

УДК: 575.16:591.5:595.773.4

Анализ компонентов приспособленности линий *Drosophila melanogaster* с нарушением системы ABC-транспортер

Е.В.Гадяка, Л.И.Воробьева

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
gadiaka_vg@mail.ru

Изучены основные компоненты приспособленности линий *w*, *bw*, *st* и *bw; st* *Drosophila melanogaster* с нарушением системы ABC-транспортер. Обнаружено влияние генотипа на продолжительность жизни, плодовитость, локомоторную активность и положительный фототаксис имаго данных линий. Было установлено, что линия *w* характеризуется наименьшими показателями по изученным компонентам приспособленности. Обсуждается влияние системы ABC-транспортер на механизмы неврологических нарушений и формирования приспособленности у имаго данных линий.

Ключевые слова: компоненты приспособленности, система ABC-транспортер, *Drosophila melanogaster*, неврологические нарушения.

Аналіз компонентів пристосованості ліній *Drosophila melanogaster* з порушеннями системи ABC-транспортер

О.В.Гадяка, Л.І.Воробйова

Вивчено основні компоненти пристосованості ліній *w*, *bw*, *st* і *bw; st* *Drosophila melanogaster* з порушеною системою ABC-транспортер. Виявлено вплив генотипу на тривалість життя, плодючість, локомоторну активність та позитивний фототаксис имаго наведених ліній. Встановлено, що лінія *w* характеризується найнижчими показниками за вивченими компонентами пристосованості. Обговорюється вплив системи ABC-транспортер на механізми неврологічних порушень та формування пристосованості в имаго даних ліній.

Ключові слова: компоненти пристосованості, система ABC-транспортер, *Drosophila melanogaster*, неврологічні порушення.

Analysis of adaptive components in *Drosophila melanogaster* stocks with broken ABC-transporter system

E.V.Gadyaka, L.I.Vorobyova

The main adaptive components in *Drosophila melanogaster* stocks *w*, *bw*, *st* and *bw; st* with broken ABC-transporter system have been studied. The genotype influence on the lifespan, fertility, locomotor activity and positive phototaxis has been observed. It was found, that the stock *white* is characterized with the least rates of the studied adaptive components. The broken ABC-transporter system influence on the neurological disorders mechanisms and adaptability formation mechanisms has been discussed.

Key words: adaptive components, ABC-transporter system, *Drosophila melanogaster*, neurological disorders.

Введение

Зависимые от возраста нейродегенеративные расстройства вызывают повышенный интерес медиков, ученых и общества в целом в связи с увеличением числа людей пожилого возраста (Cauchi, van den Heuvel, 2006; Chan, Bonini, 2000). Современные исследования уже внесли существенный вклад в понимание природы этих заболеваний, однако сложная организованность нервной системы и мультифакториальная природа данных заболеваний существенно тормозят развитие изучаемого вопроса. Учитывая приведенные трудности, во многих работах подчеркивается значимость изучения этой проблемы с использованием модельных объектов, таких как *Drosophila melanogaster* (Driskoll, Gerstbrein, 2003).

Известно, что одним из факторов развития таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона, является изменение в содержании метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана (КПОТ), по которому у млекопитающих метаболизируется около 90% всего триптофана (Лапин, 2004). Показано, что некоторые метаболиты КПОТ, такие как 3-гидроксикинуренин, обладают токсическим действием, избыток его содержания вызывает

гиперпродукцию пероксида водорода, который в свою очередь индуцирует гибель нейронов по механизму апоптоза (Okuda et al., 1998). У дрозофилы пероксид водорода также активирует ряд внутриклеточных сигнальных посредников, регулирующих экспрессию генов, вовлеченных в механизмы обучения и памяти (Savvateeva et al., 2000). Показано, что помимо воздействия на нервную систему, нарушение метаболизма триптофана связано со старением. При сравнении возрастных групп 34–60, 61–71 и 72–93 года у последних регистрировалось повышенное содержание кинуренина (Frisk et al., 2004), а повышенное содержание кинуренина и кинурениновой кислоты – также производной триптофана – было обнаружено в головном мозгу стареющих крыс (Monogi et al., 1988; Gramsbergen et al., 1992). Линии дрозофилы, имеющие нарушения в синтезе триптофана, обладали достоверно большей продолжительностью жизни в сравнении с линиями дикого типа (Kamyshev, 1980; Oxenkug, 2010).

