

УДК: 575.224:591.5:595.773.4

**Оценка межлинейных различий по компонентам приспособленности
линий *Drosophila melanogaster* с неврологическими нарушениями**
Е.В.Глянько, Л.И.Воробьева

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
glianko.e.v@gmail.com

Изучены компоненты приспособленности и локомоторная активность линий *Sh*¹⁴, *slo*¹, *para*^{ST76} *Drosophila melanogaster* с неврологическими мутациями, затрагивающими работу ионных каналов, в сравнении с линиями дикого типа Canton-S и Oregon. Установлено влияние генотипа на плодовитость, жизнеспособность, а также локомоторную активность имаго данных линий. Половые различия по локомоторной активности были обнаружены только для линии дикого типа C-S. Обсуждается влияние нарушений в работе ионных каналов на механизмы нейродегенераций и формирование приспособленности у дрозофилы.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, неврологические мутации, ионные каналы, локомоторная активность, плодовитость.

**Оцінка міжлінійних відмінностей за компонентами пристосованості ліній
Drosophila melanogaster із неврологічними відхиленнями**
О.В.Глянько, Л.И.Воробйова

Вивчено компоненти пристосованості та локомоторну активність ліній *Sh*¹⁴, *slo*¹, *para*^{ST76} *Drosophila melanogaster* з неврологічними мутаціями, що впливають на роботу іонних каналів, в порівнянні з лініями дикого типу Canton-S і Oregon. Встановлено вплив генотипу на плодючість, життєздатність, а також локомоторну активність имаго даних ліній. Статеві відмінності за локомоторною активністю були виявлені лише для лінії дикого типу C-S. Обговорюється вплив порушень в роботі іонних каналів на механізми нейродегенераций та формування пристосованості у дрозофіли.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, неврологічні мутації, іонні канали, локомоторна активність, плодючість.

Evaluation of interstrain differences in fitness components of *Drosophila melanogaster* strains with neurological disorders
E.V.Glianko, L.I.Vorobyova

Some components of fitness and locomotor activity of *Drosophila melanogaster* strains *Sh*¹⁴, *slo*¹, *para*^{ST76} with neurological mutations that affect ion channels have been studied in comparison to wild type strains Canton-S and Oregon. The genotype influence on fertility, vitality and locomotor activity of imago has been observed. Sex differences in locomotor activity were established only for a wild type strain C-S. Abnormal work of ion channels effect on mechanisms of neurodegenerations and the formation of fitness of drosophila is discussed.

Key words: *Drosophila melanogaster*, neurological mutations, ion channels, locomotor activity, fertility.

Введение

В последние десятилетия возросло количество работ по изучению нейродегенераций у животных в связи с огромным значением данных исследований для понимания молекулярного и клеточного патогенеза нейродегенеративных болезней человека. Одним из научных направлений является определение специфических мутаций в случаях семейных нейродегенеративных заболеваний, а другим – моделирование этих нарушений на модельных организмах. Поскольку было выяснено, что около 75% генов человека и *D. melanogaster* обладают высокой степенью гомологии, дрозофила показала себя идеальным модельным объектом для такого рода исследований (Fortini et al., 2000). Использование дрозофилы для определения молекулярных путей, которые лежат в основе нейродегенеративных процессов, поможет существенно улучшить понимание патогенеза заболеваний человека, а также способствовать созданию новых терапевтических решений. С помощью дрозофилы также можно изучать молекулярные и клеточные изменения соответствующих групп клеток мозга на

различных стадиях болезни, от предсимптомальной стадии до полноценного проявления (Bingwei, 2009). Поскольку при многих нейродегенеративных заболеваниях нарушается локомоторное поведение, один из способов разработки лекарственных средств основан на поиске фармакологических агентов, корректирующих нарушения локомоции у модельных объектов.

