

The data presented concerning events on periimplantation period control, which is accomplished with the help of ovarian factors.

ВОЛКОВА Н.С., ВОРОБІЙОВА Л.І.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Україна, 61077, Харків, пл. Свободи 4, e-mail: volkova_natalya@bk.ru

ВПЛИВ ПІГМЕНТНИХ МУТАЦІЙ НА СТАТЕВУ ПОВЕДІНКУ *Drosophila melanogaster*

На сучасному етапі розвитку нейрогенетики та генетики поведінки триває пошук та дослідження зручних моделей, які дозволили б аналізувати генетичну структуру комплексних ознак поведінки людини як в нормі, так і при різних патологіях. Досить широкого вжитку набув у зазначеній галузі і класичний об'єкт генетичних досліджень – *Drosophila melanogaster* [1, 2], адже ключові сполуки та біохімічні реакції, що забезпечують функціонування нервової системи, а відповідно і формування фенотипу поведінки, є надзвичайно еволюційно консервативними. Більш того, за результатами проєктів “Геном дрозофіли” та “Геном людини” було встановлено цілу низку генів, які є гомологічними для видів *D. melanogaster* та *Homo sapiens* (www.FlyBase.com). Дане дослідження мало на меті вивчити вплив деяких генів, які контролюють певні реакції обміну амінокислот, що є джерелом нейроактивних речовин, на статеву поведінку *D. melanogaster*.

Матеріали та методи

Вихідний матеріал: лінії *D. melanogaster* з колекції кафедри генетики і цитології ХНУ ім. В.Н. Каразіна: *Canton-S (C-S)*, *Oregon (Or)* – інбредні лінії дикого типу та у (1 – 0.0) – жовте тіло, *w* (1 - 1.5) – білі очі, *w^a* (1 - 1.5) – абрикосові очі, *b* (2 – 48.5) – чорне тіло, *cn* (2 - 57.5) – кіноварні очі – аутбредні мутантні лінії. Для всіх зазначених генів виявлені гомологічні послідовності у геномі *Homo sapiens* (www.FlyBase.com). Лінії утримували у культуральних склянках (висота 10 см; діаметр 2,0 см; об'єм поживного середовища у склянці – 5 мл) на стандартному дріжджовому середовищі у термостаті ($t=23\pm 1^\circ\text{C}$). У експеримент брали лише віргіних статевозрілих особин (вік – 3 доби). До досягнення необхідного віку самців та самиць утримували окремо. Статеву активність самців визначали за кількістю останніх, які здійснили парування упродовж 1 години [3, 4]. Для цього особин поміщали до тестерної камери у співвідношенні $2n\text{♀} : n\text{♂}$, де n – кількість особин (5 ± 2), та фіксували відсоток особин чоловічої статі, які здійснили парування упродовж 1 години. Аналіз статевої рецептивності самиць проводили аналогічно, але особин брали у співвідношенні $n\text{♀} : 2n\text{♂}$ та фіксували долю самиць, які здійснили парування упродовж 1 години. Варіанти, коли жодна з пар у копуляцію не вступила, приймали за «0». Для вивчення впливу окремих локусів на статеву поведінку попередньо проводили насичуючі схрещування мутантних ліній с лінією *C-S* та з лінією *Or* в умовах направленої добору на маркерну мутацію та отримали вирівняні за генотипом мутантні лінії. Використовували методи статистичного аналізу: t -критерій Ст'юдента, дисперсійний аналіз кількісних ознак (силу впливу факторів (h_x^2) оцінювали за методом М. Снедекора) [5].