В данной работе исследованы мутантные линии *D. melanogaster* – *w*, *bw*, *st* и *bw; st*. У особей мутантных линий *st* и *w* наблюдается сниженная способность переносить триптофан, а у особей мутантных линий *w* и *bw* – транспортировать гуанин, которые являются предшественниками пигментов дрозоптерина и оммохрома, отвечающих за красно-коричневый цвет глаз *D. melanogaster*. Доказано, что белки семейства ABC-транспортеров, переносящие предшественники данных пигментов, включены также в обмен других важных веществ, таких как дофамин, гистамин, серотонин и пр., являющихся нейромедиаторами в головном мозгу имаго *D. melanogaster*. Оказалось, что вследствие нарушения работы данных переносчиков мутанты по генам системы ABC-транспортер *w*, *bw* и *st* имеют лишь половину от наблюдаемого у дикого типа количества гистамина, дофамина и серотонина, с чем и связывают некоторые поведенческие особенности данных линий (Ewart, Howells, 1998).

Стоит отметить, что нарушения транспорта гуанина и триптофана, наблюдаемые у изученных мутантных линий, могут иметь множественные эффекты, затрагивающие не только нарушения нервной системы, но и ряд других показателей, влияющих на приспособленность линий в целом. Поэтому, целью данной работы стало изучение основных показателей приспособленности линий *w*, *bw*, *st* и *bw; st*, к которым относится продолжительность жизни (ПЖ), плодовитость, число доминантных летальных мутаций (ДЛМ), а также некоторые поведенческие признаки, такие как локомоторная активность (ЛА) и фототаксис.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования были использованы 4 линии *D. melanogaster* с нарушением системы ABC-транспортера: *w*, *bw*, *st* и *bw; st*, содержащиеся в коллекции кафедры генетики и цитологии ХНУ им В.Н.Каразина.

Мух выращивали в пробирках на стандартной дрожжевой среде в термостате при температуре 23°C. Разделение имаго по полу проводили в течение первых суток после выхода мух из пупария. В эксперимент брали только виргинных особей. Поведенческие тесты проводили без предварительной наркотизации насекомых.

Для учета продолжительности жизни самцов и самок каждой из линий помещали отдельно по 30 особей в каждую пробирку, всего в каждой линии протестировали 150 имаго самцов и самок соответственно. При оценке продолжительности жизни каждые 3 дня мух пересаживали на новую среду, подсчитывая при этом количество умерших и оставшихся в живых особей. Эксперимент проводили до гибели всех имаго.

Плодовитость оценивали по количеству вылетевших имаго от скрещивания одной пары особей. В каждой исследуемой линии было учтено 20 семей.

Для учета частоты доминантных летальных мутаций использовали стандартную методику (Тихомирова, 1990).

Локомоторную активность имаго дрозофилы определяли индивидуально по методике открытого поля (Copolly, 1967). Мух помещали в чашку Петри, дно которой расчерчено на квадраты со стороной 5 мм (1 ед.). Спустя 5 минут, необходимых для адаптации мух к новым условиям, в течение 2 минут проводили наблюдения, определяя суммарную длину пробега каждой особи. Для каждой особи, у которой была посчитана индивидуальная ЛА, оценивали фототаксис. Для этого половина чашки Петри закрывалась темной плотной тканью, а с другой стороны устанавливался источник света. Учет реакции проводился через 1 минуту. ЛА и фототаксис самцов и самок учитывали отдельно.

Полученные в ходе эксперимента данные были обработаны при помощи традиционных методов вариационной статистики. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента. При анализе ПЖ использовали логранговый анализ. Для оценки влияния факторов на изучаемый признак применяли дисперсионный анализ. Силу влияния оценивали по методу

М.Снедекора (Лакин, 1990). Для статистических расчетов и обработки данных использовали компьютерные программы STATISTICA 6.0 и Microsoft Office Excel 2007.

Результаты

Основные показатели приспособленности изученных линий представлены в табл. 1.

В ходе исследования обнаружено, что наименьшая средняя ПЖ характерна для самцов и самок линии *w*, а наибольшая – для самок линии *st* и самцов линии *bw*. Достоверных различий по средней продолжительности жизни не выявили, однако в рамках данного эксперимента также провели логранговый анализ кривых выживаемости, который по ряду причин является более показательным для анализа выживаемости. В рамках данного анализа определили медиану кривой выживаемости. Было выявлено, что кривые выживаемости самцов (рис. 1) линий *w* и *bw*, *w* и *st*, *bw*; *st* и *bw*, а также *bw*; *st* и *st* достоверно ($p < 0,01$) отличаются. Наиболее выживаемыми среди самцов являются особи линии *st* (медиана выживаемости – 29,2) и *bw* (медиана выживаемости – 27,4), а наименее выживаемыми – самцы линии *w* (медиана выживаемости – 22,7). Медиана выживаемости линии *bw*; *st* составила 27,3 суток. Достоверных различий кривых выживаемости самцов между линиями *bw* и *st*, а также линиями *bw*; *st* и *w* выявлено не было.

