

УДК: 575.22:591.5:595.773.4.

Влияние аллелей локуса *white* и генетического фона на локомоторную активность имаго *Drosophila melanogaster*

В.В.Костенко, Л.И.Воробьева

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
kostenkoviktoria88@rambler.ru

Изучено влияние аллелей локуса *white* и генетического фона на локомоторную активность (ЛА) имаго *Drosophila melanogaster*. Показано влияние как генетического фона, так и мутантных аллелей на формирование признака локомоторная активность. В данном исследовании нами было показано, что ЛА имаго дрозофилы определяется генотипом в целом, а аллели локуса *white* по-разному влияют на показатели ЛА на разном генетическом фоне: на генетическом фоне линии *C-S* наблюдается уменьшение ЛА по сравнению с линией *C-S*, а на генетическом фоне линии *Or* – увеличение данного показателя по сравнению с линией *Or*.

Ключевые слова: локомоторная активность, локус *white*, *Drosophila melanogaster*, мутации кинуренинового пути обмена триптофана, система ABC-транспортер.

Вплив алелей локусу *white* та генетичного фону на локомоторну активність імаго *Drosophila melanogaster*

В.В.Костенко, Л.І.Воробйова

Вивчено вплив алелей локусу *white* та генетичного фону на локомоторну активність (ЛА) імаго *Drosophila melanogaster*. Показано вплив як генетичного фону, так і мутантних алелей на формування ознаки локомоторна активність. У даному дослідженні нами було показано, що ЛА імаго дрозофіли визначається генотипом в цілому, а алелі локусу *white* по-різному впливають на показники ЛА на різному генетичному фоні: на генетичному фоні лінії *C-S* спостерігається зменшення ЛА в порівнянні з лінією *C-S*, а на генетичному фоні лінії *Or* – збільшення даного показника в порівнянні з лінією *Or*.

Ключові слова: локомоторна активність, локус *white*, *Drosophila melanogaster*, мутації кинуренинового шляху обміну триптофану, система ABC-транспортер.

The influence of *white* alleles and genetic background on locomotor activity of adult *Drosophila melanogaster*

V.V.Kostenko, L.I.Vorobyova

The effect of *white* alleles and genetic background on the locomotor activity (LA) of adult *Drosophila melanogaster* has been studied. The influence of both genetic background and the mutant alleles on formation of the trait locomotor activity has been observed. In this study we have shown that LA of adult drosophila is determined by genotype in general, but *white* alleles have different effects on LA parameters at various genetic backgrounds: in the mutant lines with genetic background of *Canton-S* we observed decrease of LA as compared with *Canton-S* line, and the mutant lines with genetic background of *Oregon* showed increase of the index mentioned as compared with *Oregon* line.

Key words: locomotor activity, locus *white*, *Drosophila melanogaster*, mutations of kynurenine pathway of tryptophan metabolism, ABC-transporter system.

Введение

Локус *white* *Drosophila melanogaster*, как известно, характеризуется достаточно сложной аллельной структурой; известно 1790 аллельных вариантов этого локуса (<http://flybase.org/reports/FBgn0003996.html>). Изменения, которые лежат в основе этой вариабельности, разнообразны по своей природе в нуклеотидной последовательности этого гена (от единичных замен нуклеотидов до делеций и инсерций), а также, вследствие этого, образуются различные фенотипические варианты (от полной депигментации глаз до окрашенных в оттенки коричневого). Известно, что ген *w⁺* кодирует трансмембранный ABC-переносчик, который осуществляет перенос 3-гидроксикинуренина – предшественника глазного пигмента оммохрома – в

пигментные гранулы глаза. Этот транспортный белок – один из двух компонентов системы переноса, т.е. при функциональной нормальности и постоянстве второго компонента интенсивность пигментации будет зависеть от функциональной активности именно продукта гена *w+* (Ewart, Howells, 1998). Кроме того, у дрозофилы биосинтез оммохромов является одним из путей обмена триптофана, и блокировка его на промежуточных этапах приводит к накоплению в организме промежуточных метаболитов или к сдвигам в других путях обмена триптофана. В частности, избыток кинуренина и 3-гидроксикинуренина может привести к накоплению кинуреновой, антрапиловой и ксантуреновой кислот, токсичных продуктов азотистого обмена (Erhardt et al., 2007). Аналогичные изменения являются индикаторами ряда патологических состояний человека: хронический гепатит, сахарный диабет, острый лейкоз, хронический миело- и лимфолейкоз, лимфогранулематоз, ревматизм, склеродермия и шизофрения.

