по одному или нескольким параметрам (рис. 1). В качестве контроля брали потомство от скрещивания драйверной линии с соответствующей контрольной родительской линией (для генов *jumu*, *Treh* и *mesr4* — контрольная линия с генотипом $w^{1118}$, для остальных 9 генов — контрольная линия с генотипом $w^{1118}$; P{attP $y^+$ $w^{3'}$}). Изменения в большей степени затрагивали длительность и частоту побежек, в меньшей степени — их скорость.

Следует отметить очень малые значения частоты побежек в контроле, полученного в результате скрещивания драйверных линий с контрольной родительской линией $w^{1118}$; P{attP $y^+$ $w^{3'}$}. Возможно, следствием этого явилось то, что изменения частоты побежек в соответствующих 9 экспериментальных линиях (далее attp-линии) либо отсутствовали, либо происходили в сторону увеличения. В линии дикого типа Canton-S (CS) частота побежек имеет значение 5.3, а значения этого параметра в линиях P-инсерционных мутантов варьируют в диапазоне от 0.2 до 8.5 [2].

В attp-линиях наиболее информативным параметром оказалась длительность побежек. Изменения в длительности побежек выявлены при РНК-интерференции для 8 из 9 генов-кандидатов (за исключением *ext2*) под управлением одного или нескольких драйверов. При этом величина и направленность изменений существенно варьировали в зависимости от супрессируемого гена и используемого промотора.

В трех экспериментальных линиях, для которых родительская линия с UAS/РНК-трансгеном имела генотип $w^{1118}$ (далее w-линии), изменения затрагивали исключительно частоту побежек. Интересно, что в контроле для w-линий значения частоты побежек были более близки к значениям у дикого типа, нежели в контроле для attp-линий.

РНК-интерференция *ext2* под управлением промоторов *appl* и *tsh*, а также *cf2* под управлением *tsh* сопровождалась дефектами в морфологии крыла. Супрессия гена *mesr4* под управлением *tsh* имела летальный эффект.

*Экспрессия трансгенов GFP и LacZ через систему GAL4/UAS*. Работа системы GAL4/UAS была подтверждена в экспериментах с активацией экспрессии флуоресцентного белка GFP под управлением промоторов *elav*, *appl* и *tsh* (рис. 2) либо бета-галактозидазы под управлением промотора *nrv2* (рис. 3). Следует отметить, что картина экспрессии *GFP* существенно варьировала в зависимости от используемого промотора, но во всех случаях имела нервную локализацию. Для промоторов *elav* и *appl* флуоресценция обнаруживалась в мозге и брюшной цепочке, для *tsh* — преимущественно в брюшной цепочке.

*Количественная оценка экспрессии генов CG15630 и sps2*. Для *CG15630* и *sps2* выполнена количественная оценка уровня их экспрессии в линиях с РНК-интерференцией по этим генам, а также в линиях с мутациями (P-инсерции) этих генов. Выбор *CG15630* и *sps2* был обусловлен несколькими факторами. Во-первых, мутации в этих генах сопровождаются нарушениями по важному параметру ритмической активности — межимпульсный интервал в импульсной