Таблица 1.

Показатели приспособленности линий *w*, *bw*, *st* и *bw*; *st*

| Линия | | <i>w</i> | <i>bw</i> | <i>st</i> | <i>bw</i> ; <i>st</i> |
|--|---------|------------|-------------|-------------|-----------------------|
| ПЖ, средняя | ♀ | 20,68±6,33 | 26,54±7,15 | 30,42±8,33 | 24,66±7,5 |
| | ♂ | 20,68±6,25 | 29,7±8,26 | 28,76±8,02 | 25,34±8,04 |
| Плодовитость, средняя | | 41,5±1,6 | 48,25±1,29 | 48,3±1,49 | 44,85±0,99 |
| % ДЛМ, средний | ранние | 9,017±1,66 | 8,09±1,13 | 6,8±0,9 | 10,27±2 |
| | поздние | 1,3±0,4 | 1,6±0,7 | 1,3±0,5 | 1,37±0,45 |
| ЛА, средняя | ♀ | 42,63±3,9 | 106,49±4,99 | 134,51±5,38 | 106,49±4,99 |
| | ♂ | 47,77±4,94 | 132,02±5,58 | 138,43±6,67 | 108,93±4,93 |
| Доля имаго с положительным фототаксисом, % | ♀ | 62±4,85 | 74±4,39 | 79±4,07 | 73±4,44 |
| | ♂ | 65±4,77 | 74±4,39 | 82±3,84 | 77±4,20 |

Все кривые выживаемости самок (рис. 2) исследуемых линий (*st* и *w*, *st* и *bw*; *st*, *st* и *bw*, *bw* и *bw*; *st*, *w* и *bw*, *w* и *bw*; *st*) достоверно различимы ($p < 0,01$) между собой. Наиболее выживаемыми у самок являются линии *st* (медиана выживаемости – 29,3 суток), а наименее выживаемой – линия *w* (медиана выживаемости – 18,7 суток). Линиям *bw* и *bw*; *st* характерно значение медианы в 22,8 и 22 суток соответственно.

Достоверных различий по кривым выживаемости между самцами и самками линий *st*, *bw* и *bw*; *st* не выявлено, однако у линии *w* обнаружено достоверное ($p < 0,01$) различие кривых выживаемости между самцами и самками, самцы данной линии оказались более выживаемы.

В ходе данного исследования было установлено, что наибольшее значение плодовитости характерно для линий *st* и *bw*, а наименьшим значением плодовитости характеризовалась линия *w*. Достоверны различия ($p < 0,01$) между линиями *st* и *w*, *st* и *bw*; *st*, *bw* и *w*, *bw* и *bw*; *st*, а также между

линиями *w* и *bw*; *st*. Достоверных различий между линиями *st* и *bw* не выявлено. Дисперсионный анализ показал достоверное влияние генотипа ($p < 0,01$) линий на значение плодовитости имаго *D. melanogaster*.