Локомоторная, или двигательная, активность является жизненно важным поведенческим признаком животных. Это сложный биологический ответ, имеющий эволюционное значение и охватывающий сенсорную обработку, интеграцию стимулов, исполнительные функции и пути формирования движения (Jordan et al., 2006). Таким образом, локомоторная (двигательная) активность является основой большинства поведенческих актов животных, включая человека. Выявляя генетические детерминанты, лежащие в основе локомоторной активности, можно понять механизмы, включающиеся на всех уровнях этого поведенческого акта. Поэтому, в условиях выравнивания линий по общему генетическому фону, подобная система позволяет изучить влияние аллелей одного локуса, которые отличаются генетической структурой и фенотическим проявлением в контроле сложного количественного признака локомоторная активность.

В связи с этим была поставлена задача изучить вклад аллелей локуса *white* и генетического фона в формирование локомоторной активности имаго *D. melanogaster*.

Материалы и методы исследования

В качестве исходного материала для исследований были использованы следующие линии из коллекции кафедры генетики и цитологии ХНУ:

Canton-S (C-S), *Oregon (Or)* – линии дикого типа, контрастные по локомоторной активности (ЛА), и мутантные линии: *white (w¹)*, *white^{tinged} (w^t)*, *white^{apricot} (w^a)* и *white^{satsuma} (w^{sat})*, которые различаются по степени пигментации глаз ($w^1 < w^t < w^a < w^{sat}$).

Для изучения влияния данных мутаций на признак ЛА проводили насыщающие скрещивания в условиях направленного отбора на маркерную мутацию (Никоро, Васильева, 1978) по схеме:

P: ♀ M × ♂ N (*C-S* и *Or*)

F₁: ♀ F₁ × ♂ F₁

F₂: 1 N : 1 M,

где M (♀ и ♂) – мутантная линия, N – линия дикого типа.

Для каждой исходной мутантной линии было проведено по 6 насыщающих скрещиваний с линией *C-S* и с линией *Or*. Таким образом, линии были выравнены по генотипу (далее по тексту *M_{C-S}* – линия, в которой мутация переведена на генетический фон дикого типа *C-S*; *M_{Or}* – линия, в которой мутация переведена на генетический фон дикого типа *Or*). В результате были получены выравненные по генотипу линии (*w_{C-S}*, *w^t_{C-S}*, *w^a_{C-S}*, *w^{sat}_{C-S}*; *w_{Or}*, *w^t_{Or}*, *w^a_{Or}*, *w^{sat}_{Or}*), что позволило корректно оценить вклад аллелей данного локуса в проявление количественных признаков.

Исходные линии и линии, выравненные по генотипу, содержали в культуральных сосудах на стандартной сахарно-дрожжевой среде в термостате при температуре 23°C. Разделение имаго по полу осуществляли в течение первых суток после выхода из пупариума. В эксперимент брали только виргинных особей. Для наркотизации использовали диэтиловый эфир.

Локомоторную активность имаго дрозофилы оценивали индивидуально по методике открытого поля (Connolly, 1967). Мух помещали в чашку Петри, дно которой было расчерчено на квадраты со стороной 5 мм. Спустя 5 мин, необходимых мухе для адаптации в новых условиях, определяли суммарную длину пробега каждой особи, которую выражали в условных единицах (1 ед.=5 мм). ЛА самцов и самок каждой линии оценивали отдельно.