Так, несмотря на частоту встречаемости случаев эпилепсии в современном обществе и огромному вниманию ученых к этому заболеванию, генетическая и физиологическая основа эпилепсии все еще не ясна. Приступы эпилепсии у человека могут носить случайный характер и происходить в результате физического повреждения мозга при травме головы или после перенесенной болезни (Parker et al., 2011). Однако главным источником восприимчивости к приступам является генетическая предрасположенность. Большое количество и сложный характер взаимодействия вовлеченных в данное заболевание генов усложняет понимание разных факторов, лежащих в основе этиологии эпилепсии. В связи с этим самыми удобными для исследования являются случаи данной болезни, вызванные нарушениями в работе ионных каналов. Благодаря наличию сходств на клеточном и субклеточном уровнях организации нервной системы дрозофилы и млекопитающих плодовая мушка успешно используется в качестве объекта для моделирования данной группы нейродегенераций. В частности, высокой гомологией обладают Na^+ , K^+ и Ca^{2+} ионные каналы. Интегральные мембранные белки, называемые ионными каналами, опосредуют потоки таких ионов, как натрий, калий и кальций, что лежит в основе возникновения и распространения электрических сигналов. Мутации, влияющие на ионные каналы и пластичность нейронных мембран, как у дрозофилы, так и у других организмов характеризуются критичным влиянием на признаки поведения и функционирование нервной системы (Fergestad et al., 2006). Однако продолжительный эффект этих нарушений на поддержание нейронной жизнеспособности не был подробно изучен. В данной работе были исследованы мутации *Shaker*, *slowpoke* и *paralytic*, нарушающие работу натриевых и калиевых каналов, для определения их влияния на показатели приспособленности дрозофилы.

В качестве показателей приспособленности исследованы локомоторная активность, жизнеспособность и плодовитость особей *D. melanogaster*.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили линии *D. melanogaster* с нейробиологическими мутациями *Shaker* (*Sh¹⁴*), *slowpoke* (*slo¹*) и *paralytic* (*para^{ST76}*), а в качестве контроля – две линии дикого типа, контрастные между собой по ряду показателей приспособленности, Canton-S (C-S) и Oregon (Or). Исследуемые в данной работе локусы кодируют структурные компоненты трех разных видов ионных каналов: *slowpoke* – Ca^{2+} зависимого K^+ канала, *Shaker* – потенциал-зависимого K^+ канала, *paralytic* – потенциал-зависимого Na^+ канала (Atkinson et al., 1991). Морфологически мутации проявляются следующим образом: мутация *slowpoke* вызывает нарушение циркадного ритма и процесса ухаживания у самцов, при температуре 38°C имаго демонстрируют нескоординированные движения и неспособность взбираться по вертикальной поверхности; мутация *Shaker* вызывает редкие вздрагивания и подергивания у взрослых особей, нарушения сна и циркадного ритма; мутация *paralytic* вызывает температурно-зависимый обратимый паралич при воздействии повышенной температуры (29–30°C) как у взрослых особей, так и у личинок (LeDoux, 2005; Atkinson et al., 1991). Мутации *slo* и *Sh* также вызывают аномальную дрожь конечностей при наркотизации диэтиловым эфиром.

Исследуемые линии мух содержали в пробирках на стандартной сахарно-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. Для наркотизации использовали диэтиловый эфир.

Жизнеспособность оценивали по количеству вылетевших потомков от скрещивания одной пары особей. Для этого виргинных самок и самцов каждой линии (возраст – 3 суток) помещали в пробирки со средой в количестве 1 ♀ и 1 ♂. Период яйцекладки составил 5 суток. Затем родительских особей изымали. В каждой линии было изучено по 30 семей. Плодовитость оценивали по количеству пупариумов в каждой семье после вылета имаго. При подсчете плодовитости также учитывали количество особей, погибших на стадии метаморфоза. Подсчет особей, погибших на стадии куколки, проводили на пятые сутки после начала выхода имаго.

Локомоторную активность имаго дрозофилы оценивали индивидуально по методике открытого поля (Conolly, 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.

Полученные в ходе эксперимента данные были обработаны статистически. Для оценки влияния генотипа на изучаемые показатели использовали дисперсионный анализ. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента. Силу влияния оценивали по методу М.Снедекора (Лакин, 1990). Для статистической обработки данных использовали программу STATISTICA 6.0.

Результаты

Изучение плодовитости данных линий показало, что максимальным значением данного признака характеризуется линия дикого типа C-S, а минимальным – *slo* ($p < 0,01$). Линии с нейрологическими мутациями *Sh*, *para* и *slo* имеют более низкие значения плодовитости по сравнению с изучаемыми линиями дикого типа ($p < 0,01$). Достоверных отличий между линиями C-S и Or не обнаружено. Дисперсионный анализ показал влияние генотипа ($p < 0,01$) линий на плодовитость имаго *D. melanogaster*. Однако достоверных различий между самками и самцами по показателю жизнеспособности не было выявлено.

Таблица 1.