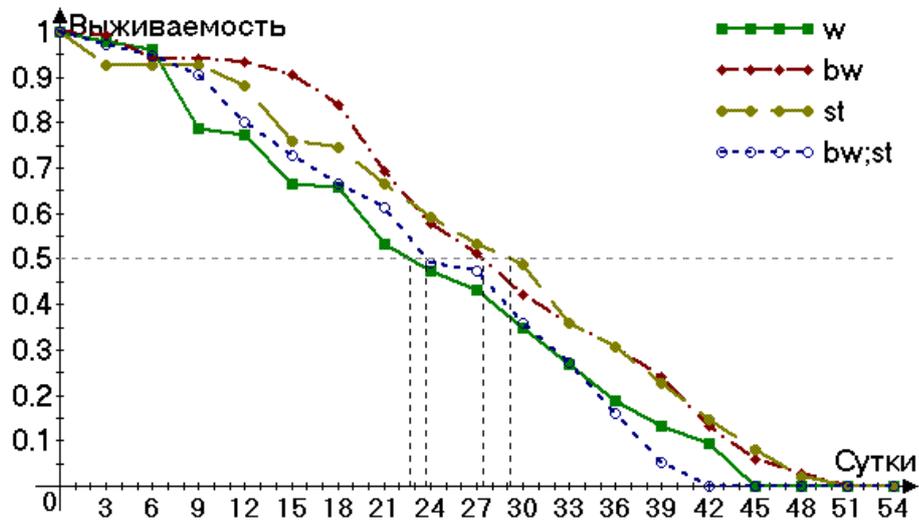


Рис. 1. Кривые выживаемости самцов линий *w*, *bw*, *st* и *bw*; *st*

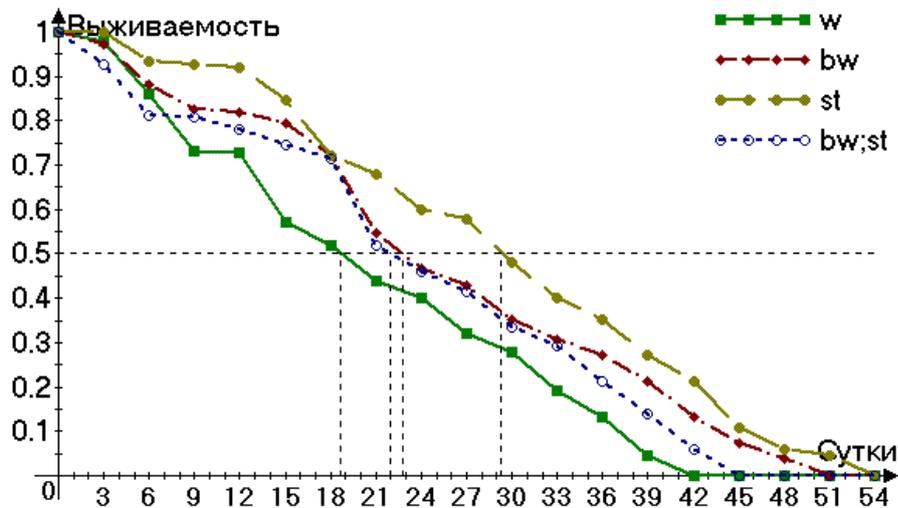


Рис. 2. Кривые выживаемости самок линий *w*, *bw*, *st* и *bw*; *st*

В ходе эксперимента была установлена частота ранних и поздних ДЛМ в каждой из линий. Все линии: *st*, *bw*, *bw*; *st* и *w* не были достоверно различимы по частоте ДЛМ и имели сходные показатели (табл. 1). Достоверного влияния генотипа на данный признак выявлено не было.

Анализ ЛА показал, что наибольшими показателями ЛА характеризуются самцы линии *st* и несколько меньшим – самки этой же линии. Наименьшим значением ЛА характеризовались самки и самцы линии *w*. Для самцов и самок линий *bw* и *bw*; *st* характерны средние показатели ЛА, однако самцы и самки линии *bw* обладают более высокими показателями в сравнении с *bw*; *st*. Достоверны различия ($p < 0,01$) между линиями *st*, *bw*; *st* и *w*, а также линиями *bw*, *bw*; *st* и *w*. Достоверных различий в ЛА между самцами линий *st* и *bw*, а также самками этих линий не выявлено. Достоверных различий по показателю ЛА у самок и самцов каждой из линий также не выявлено. Дисперсионный анализ показал достоверное ($p < 0,01$) влияние генотипа на данный признак. Достоверного влияния пола, а также комбинации факторов генотипа и пола на данный фактор выявлено не было.

Нами также был изучен фототаксис самцов и самок каждой из линий (табл. 1). Линии *st*, *bw* и *bw*; *st* не были достоверно различимы по данному показателю и имели близкие показатели.

Достоверные различия по данному признаку наблюдались ($p < 0,01$) при сравнении каждой из трех линий с линией *w*, у которой процент мух с положительным фототаксисом был ниже как у самцов, так и у самок.