Полученные в ходе эксперимента данные были обработаны статистически. Для оценки влияния особенностей генотипа на изучаемый показатель ЛА использовали дисперсионный анализ. Силу влияния оценивали по методу М.Снедекора. Для оценки корреляционных связей между исследуемым

признаком и степенью пигментации применяли коэффициент корреляции рангов К.Спирмена (Лакин, 1990). Для статистической обработки данных использовали программу STATISTICA 6.0.

Результаты

Анализ локомоторной активности самок и самцов исходных мутантных линий показал, что максимальным уровнем изучаемого признака характеризуется линия w^{sat} (♀: $89,37 \pm 5,8$; ♂: $128,04 \pm 8,92$), а наименьшим – w^1 (♀: $30,75 \pm 3,63$; ♂: $39,49 \pm 4,72$).

Локомоторная активность особей дикого типа составила для линии C-S у самок $87,67 \pm 6,94$, а у самцов $116,4 \pm 7,14$; для линии Or у самок $17,81 \pm 1,84$, а у самцов – $24,76 \pm 2,97$.

При сравнении ЛА самок исходных мутантных линий и линий с выравненным генетическим фоном (C-S) (рис. 1) наблюдаются изменения изучаемого признака: увеличение у линий w^{C-S} , w^{tC-S} , w_{C-S} , линия w^{satC-S} сохраняет значение уровня ЛА, наблюдаемое в исходной мутантной линии w^{sat} .

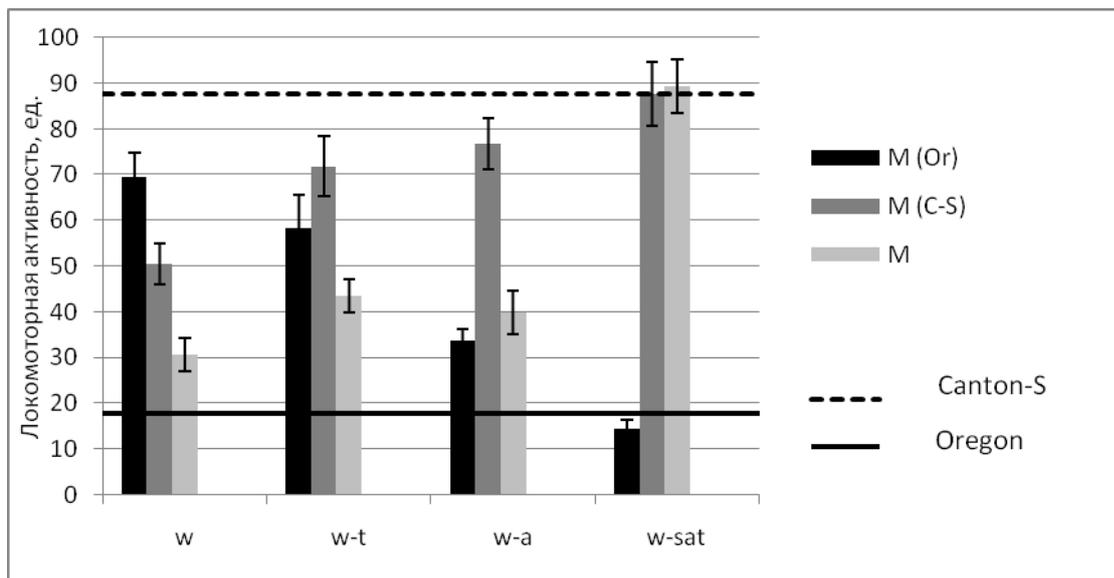


Рис. 1. Локомоторная активность самок исходных линий и линий с выравненным генотипом

В результате анализа локомоторной активности линий самок w , w_{C-S} и w_{Or} было выявлено следующее распределение среднего значения уровня ЛА: $w < w_{C-S} < w_{Or}$, которое, по всей видимости, связано с сочетанным действием аллеля *white* и генетического фона, что подтверждают данные двухфакторного дисперсионного анализа (табл. 1).

При сравнении значений ЛА у самок мутантных линий и линий с выравненным генетическим фоном (Or) наблюдаются следующие различия – статистически значимое увеличение изучаемого признака в линии w_{Or} и уменьшение его в линии w^{satOr} по сравнению с мутантными линиями на генетическом фоне C-S.