Показатели приспособленности изучаемых линий *D. melanogaster*

Линии <i>D. melanogaster</i>		Жизнеспособность	Плодовитость	% леталей
C-S	♀	62,65±2,03	129,9±3,4	3,7±0,27
	♂	61,22±2,24		
Or	♀	59,75±7,71	124,7±3,9	5,5±0,5
	♂	57,18±7,38		
<i>Sh</i>	♀	50,3±3,02	110,8±4,77	10,35±1,11
	♂	50,1±2,71		
<i>para</i>	♀	47,12±2,15	96,4±4,2	12,23±3,1
	♂	49,34±1,82		
<i>slo</i>	♀	30,73±2,33	73,2±2,46	11,87±1,92
	♂	29,67±1,12		

При исследовании жизнеспособности учитывали % леталей на стадии метаморфоза. Все линии с нейрологическими мутациями, изученные в данной работе, имеют более высокий процент леталей на стадии куколки по сравнению с линиями дикого типа C-S и Or ($p < 0,01$).

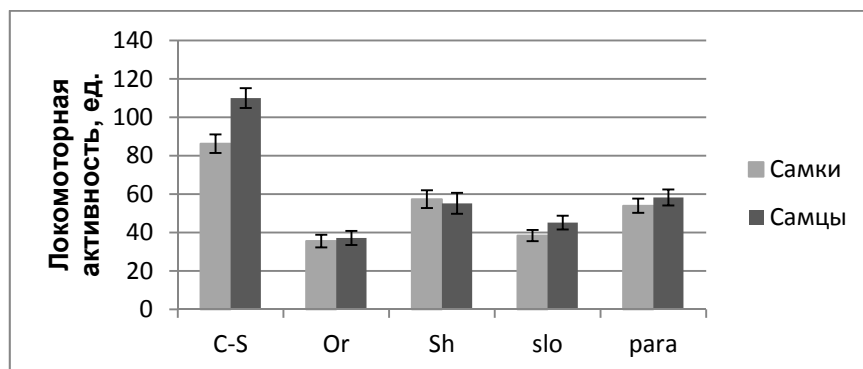


Рис. 1. Локомоторная активность имаго линий C-S, Or, Sh, para и slo *D. melanogaster*

Анализ локомоторной активности имаго мутантных линий дрозофилы показал, что наибольшим уровнем данного показателя характеризуются линии *Sh* и *para*, а наименьшим – линия *slo*. Локомоторная активность особей дикого типа составила для линии C-S у самок 86,23±4,85, а у самцов

109,98±5,13; для лінії Or у самок 35,53±3,31, а у самців – 37,16±3,65. Мутантні лінії *Sh*, *para* і *slo* мають достовірно більш низку двигательну активність по порівнянню з C-S. Для ліній з нейрологічними мутаціями, а також для Or не виявлені полові розлики по данному признаку. Тільки у лінії Canton-S обнaружена більш висока локомоторна активність самців по порівнянню з самками данної лінії ($p < 0,01$).

Таблиця 2.

Показатели локомоторной активности изучаемых линий *D. melanogaster*

Линии <i>D. melanogaster</i>	ЛА имаго		% неподвижных имаго	
	♀	♂	♀	♂
C-S	86,23±4,85	109,98±5,13	11,3	6,7
Or	35,53±3,31	37,16±3,65	35,3	36
<i>Sh</i>	57,35±4,61	55,18±5,45	25,3	37,3
<i>para</i>	53,94±3,67	58,21±4,18	26	21,3
<i>slo</i>	38,42±2,93	45,12±3,58	29	27,6

Двухфакторный дисперсионный анализ подтвердил влияние как генотипа линий на показатель локомоторной активности ($F=105$; $p < 0,001$), так и суммарное влияние генотипа и пола ($F=4$; $p < 0,01$). Влияние только пола на показатель локомоторной активности оказалось достоверным для одной линии – C-S. Сила влияния генотипа на показатель локомоторной активности для этой линии составляет 21% ($p < 0,05$), а сила общего влияния генотипа и пола – 2% ($p < 0,01$).

При измерении локомоторной активности учитывался также процент неподвижных особей. Самый низкий процент неподвижных особей наблюдался у самцов и самок линии Canton-S (6,7% и 11,3% соответственно).

Различия по данному признаку ($p < 0,05$) обнаружены при сравнении каждой из трех мутантных линий с линией дикого типа C-S. Достоверного влияния пола на исследуемый показатель не было обнаружено.

Обсуждение

Приспособленность к различным условиям существования является важным адаптивным свойством организма и определяется в первую очередь репродуктивным успехом. Такие показатели, как жизнеспособность и плодовитость являются важнейшими компонентами приспособленности и оказывают непосредственный вклад в формирование данного признака, как для отдельных организмов, так и для вида в целом. Поведенческие процессы являются многоуровневыми и основываются на деятельности широкого спектра генов, действующих в различных условиях жизни организмов. Локомоторная активность, как важный компонент приспособленности и составляющая более сложных реакций нервной системы, лежит в основе почти всех поведенческих реакций организмов (Jordan et al., 2006).