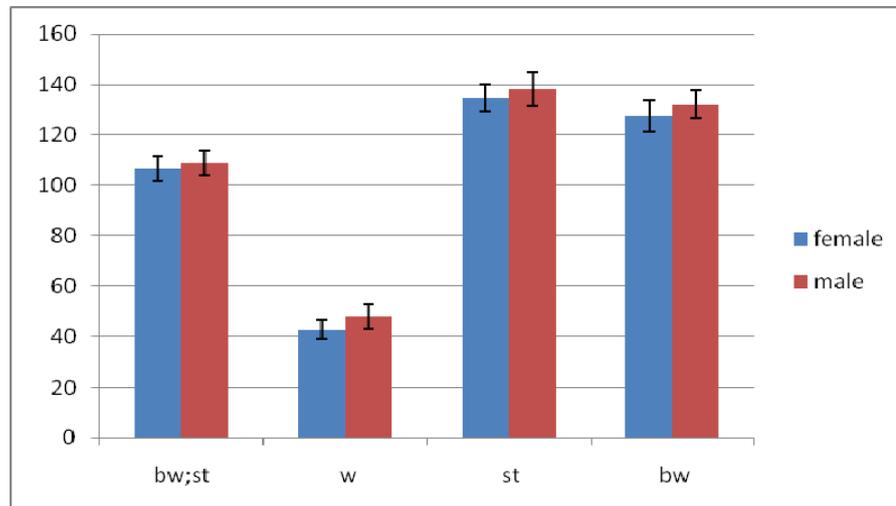


Рис. 3. Локомоторная активность линий *w*, *bw*, *st* и *bw; st*

Дисперсионный анализ показал, что фототаксис, а также комбинация факторов генотип и фототаксис не оказывают достоверного влияния на показатели ЛА имаго изучаемых линий.

Обсуждение

Приспособленность является важным адаптационным свойством организма и включает в себя множество компонентов, их вклады в формирование приспособленности могут быть прямыми или опосредованными и обладать разной силой влияния. Такие показатели, как продолжительность жизни, плодовитость и доминантные летальные мутации оказывают непосредственный вклад в формирование приспособленности как организма, так и вида в целом, тогда как поведенческие реакции – локомоторная активность и фототаксис являются как важными компонентами приспособленности, так и составляющими более сложных реакций нервной системы.

Изучение основных компонентов приспособленности мутантных линий *w*, *bw*, *st* и *bw; st* показало, что линия *w* оказалась наименее приспособленной по целому ряду показателей: имаго данной линии обладали наименьшей ПЖ, плодовитостью и ЛА, а процент особей, имеющих положительный фототаксис, был ниже, чем у остальных линий. Фенотипически ген *white* проявляется отсутствием пигментации глаз, однако доказано, что изменения при данной мутации затрагивают и нервную систему, в том числе процессы памяти, обучения, полового поведения и др. Известно, что в случае данной мутации нарушается транспорт предшественников обоих пигментов – как гуанина, так и триптофана, являющихся также предшественниками важных нейромедиаторов нервной системы *D. melanogaster*. Стоит заметить, что гены *st* и *bw*, также относящиеся к системе АВС-транспортер, имеют нарушения в транспорте лишь одного из данных веществ – линия *st* – гуанина, линия *bw* – триптофана. Линия *bw; st*, фенотипически проявляемая белым цветом глаз, так же как и линия *w*, имеет нарушения в транспорте обоих веществ (O'Hare et al., 1984; Dreesen et al., 1988).

Линии *st* и *bw* имели достоверно более высокие показатели ПЖ, ЛА и плодовитости в сравнении с линиями *w* и *bw; st*. По всей видимости, это говорит о некотором компенсаторном механизме, ведь данные линии характеризуются нарушением транспорта одного из предшественников пигментов, тогда как транспортеры другого нормально функционируют.

Интересен вопрос о влиянии данных мутаций на компоненты приспособленности. По всей видимости, нарушение в транспорте гуанина и триптофана, которое влечет за собой недостаток накопления в головном мозгу данных линий необходимого количества гистамина, серотонина, дофамина и других нейроактивных веществ, а также накопление токсических метаболитов данных аминокислот, активирует процессы, ведущие не только к снижению продолжительности жизни организма, но и к снижению полноценного воспроизведения им потомства. К тому же, это затрагивает важные поведенческие реакции, и именно поэтому линия *w* обладает низкими показателями

локомоторной активности и фототаксиса. К тому же, снижение плодовитости данной линии может быть рассмотрено еще и с той точки зрения, что, вероятно, данная линия имеет нарушения и в половом поведении, что не может не сказываться на данном показателе. Изучение полового поведения для изучаемых линий будет учтено в последующих экспериментах.