Подобные результаты анализа локомоторной активности были получены и у самцов всех тестируемых линий (рис. 2.).

Корреляционный анализ показал наличие прямой связи между степенью пигментации глаз и ЛА особей для самок M_{C-S} ($r_s=0,36$, $t=8,602$, $p<0,05$) и самцов M_{C-S} ($r_s=0,29$, $t=6,69$, $p<0,05$); для самок M_{Or} корреляционный анализ выявил сильную отрицательную связь ($r_s=-0,54$, $t=-12,72$, $p<0,05$), а для самцов M_{Or} ($r_s=-0,36$, $t=-7,69$, $p<0,05$).

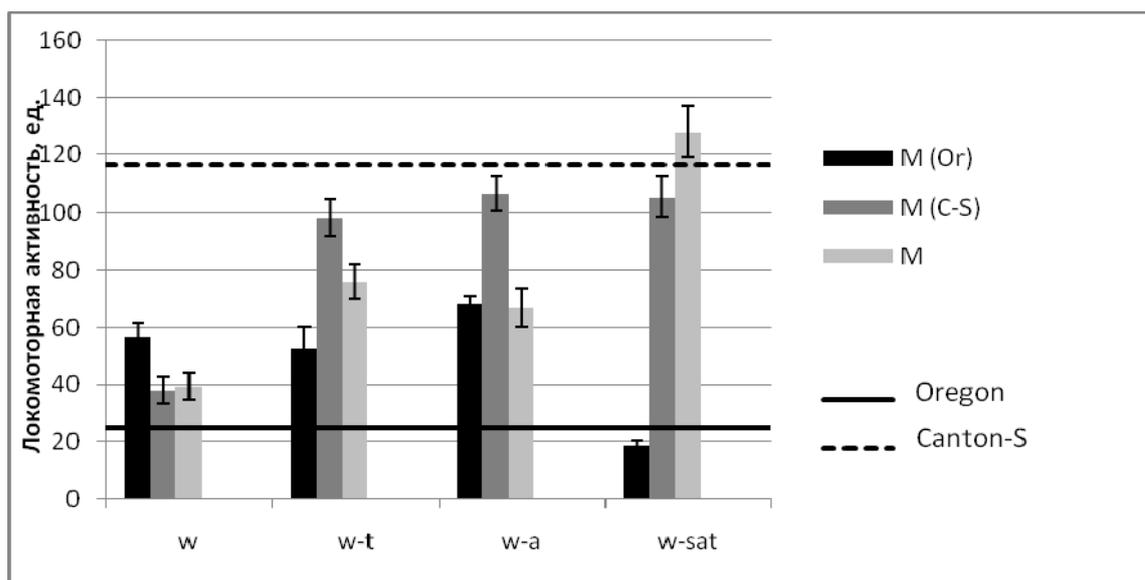


Рис. 2. Локомоторная активность самцов исходных линий и линий с выравненным генетическим фоном

В ходе проведенного анализа локомоторной активности самок и самцов имаго дрозофилы было оценено влияние аллелей локуса *white* и генетического фона на изучаемый признак. Для этого нами был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, который показал, что для самок и самцов исследуемых линий характерно действие как аллеля, так и генетического фона. Для самок, несущих аллель w^t и w^a (табл. 1), было выявлено достоверное влияние ($p < 0,005$) соответствующего аллеля на признак ЛА (сила влияния составила $F=48$ и $F=165$ соответственно). Однако для самцов достоверное влияние аллеля на формирование ЛА было обнаружено только для имаго с генотипом w ($F=46,44$; $p < 0,005$). Статистически значимое влияние генетического фона на формирование изучаемого признака было установлено для самок с генотипом w^t ($F=45$; $p < 0,005$) и для самцов с генотипами w^t , w^a и w^{sat} ($F=30,84$; $32,63$ и $30,84$ соответственно). Для самок с генотипами w , w^a и w^{sat} обнаружено статистически значимое влияние как исследуемого аллеля, так и генетического фона ($F=600$; $333,3$ и $37,54$ соответственно).