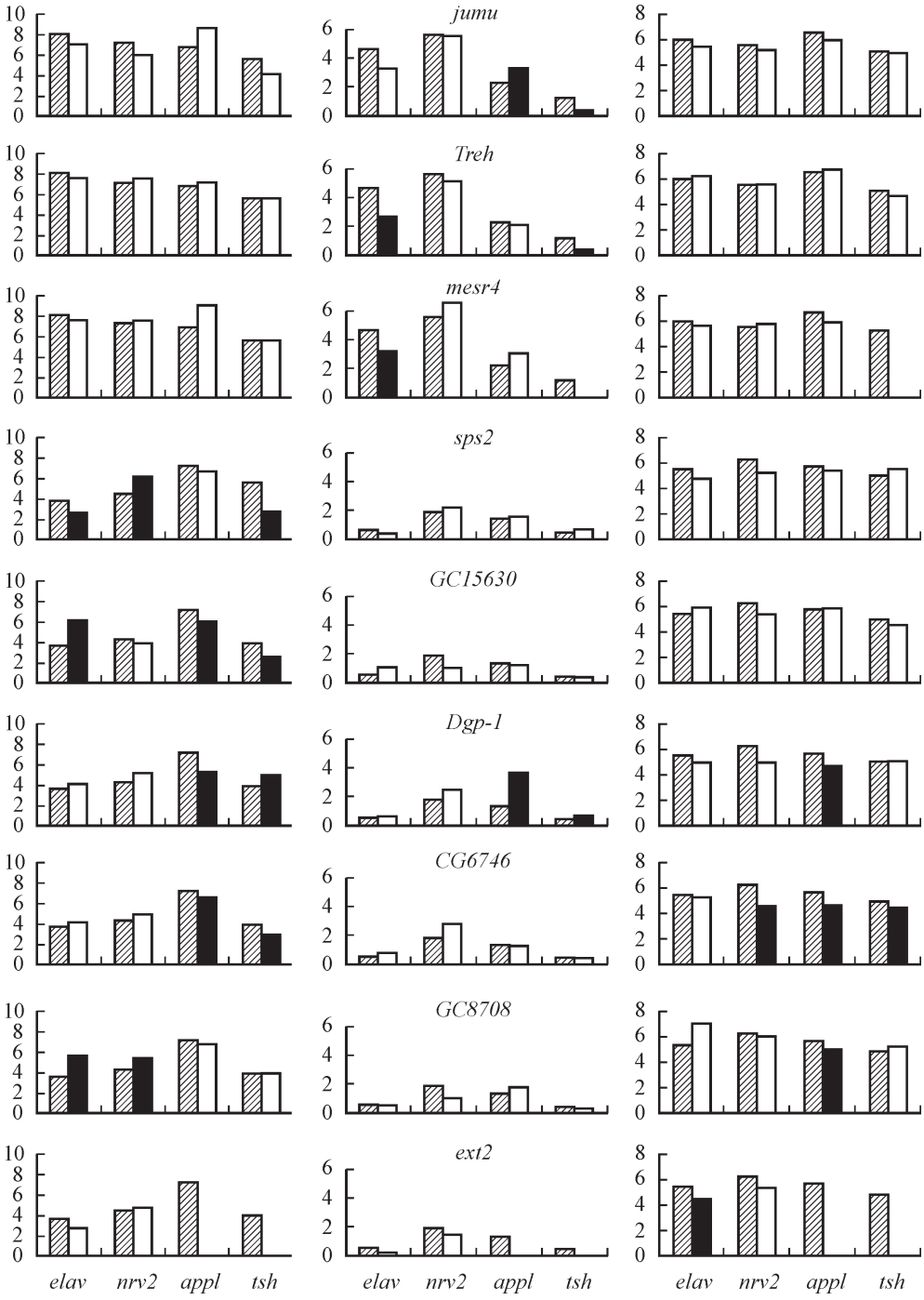


Рис. 1. Параметры двигательной активности линий с локальным нокдауном генов-кандидатов под контролем промоторов *elav*, *appl*, *nrv2*, *tsh*. В каждом ряду для указанного гена слева направо представлены графики для длительности побежки (с), частоты инициации побежек (число за 100 с), скорости побежки (мм/с). Показаны средние значения.

*Заштрихованные столбики* — контроль, достоверные отличия от контроля обозначены *затемненными столбиками* (тест рандомизации, 10 000 итераций, $p < 0.05$).

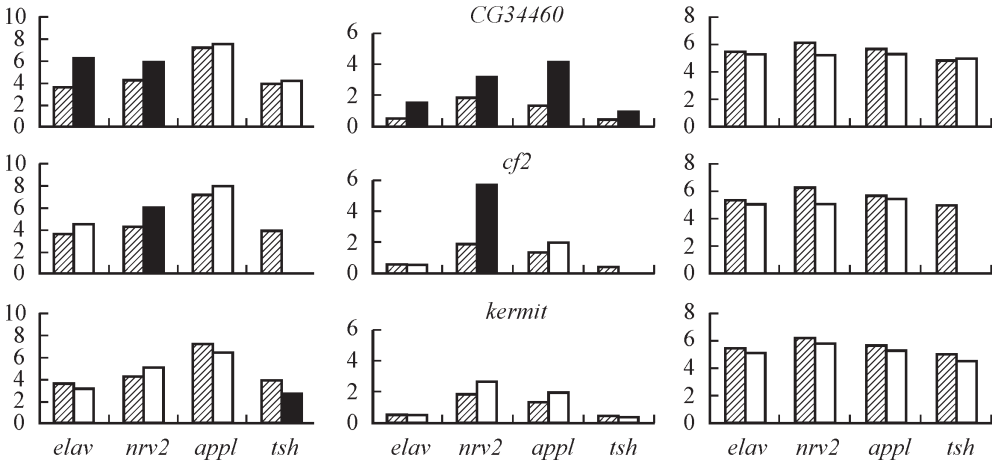


Рис. 1 (*продолжение*).