Плодовитость, как показатель, часто связывают с частотой ДЛМ, за счет которых происходит отбор особей еще на стадии яйца. В наших экспериментах не было обнаружено достоверных различий в частоте ДЛМ, что, по всей видимости, можно связать с тем, что данные линии поддерживаются в одинаковых лабораторных условиях.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что нарушения в транспорте гуанина и триптофана у изученных мутантных линий оказывают непосредственное влияние на целый ряд показателей приспособленности и влияют не только на поведенческие реакции, но и на такие важные показатели, как продолжительность жизни и плодовитость. Наиболее сильное влияние оказывает нарушение в транспорте обоих предшественников пигментов, наблюдаемое у линий *w* и *bw*; *st*, которые характеризуются наиболее низкими показателями ПЖ, плодовитости, ЛА и фототаксиса.

Список литературы

- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М: Высшая школа, 1990. – 351с. /Lakin G.F. Biometriya. – M: Vysshaya shkola, 1990. – 351s./
- Лапин И.П. Стресс. Тревога. Депрессия. Алкоголизм. Эпилепсия (Нейрокинурениновые механизмы и новые подходы к лечению). – М: ДЕАН, 2004. – 220с. /Lapin I.P. Stress. Trevoga. Depressiya. Alkogolizm. Epilepsiya (Neurokinureninovyue mekhanizmy i novyye podkhody k lecheniyu). – M: DEAN, 2004. – 220s./
- Тихомирова М.М. Генетический анализ. Учеб. пособие. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. – 280с. /Tikhomirova M.M. Geneticheskiy analiz. Ucheb. posobiye. – L.: Izd-vo LGU, 1990. – 280s./
- Cauchi R.J., van den Heuvel M. The fly as a model for neurodegenerative diseases: is it worth the jump? // Neurodegenerative Disease. – 2006. – Vol.3. – P. 338–356.
- Chan H., Bonini N.M. Drosophila models of human neurodegenerative disease // Cell Death and Differentiation. – 2000. – Vol.7. – P. 1075–1080.
- Conolly K. Locomotor activity in Drosophila // Amin. Behav. – 1967. – Vol.14. – P. 444–449.
- Dreesen T.D., Johnson D.H., Henikoff S. The brown protein of Drosophila melanogaster is similar to the white protein and to components of active transport complexes // Mol. Cell. Biol. – 1988. – Vol.8. – P. 5206–5215.
- Driskoll M., Gerstbrein B. Dying for a case: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration disease // Nature Rev. Genetics. – 2003. – Vol.4. – P. 181–194.
- Ewart G.D., Howells A.J. Drosophila eye pigmentation ABC transporters // Methods in enzymology. – 1998. – Vol. 292. – P.213.
- Frick B., Schroecksnel K., Neurauter G. Increasing production of homocysteine and neopterin and degradation of tryptophan with older age // Clin. Biochem. – 2004. – Vol.37. – P. 684–687.
- Gramsbergen J.B., Schmidt W., Turski W.A., Shwarcz R. Age-related changes in kynurenic acid production in rat brain // Brain Res. – 1992. – Vol.588. – P. 1–5.
- Kamyshev M.G. Longevity and its relation to the locomotor activity in tryptophan-xantomatin metabolic pathway mutant of Drosophila // Dokl. Acad. Nauk USSR. – 1980. – Vol.253. – P. 1476–1480.
- Monori F., Russi P., Carla V., Lombardi G. Kynurenic acid is present in the rat brain and its content increases during development and aging processes // Neurosci. Lett. – 1988. – Vol.94. – P. 145–150.
- O'Hare K., Murphy C., Levis R., Rubin G.M. DNA sequence of the white locus of Drosophila melanogaster // J. Mol. Biol. – 1984. – Vol.180 (3). – P. 437–455.
- Okuda S., Nishiyama N., Saito H. et al. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity // J. Neurochem. – 1998. – Vol.70, №1. – P. 299–307.
- Oxenkrug Gregory F. The extended life span of Drosophila melanogaster eye-color (white and vermilion) mutants with impaired formation of kynurenine // J. Neural Transm. – 2010. – Vol.117. – P. 23–26.
- Savvateeva E.V., Popov A.V., Kamyshev N.G. et al. Age-dependent memory loss, synaptic pathology and altered brain plasticity in the Drosophila mutant cardinal accumulating 3-hydroxykynurenine // Journal Neural Transmission. – 2000. – Vol.107, №5. – P. 581–601.

Представлено: В.І.Россоха / Presented by: V.I.Rossokha
Рецензент: В.В.Навроцька / Reviewer: V.V.Navrotskaya
Подано до редакції / Received: 14.11.2011