Таблица 1.

Вклад аллелей и генетического фона в признак ЛА у самок

Генотип	Действующий фактор	F	$h^2_x \pm s_h$
w	Аллель	-	-
	Генетический фон	2,9	$0,087 \pm 0,003$
	Совм. действие	600	$0,6 \pm 0,001$
w^t	Аллель	48	$0,12 \pm 0,025$
	Генетический фон	45	$0,09 \pm 0,002$
	Совм. действие	-	-
w^a	Аллель	165	$0,33 \pm 0,002$
	Генетический фон	-	-
	Совм. действие	333,3	$0,84 \pm 0,00252$
w^{sat}	Аллель	2,14	$0,006 \pm 0,0028$
	Генетический фон	1,775	$0,9951 \pm 0,00276$
	Совм. действие	37,54	$0,095 \pm 0,00253$

* жирным шрифтом показано статистически значимое влияние исследуемых факторов.

Таблица 2.

Вклад аллелей и генетического фона в признак ЛА у самцов

Генотип	Действующий фактор	F	$h^2 \pm s_h$
<i>w</i>	Аллель	46,44	0,1138±0,00245
	Генетический фон	-	-
	Совм. действие	48,77	0,119±0,00244
<i>w^t</i>	Аллель	-	-
	Генетический фон	30,84	0,0771±0,0025
	Совм. действие	17,81	0,0463±0,0026
<i>w^a</i>	Аллель	-	-
	Генетический фон	32,63	0,0806±0,00247
	Совм. действие	16,37	0,04206±0,00257
<i>w^{sat}</i>	Аллель	-	-
	Генетический фон	30,84	0,0771±0,0025
	Совм. действие	17,81	0,0463±0,0026

* жирным шрифтом показано статистически значимое влияние исследуемых факторов.

Обсуждение

Многие мутации, которые имеют определенное морфологическое проявление и для которых известны механизмы блокирования тех или иных метаболических процессов, оказывают влияние на поведение. В данном исследовании нами было показано, что ЛА имаго дрозофилы определяется генотипом в целом, а аллели локуса *white* по-разному влияют на показатели ЛА на разном генетическом фоне: на генетическом фоне линии *C-S* наблюдается уменьшение ЛА по сравнению с линией *C-S*, а на генетическом фоне линии *Or* – увеличение данного показателя по сравнению с линией *Or*. Следует отметить, что вариация уровня локомоторной активности зависит от стадии, на которой произошел блок синтеза глазных пигментов. При этом, чем более раннюю стадию метаболизма нарушает мутация, тем сильнее ее угнетающее действие на двигательную активность.

Известно, что мутации в гене *white⁺* приводят к нарушению транспорта обоих предшественников пигментов – триптофана и гуанина, которые также участвуют в биосинтезе нейромедиаторов – допамина, серотанина, октопамина. van Swinderen и Andretic (2011) показали, что допамин регулирует процессы возбуждения нервно-мышечных тканей, локомоцию; серотонин регулирует процессы передачи нервных импульсов, используя зрительные пути, циркадные ритмы, играет роль в формировании механизмов памяти (Chen et al., 1999; Yuan et al., 2006; Sitaraman et al., 2008); октопамин является структурно подобным норадреналину и осуществляет регуляцию локомоции личинок 3 возраста (Saraswati et al., 2004; Fox et al., 2006). Так, особи с мутацией *w^{sat}* (и самки, и самцы) имеют среди всех изученных мутаций наиболее высокие значения уровня ЛА. Такой эффект можно объяснить тем, что в пигментных гранулах при данной мутации обнаруживается 79% ксантомматина, который участвует в обмене триптофана до стадии превращения кинуренина в 3-гидроксикинуренин. Однако накопление 3-ГК у мутантов *w^{sat}_{C-S}* и *w^{sat}_{Or}* не оказывает существенного влияния на поведение, так как не обнаружена статистически значимая разница в ЛА по сравнению с линиями *C-S* и *Or*. По-видимому, отсутствие выраженного эффекта можно объяснить, принимая во внимание механизм действия 3-гидроксикинуренина, а именно то, что он связан с генерацией окислительных радикалов и оксидативным стрессом (Захаров и др., 2011). Следует отметить значимое влияние генетического фона на формирование двигательного поведения, что подтверждают данные двухфакторного дисперсионного анализа (табл. 1 и 2). Как известно, мутанты *white* характеризуются отсутствием кинуренинов в организме – происходит блокировка на стадии превращения триптамина в триптофан, что вызывает отличия в локомоторной активности в сравнении как с другими аллелями локуса *white*, так и с особями дикого типа. Таким образом, можно предположить, что лишение всех кинуренинов приводит к ингибированию многих звеньев сигнального пути – рецепторы глутамата – актин цитоскелета – снижению уровня экспрессии NR2 субъединицы NMDA-рецептора, PSD-95, LIMK-1, которые имеют важное значение в регуляции функции мозга, а также поведения в норме и при различных патологиях, например при эпилепсии, нейродегенерации (Лопатина и др., 2007).