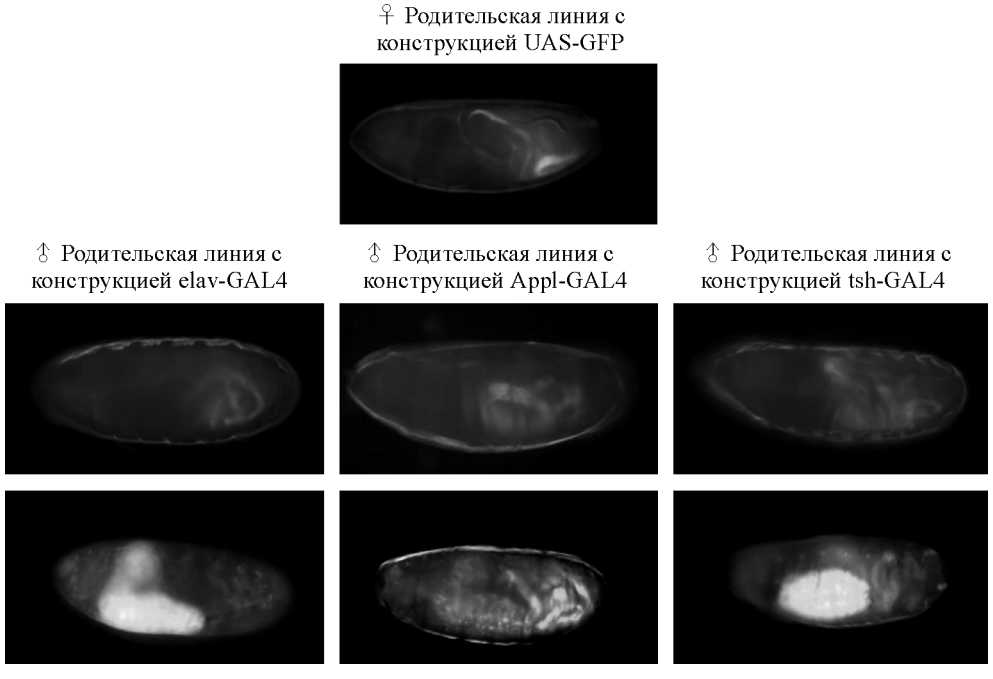


Рис. 2. Флуоресценция GFP в нервных структурах эмбрионов дрозофилы на последних стадиях развития перед вылуплением личинки (нижний ряд).

Передняя часть направлена влево, брюшная часть — вниз. Вверху — эмбрион родительской линии, содержащей в геноме конструкцию с GFP, который в отсутствие GAL4 не экспрессируется. В первой строке показаны эмбрионы контрольных родительских линий, в которых экспрессируется GAL4 под управлением промоторов (*elav*, *appl* и *tsh*). На всех фото в задней части яйца также обнаруживается в той или иной степени выраженная флуоресценция желтка в кишечнике. Снимки сделаны с 20-кратным увеличением.

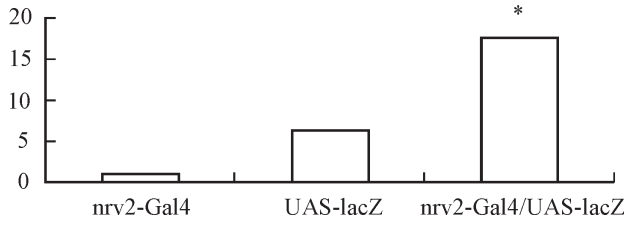


Рис. 3. Уровень активности бета-галактозидазы в родительских (контрольных) линиях, несущих трансгены GAL4 и LacZ, и в экспериментальной линии с системой nrv2-GAL4/UAS-LacZ.