В данной работе были изучены компоненты приспособленности мутантных линий дрозофилы с нарушенным уровнем возбудимости нейронных мембран. Мутации калиевого канала *Sh* и *slo* приводят к увеличению нейронной пластичности, в то время как мутация Na^+ канала *para* приводит к снижению пластичности нейронных мембран. Несмотря на то, что для этих мутаций не характерна значительно сниженная продолжительность жизни (Fergestad et al., 2006), у них наблюдается различный уровень нейродегенераций.

Изучение основных компонентов приспособленности мутантных линий *Sh*, *para* и *slo* показало, что линия *slo* оказалась наименее приспособленной по ряду показателей: имаго данной линии обладали наименьшей плодовитостью и локомоторной активностью. Снижение плодовитости *slo* может быть результатом нарушений полового поведения, а именно процессов ухаживания самцов (Peixoto, Hall, 1998), что не может не сказываться на данном показателе. Интересно, что согласно литературным

данным тяжесть нейродегенераций мутантов Na⁺ канала оказывается выше по сравнению с таковой у мутантов K⁺ канала. Вероятно, такие отличия от теоретически ожидаемых результатов можно объяснить тем, что в эксперименте учитывали показатели молодых имаго (в возрасте 3–5 дней), в то время как нейродегенерации являются возраст-зависимыми нарушениями. Данное предположение требует последующего изучения показателей приспособленности в процессе старения.

Анализ локомоторной активности показал контрастные результаты для линий дикого типа C-S и Or. Такие отличия, возможно, связаны с тем, что данные линии различаются по цитотипу, а именно, по типам МГЭ систем гибридного дисгенеза: Oregon-R – имеет H-цитотип и содержит активные *hobo*-элементы, а Canton-S – имеет I-цитотип и содержит *I*-элементы (Ратнер и др., 1993). Тот факт, что у линий с нейрологическими нарушениями *Sh*, *para* и *slo*, а также линии Or отсутствуют половые различия по показателю локомоторной активности, может свидетельствовать о снижении эволюционной пластичности популяций, поскольку для природных популяций характерна более высокая двигательная активность самцов по сравнению с самками.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что нарушения в работе ионных каналов у изученных мутантных линий оказывает непосредственное влияние на ряд показателей приспособленности и влияют не только на поведенческие реакции, но и на такие важные показатели, как жизнеспособность и плодовитость.

Список литературы

- Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва: Высшая школа, 1990. – 351с. /Lakin G.F. Biometriya. – Moskva: Vysshaya shkola, 1990. – 351s./
- Ратнер В.А., Васильева Л.А. Мобильные генетические элементы (МГЭ) и эволюция геномов // Современные проблемы теории эволюции. – М.: Наука, 1993. – С. 43–59. /Ratner V.A., Vasilyeva L.A. Mobilnyye genicheskiye elementy (MGE) i evolutsiya genomov. – M.: Nauka, 1993. – S. 43–59./
- Atkinson N.S., Robertson G.A., Ganetzky B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus // Science. – 1991. – Vol.253. – P. 551–555.
- Bingwei L. Recent advances in using *Drosophila* to model neurodegenerative diseases // Apoptosis. – 2009. – Vol.14. – P. 1008–1020.
- Connolly K. Locomotor activity in *Drosophila* // Anim. Behav. – 1967. – Vol.14. – P. 444–449.
- Fergestad T., Ganetzky B., Palladino M.J. Neuropathology in *drosophila* membrane excitability mutants // Genetics. – 2006. – Vol. 172 (2). – P. 1031–1042.
- Fortini M. E., Skupski M. P., Boguski M. S., Hariharand I.K. A survey of human disease gene counterparts in the *drosophila* genome // J Cell Biol. – 2000. – Vol.150 (2). – P. 23–30.
- 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.
- LeDoux M.S. Movement disorders: genetics and models. – Academic Press, 2005. – P. 487–504.
- Parker L., Howlett I.C., Rusan Z.M., Tanouye M.A. Seizure and epilepsy: studies of seizure disorders in *drosophila* // Int. Rev. Neurobiol. – 2011. – Vol.99. – P. 1–21.
- Peixoto A.A., Hall J.C. Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of *Drosophila* // Genetics. – 1998. – Vol.148 (2). – P. 827–838.

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

Рецензент: Н.С.Волкова / Reviewer: N.Ye.Volkova

Подано до редакції / Received: 15.05.2014