Важную роль в реализации процесса приспособленности организмов играет механизм активации мобильных генетических элементов (МГЭ). МГЭ различных семейств могут составлять значительную часть генома (до 10% у дрозофилы). Таким образом, можно предположить, что одной из причин влияния аллелей локуса *white* на локомоторную активность является наличие в тех или иных аллелях МГЭ. Известно, что мутация *white* возникла в результате встраивания мобильного элемента *Dos* (подкласс nonLTR-ретротранспозоны, группа LINE – long interspersed nuclear element), а мутация *w^a – copia* (подкласс LTR-ретротранспозоны) (Васильева и др., 2011). Образование аллелей локуса *white* мобильными элементами, путем встраивания их в разные регионы – кодирующие или некодирующие, в дистальные или центральные области – подавляют экспрессию гена *white*, приводят к нарушениям целого ряда биохимических путей, ответственных за синтез нейропептидов, что влечет за собой формирование патологического поведения.

Данные двухфакторного дисперсионного анализа влияния аллелей локуса *white* и генетического фона на признак ЛА самцов *Drosophila melanogaster* показали достоверное влияние генетического фона в 3 из 4 изученных случаев (табл. 2). Полученные результаты приведения отдельных мутаций на общий генетический фон согласуются с данными других авторов (Волкова та ін., 2011) о влиянии генетических перестроек (замещение отдельных хромосом, изогенизация хромосом, инбридинг) на адаптивно важные компоненты приспособленности (половое поведение, продолжительность жизни).

Таким образом, формирование признака локомоторной активности осуществляется под контролем всего генотипа как целостной структуры.