На графиках представлены средние значения. Достоверность отличий экспериментальных образцов от контрольных подтверждена по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.01$). На вертикальной оси графика отложена оптическая плотность образцов, умноженная на 100.

песне самца [2]. Во-вторых, изменения длительности побежек в линиях с РНК-интерференцией по этим генам носили разнонаправленный характер в зависимости от используемого промотора, и для дальнейшего анализа этих данных требовалось исключить возможность неэффективного нокдауна.

Для всех экспериментальных образцов показано снижение уровня экспрессии, однако величина снижения существенно варьировала в зависимости от конкретного сочетания «промотор—ген» (рис. 4). Различия в степени супрессии, вероятнее всего, связаны с тем, насколько совпадают пространственные паттерны экспрессии генов-кандидатов и генов, управляющих локальной РНК-интерференцией. Так, супрессия под управлением промотора *elav* максимальна для *CG15630*, так как он экспрессируется преимущественно в нервной системе, и минимальна для *sps2*, который экспрессируется в значительной мере вне нервной системы [8].

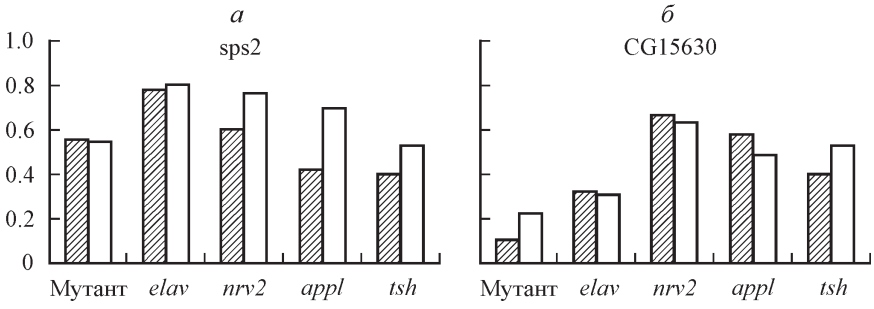


Рис. 4. Уровень экспрессии CG15630 и sps2 в мутантных линиях и в линиях с РНК-интерференцией по этим генам (в долях относительно контроля, принимаемого за 1). У мутантов уровень экспрессии определялся относительно линии дикого типа CS (*заштрихованный столбик*) и относительно мутанта по второму анализируемому гену (*незаштрихованный столбик*). В линиях с РНК-интерференцией уровень экспрессии оценивался относительно контроля, используемого в тестировании двигательной активности (*заштрихованные столбики*), и относительно линии с РНК-интерференцией по второму анализируемому гену (*незаштрихованные столбики*).

*elav*, *nrv2*, *appl*, *tsh* — промоторы в системе GAL4/UAS, используемые для локализации РНК-интерференции. Достоверность отличий подтверждена тестом рандомизации, 10 000 итераций, $p < 0.05$.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе выполнено тестирование двигательной активности дрозофилы в условиях тканеспецифичного подавления экспрессии генов-кандидатов, выявленных ранее при скрининге P инсерционных мутантов с существенно измененными параметрами локомоции и песни ухаживания [2]. Подавление экспрессии достигалось посредством РНК-интерференции под управлением промоторов генов *elav*, *nrv2*, *appl* и *tsh*. Каждый из этих генов, используемых для достижения тканеспецифичности РНК-интерференции, экспрессируется преимущественно в нервных клетках дрозофилы [8], но при этом имеет свои характерные особенности в паттерне экспрессии в нервных тканях. Различия в паттерне супрессии наряду с характером двигательных отклонений позволили предположить механизмы участия генов-кандидатов в генерации моторного паттерна локомоторных актов.

РНК-интерференция генов-кандидатов *jumu*, *Treh* и *mesr4* (w-линии) сопровождается изменениями только в частоте побежек. При этом изменения не затрагивают линии с супрессией этих генов под управлением *nrv2*, который в отличие от *elav* и *appl* не экспрессируется в сенсорных нейронах на стадии личинки, в том числе в фоторецепторах имагинальных дисков глаз [24]. Гены *jumu* и *mesr4* являются транскрипционными факторами, для которых показано участие в развитии периферической нервной системы [3, 17]. Таким образом, наиболее вероятной причиной локомоторных отклонений при интерференции *jumu* и *mesr4* могут быть нарушения в развитии сенсорных органов дрозофилы. Ген *Treh* кодирует фермент (по классификации NC-IUBMB: Trehalase, EC=3.2.1.28), расщепляющий трегалозу — дисахарид, в составе которого осуществляется транспорт глюкозы гемолимфой к различным органам и тканям [7]. Двигательные отклонения, связанные с супрессией этого гена, вероятнее всего, связаны с неспецифическими нарушениями в энергетическом метаболизме нервных клеток.

Интересной представляется группа из генов *CG15630*, *sps2* и *Dgp-1*, для которых показано разнонаправленное изменение длительности побежек в зависимости от используемого промотора. Количественный анализ уровня экспрессии *CG15630* и *sps2* подтвердил эффективность РНК-интерференции под всеми промоторами. Супрессия гена *CG15630* под управлением *elav* сопровождается увеличением длительности побежки, а под управлением *appl* и *tsh* этот параметр уменьшается. С одной стороны, характер двигательных отклонений, как и в случае с *jumu* и *mesr4*, позволяет предположить нарушения в развитии сенсорных органов. Однако это предположение не объясняет разнонаправленный характер отклонений, а также функции *CG15630* в центральной нервной системе (ЦНС) животных, где уровень экспрессии этого гена достаточно высок. С другой стороны, *appl* мощно, а *tsh* преимущественно экспрессируется в торакальных ганглиях в отличие от *elav*, максимум экспрессии которого и соответственно интерференции по *CG15630* находится в мозге [8]. Таким образом, эффект РНК-интерференции по *CG15630* может зависеть от соотношения степени супрессии в разных отделах нервной системы. Можно заключить, что продукт гена *CG15630* является обязательным компонентом нейрональных цепей, участвующих в реализации локомоторных актов, при этом функциональная значимость *CG15630* определяется нервной структурой, в которой он экспрессируется. Такой вывод хорошо соотносится с биоинформационными данными о вероятной локализации продукта *CG15630* на клеточной поверхности нейронов, где он участвует в ремоделировании цитоскелета клетки [2].

Супрессия гена *sps2* приводит, с одной стороны, к уменьшению длительности побежки при использовании промоторов *elav* и *tsh*, а с другой — к ее увеличению под управлением *nrv2*, который наравне с *appl* экспрессируется одинаково мощно во всех отделах ЦНС дрозофилы [8]. Эти данные трудно интерпретировать, учитывая, что продукт *sps2* — это фермент (по классификации NC-IUBMB:

Selenide, water dikinase 2, EC=2.7.9.3), участвующий в синтезе селеноцистеина [21] и синтезируемый преимущественно вне ЦНС [8]. Вместе с тем сходство между *sps2* и *CG15630* в сложном характере моторных отклонений при РНК-интерференции, а также сходство в ранее установленных изменениях параметров импульсной песни у мутантов [2] указывает на наличие взаимосвязи между этими генами и процессами, в которых они задействованы. Можно указать, что *nrv2* предположительно экспрессируется в глиальных клетках [24], а по *elav* и *appl* показано отсутствие экспрессии этих генов в некоторых типах глии [14, 19]. Возможно, эффекты РНК-интерференции *sps2* связаны именно с нарушениями развития и функционирования глиальных клеток нервной системы.

При РНК-интерференции *Dgp-1* отклонения в локомоторной активности возникают только при использовании промоторов *tsh* и *appl*, но изменения затрагивают все три анализируемых параметра. Подобная картина может быть результатом нарушения работы небольшой распределенной группы нейронов в нервной системе дрозофилы, в которой супрессия *Dgp-1* под управлением *appl* существенно эффективнее, нежели под управлением *elav* и *nrv2*. При этом данная группа нейронов должна входить либо быть непосредственно связанной со структурами центрального комплекса мозга мухи, определяющего скорость побежки [23]. Предполагаемая роль продуктов *Dgp-1* заключается в противодействии нарушениям белкового метаболизма в клетке [2]. Возможно, выявленные моторные дефекты при РНК-интерференции *Dgp-1* являются результатом нейродегенеративных процессов в структурных элементах центрального комплекса. Следует отметить, что *Dgp-1* единственный ген, супрессия которого под управлением *tsh* приводит к увеличению длительности побежки, однако причины этого изменения могут быть связаны с функционированием *Dgp-1* вне нервной системы, так как *tsh*, имея высокий уровень экспрессии в брюшной цепочке, обнаруживает свою активность во многих других тканях [12].