Список литературы

- Васильева Л.А., Антоненко О.В., Захаров И.К. Роль мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т.14, №2. – С. 225–260. /Vasil'yeva L.A., Antonenko O.V., Zakharov I.K. Rol' mobil'nykh geneticheskikh elementov v genome Drosophila melanogaster // Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii. – 2011. – T.14, №2. – S. 225–260./
- Волкова Н.Є., Григор'єв Д.С., Костенко В.В., Воробйова Л.І. Вплив штучних перебудов генотипу на адаптивно значущі ознаки поведінки *Drosophila melanogaster* // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Серия: биология. – 2011. – Вып.14, №971. – С. 82–91. /Volkova N.Ye., Grigor'yev D.S., Kostenko V.V., Vorobyova L.I. Vplyv shtuchnykh perebudov genotypu na adaptivno znachushhi oznaky povedinky Drosophila melanogaster // Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2011. – Vyp.14, №971. – S. 82–91./
- Захаров Г.А., Журавлев А.В., Паялина Т.Л. и др. Влияние мутаций кинуренинового пути обмена триптофана у *D. melanogaster* на локомоторное поведение и экспрессию генов глутаматергической и холинергической системы // Экологическая генетика. – 2011. – Т.9, №2. – С. 65–73. /Zakharov G.A., Zhuravlev A.V., Payalina T.L. i dr. Vliyaniye mutatsiy kinureninovogo puti obmena triptofana u D. melanogaster na lokomotornoye povedeniye i ekspressiyu genov glutamatergicheskoy i kholinergicheskoy sistemy // Ekologicheskaya genetika. – 2011. – T.9, №2. – S. 65–73./
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва: Высшая школа, 1990. – 351с. /Lakin G.F. Biometriya. – Moskva: Vysshaya shkola, 1990. – 351s./
- Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Чеснокова Е.Г., Савватеева-Попова Е.В. Мутации структурных генов ферментов метаболизма триптофана по кинурениновому пути в модуляции звеньев сигнального каскада – рецепторы глутамата – актин цитоскелета // Генетика. – 2007. – Т.43, №10. – С. 1396–1401. /Lopatina N.G., Zachepilo T.G., Chesnokova Ye.G., Savvateyeva-Popova Ye.V. Mutatsii strukturnykh genov fermentov metabolizma triptofana po kinureninovomu puti v modulyatsii zven'yev signal'nogo kaskada – retseptory glutamata – aktin tsitoskeleta // Genetika. – 2007. – T.43, №10. – S. 1396–1401./
- Никоро З.С., Васильева Л.А. Проблема изменчивости и отбора по количественным признакам на примере популяции *Drosophila* / В кн.: Дрозофила в экспериментальной генетике. – Новосибирск: Наука, 1978. – С. 196–243. /Nikoro Z.S., Vasil'yeva L.A. Problema izmenchivosti i otbora po kolichestvennym priznakam na primere populyatsii Drosophila / V kn.: Drozofila v eksperimental'noy genetike. – Novosibirsk: Nauka, 1978. – S. 196–243./
- Chen B., Meinertzhagen I.A., Shaw S.R. Circadian rhythms in light-evoked responses of the fly's compound eye, and the effects of neuromodulators 5-HT and the peptide PDF // J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol. – 1999. – Vol.185. – P.393.
- Connolly K. Locomotor activity in *Drosophila* // Anim. Behav. – 1967. – Vol.14. – P. 444–449.
- Erhardt S., Schwieler L., Nilsson L. et al. The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia // Physiol. Behav. – 2007. – Vol.92 (1-2). – P. 203–209.
- Ewart G.D., Howells A.J. *Drosophila* eye pigmentation ABC transporters // Methods in enzymology. – 1998. – Vol.292. – P.213.

Fox L.E., Soll D.R., Wu C.F. Coordination and modulation of locomotion pattern generators in *Drosophila* larvae: effects of altered biogenic amine levels by the tyramine Beta hydroxylase mutation // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol.26. – P. 1486–1498.

Jordan K.W., Morgan Th.J., Mackay T.F.C. Quantitative trait loci for locomotion behavior in *Drosophila melanogaster* // *Genetics.* – 2006 – Vol.174. – P. 277–278.

Liu L., Davis R.L., Roman G. Exploratory activity in *Drosophila* requires the kurtz nonvisual arrestin // *Genetics.* – 2007. – Vol.175, №3. – P. 1197–1212.

Saraswati S., Fox L.E., Soll D.R., Wu C.F. Tyramine and octopamine have opposite effects on the locomotion of *Drosophila* larvae // *J. Neurobiol.* – 2004. – Vol.58. – P. 425–441.

Sitaraman D., Zars M., LaFerriere H. et al. Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila* // *PNAS.* – 2008. – Vol.14. – P. 5579–5584.

Van Swinderen B., Andretic R. Dopamine in *Drosophila*: setting arousal thresholds in a miniature brain // *Proc. Biol. Sci.* – 2011. – Vol.278. – P. 906–13.

Yuan Q., Joiner W.J., Sehgal A. A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor 1A // *Curr. Biol.* – 2006. – Vol.16 (11). – P. 1051–1062.

Представлено: П.Ю.Монтвід / Presented by: P.Yu.Montvid

Рецензент: А.В.Некрасова / Reviewer: A.V.Nekrasova

Подано до редакції / Received: 17.10.2012