РНК-интерференция сопровождалась изменениями скорости побежки еще для трех генов-кандидатов: *CG6746*, *CG8708* и *ext2*. Два из этих генов — *CG8708* и *ext2* — кодируют трансферазы сахаров и их производных [15, 16] (по классификации NC-IUBMB: core1-b1.3-galactosyltransferase, EC=2.4.1.122 и Exostosin-2, EC=2.4.1.224, EC=2.4.1.225). Общефизиологическая значимость этих ферментов в сумме с однонаправленностью всех изменений скорости побежки независимо от супрессируемого гена и используемого промотора заставляют предполагать неспецифические механизмы воздействия интерференции этих трех генов на развитие и работу ЦГМП.

Интересно также усиление двигательной активности при супрессии генов *cf2* и *CG34460*. *cf2* кодирует транскрипционный фактор, который подробно изучен с позиций его участия в развитии мышечных органов дрозофилы [5]. CF2 вместе с MEF2 являются активаторами генов мышечных белков на эмбриональных и личиночных стадиях. Наши данные показывают участие *cf2* в нервных процессах, влияющих на двигательную активность животного, причем эти процессы должны иметь определенную локализацию, которая некоторым образом пересекается с паттерном экспрессии *nrv2*. Продукт гена *CG34460* относится к семейству белков SVC (single von Willebrand factor C-domain) и его экспрессия приходится исключительно на семенники [8, 20]. Предположительно продукты генов SVC могут секретироваться в гемолимфу в ответ на стрессорные воздействия окружающей среды. О роли *CG34460* в нервной системе дрозофилы ранее ничего не было известно, и требуются дальнейшие исследования для понимания обнаруженных нами выраженных эффектов РНК-интерференции этого гена на двигательную активность дрозофилы.

В список генов-кандидатов нами был включен ген *kermit*, так как ранее было показано, что мутация этого гена снижает двигательную активность [13]. Однако по результатам РНК-интерференции этого гена в ЦНС представляется маловероятным его вовлеченность в процессы генерирования моторного паттерна. Выяв-

ленное в нашем исследовании изменение длительности побежки при супрессии этого гена под управлением *tsh*, скорее всего, вызвано нарушениями в других тканях дрозофилы, где также экспрессируется *tsh* [12].

Мы благодарим The Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC) на базе Campus Science Support Facilities (Австрия), Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) на базе Indiana University (США) и доктора Константина Илиади (Госпиталь для больных детей, Торонто, Канада) за предоставление и отправку трансгенных линий для осуществления экспериментов с РНК-интерференцией.

Работа поддержана Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг., программами президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] *Камышев Н. Г.* Дрозофила как модельный объект для вскрытия молекулярных механизмов моторных и когнитивных дисфункций и поиска фармакологических способов их коррекции: количественный подход к оценке изменений локомоторного поведения. В кн.: Измерительные и информационные технологии в охране здоровья: сборник научных трудов. СПб. 152—160. 2011.

[2] *Федотов С. А.*, *Брагина Ю. В.*, *Беседина Н. Г.*, *Даниленкова Л. В.*, *Камышева Е. А.*, *Камышев Н. Г.* Генетическое исследование моторных функций *Drosophila melanogaster*. Экол. генетика. 10 (1) : 51—61. 2012.

[3] *Abdelilah-Seyfried S.*, *Chan Y. M.*, *Zeng C.*, *Justice N. J.*, *Younger-Shepherd S.*, *Sharp L. E.*, *Barbel S.*, *Meadows S. A.*, *Jan L. Y.*, *Jan Y. N.* A gain-of-function screen for genes that affect the development of the Drosophila adult external sensory organ. Genetics. 155 (2) : 733—752. 2000.

[4] *Arshavsky Y. I.*, *Deliagina T. G.*, *Orlovsky G. N.* Pattern generation. Curr. Opin. Neurobiol. 7 (6) : 781—789. 1997.

[5] *Bagni C.*, *Bray S.*, *Gogos J. A.*, *Kafatos F. C.*, *Hsu T.* The *Drosophila* zinc finger transcription factor CF2 is a myogenic marker downstream of MEF2 during muscle development. Mech. Dev. 117 (1—2) : 265—268. 2002.

[6] *Briggman K. L.*, *Kristan W. B.* Multifunctional pattern-generating circuits. Annu. Rev. Neurosci. 31 : 271—294. 2008.

[7] *Burton R. S.*, *la Spada A.* Trehalase polymorphism in *Drosophila melanogaster*. Biochem. Genet. 24 (9—10) : 715—719. 1986.

[8] *Chintapalli V. R.*, *Wang J.*, *Dow J. A. T.* Using FlyAtlas to identify better *Drosophila* models of human disease. Nature Genetics. 39 (6) : 715—720. 2007.

[9] *Chomczynski P.*, *Sacchi N.* The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat. Protoc. 1 (2) : 581—585. 2006.

[10] *Duffy J. B.* GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. Genesis. 34 (1—2) : 1—15. 2002.

[11] *Edgington E. S.* Randomization tests (3rd ed.). New York. Marcel Dekker. 1995.

[12] *Fasano L.*, *Roder L.*, *Core N.*, *Alexandre E.*, *Vola C.*, *Jacq B.*, *Kerridge S.* The gene teashirt is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs. Cell. 64 (1) : 63—79. 1991.

[13] *Kim J.*, *Lee S.*, *Ko S.*, *Kim-Ha J.* dGIPC is required for the locomotive activity and longevity in *Drosophila*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 402 (3) : 565—570. 2010.

[14] *Martin-Morris L. E.*, *White K.* The *Drosophila* transcript encoded by the beta-amyloid protein precursor-like gene is restricted to the nervous system. Development. 110 (1) : 185—195. 1990.

[15] *McCormick C.*, *Duncan G.*, *Goutsos K. T.*, *Tufaro F.* The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparin sulfate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97 (2) : 668—673. 2000.

[16] *Muller R.*, *Hulsmeier A. J.*, *Altmann F.*, *Ten H. K.*, *Tiemeyer M.*, *Hennet T.* Characterization of mucin-type core-1 β1—3 galactosyltransferase homologous enzymes in *Drosophila melanogaster*. FEBS J. 272 (17) : 4295—4305. 2005.

[17] *Parrish J. Z.*, *Kim M. D.*, *Jan L. Y.*, *Jan Y. N.* Genome-wide analyses identify transcription factors required for proper morphogenesis of *Drosophila* sensory neuron dendrites. Genes Dev. 20 (7) : 820—835. 2000.

[18] *Pfaffl M. W.*, *Horgan G. W.*, *Dempfle L.* Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucl. Acids Res. 30 (9) : e36. 2002.

[19] *Robinow S.*, *White K.* Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during Drosophila melanogaster development. J. Neurobiol. 22 (5) : 443—461. 1991.

[20] *Sheldon T. J.*, *Miguel-Aliaga I.*, *Gould A. P.*, *Taylor W. R.*, *Conklin D.* A novel family of single VWC-domain proteins in invertebrates. FEBS Lett. 581 (27) : 5268—5274. 2007.

[21] *Shim M. S.*, *Kim J. Y.*, *Jung H. K.*, *Lee K. H.*, *Xu X. M.*, *Carlson B. A.*, *Kim K. W.*, *Kim I. Y.*, *Hatfield D. L.*, *Lee B. J.* Elevation of glutamine level by selenophosphate synthetase 1 knockdown induces megamitochondrial formation in *Drosophila* cells. J. Biol. Chem. 284 (47) : 32 881—32 894. 2009.

[22] *Simon J. A.*, *Lis J. T.* A genmline transformation analysis reveals flexibility in the organization of heat shock consensus elements.. Nucl. Acids Res. 15 (7) : 2971—2988. 1987.

[23] *Strauss R.* The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. Curr. Opin. Neurobiol. 12 (6) : 633—638. 2002.

[24] *Sun B.*, *Xu*, *P.*, *Salvaterra P. M.* Dynamic visualization of nervous system in live *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (18) : 10 438—10 443. 1999.

[25] *Supatto W.*, *McMahon A.*, *Fraser S. E.*, *Stathopoulos A.* Quantitative imaging of collective cell migration during *Drosophila* gastrulation: multiphoton microscopy and computational analysis. Nat. Protoc. 4 (10) : 1397—1412. 2009.

Поступила 23 X 2012