Результати та обговорення

Встановлено, що пігментні мутації, які призводять до порушень певних реакцій обміну амінокислот-джерел нейроактивних речовин, у низці випадків істотно впливають і на статеву поведінку особин *D. melanogaster* (Табл.1.). При цьому не спостерігається єдиноспрямованого пригнічення або стимуляції в наслідок заміщення генотипу мутантних особин, а напрямок впливу різних мутацій на статеву активність

самців та статеву рецептивність самиць відрізняється. За результатами дисперсійного аналізу міжлінійні розбіжності за статевою активністю самців зумовлені дією мутації ($F=30,7$; $p<0,001$) та результатом взаємодії мутантного гену з іншими генами генетичного фону ($F=49,4$; $p<0,001$). Аналогічні результати отримані для ознаки статевої рецептивності самиць ($F=20,9$; $p<0,001$ – вплив мутації; $F=7,9$; $p<0,001$ – вплив взаємодії мутантного гену з генами генетичного фону). Встановлений також вплив фактору хромосомної локалізації мутацій (локалізації у хромосомі 1 чи 2) на статевою активність самців ($F=48,4$; $p<0,001$): самці, мутантні за генами *b* та *cn* є більш активними у порівнянні з тими, які несуть мутацію у X-хромосомі.

Таблиця 1

Показники статевої поведінки вирівняних за генотипом мутантних ліній та вихідних ліній дикого типу

Лінія	Статева активність самців (%)			Статева рецептивність самиць (%)		
	$X \pm S_x$	$t(\Gamma\Phi)$	$p(\Gamma\Phi)$	$X \pm S_x$	$t(\Gamma\Phi)$	$p(\Gamma\Phi)$
<i>C-S</i>	55,68 ± 7,31	-	-	79,04 ± 3,58	-	-
<i>Or</i>	23,75 ± 4,07	-	-	47,19 ± 5,83	-	-
<i>y_{C-S}</i>	81,83 ± 3,91	3,15	<0,01	75,33 ± 3,13	0,78	> 0,05
<i>y_{Or}</i>	15,83 ± 3,21	0,75	> 0,05	77,50 ± 2,42	4,80	<0,001
<i>w_{C-S}</i>	24,56 ± 4,02	3,73	<0,001	33,33 ± 5,05	7,38	<0,001
<i>w_{Or}</i>	56,57 ± 0,77	8,91	<0,001	41,67 ± 5,79	0,67	> 0,05
<i>w^a_{C-S}</i>	45,99 ± 6,34	1,00	> 0,05	59,52 ± 3,70	3,79	<0,001
<i>w^a_{Or}</i>	8,10 ± 1,11	2,75	<0,01	37,00 ± 4,76	1,35	> 0,05
<i>b_{C-S}</i>	54,14 ± 7,44	0,15	> 0,05	38,33 ± 7,04	5,15	<0,001
<i>b_{Or}</i>	83,34 ± 3,09	12	<0,001	68,89 ± 1,80	3,55	<0,001
<i>cn_{C-S}</i>	53,33 ± 7,81	0,22	> 0,05	64,11 ± 6,61	1,98	<0,05
<i>cn_{Or}</i>	86,67 ± 3,50	12	<0,001	70,22 ± 4,37	3,16	<0,001

Примітка: $\Gamma\Phi$ – генетичний фон; t - критерій Ст'юдента; p – рівень значущості.

Кожна мутація (Табл. 2.), або як самостійний фактор, або у комбінації з іншими генами загального генетичного фону лінії впливає на статевою поведінку дрозофіли. Серед досліджуваних мутацій найбільш вираженим моногенним ефектом на статевою активність самців характеризується мутація *b* (Табл. 3), а на статевою рецептивність самиць – мутація *w*.

Таблиця 2

Вплив генетичних факторів на ознаки статевої поведінки *D. melanogaster* (F ; p)

Маркер лінії	Статева активність самців			Статева рецептивність самиць		
	Мутація	Ген. фон	Комбінація	Мутація	Ген. фон	Комбінація
<i>y</i>	4,31;<0,05	118,29;<0,001	8,29;<0,01	6,18;<0,05	12,12;<0,001	15,94;<0,001
<i>w</i>	0,14;>0,05	0,48;>0,05	59,52;<0,001	28,13;<0,001	4,7;<0,05	13,87;<0,001
<i>w^a</i>	5,19;<0,05	53,92;<0,001	0,002;>0,05	13,54;<0,001	31,77;<0,001	0,89;>0,05
<i>b</i>	27,13;<0,001	0,64;>0,05	34,73;<0,001	5,58;<0,05	0,01;>0,05	35,54;<0,001
<i>cn</i>	27,75;<0,001	0,18;>0,05	36,81;<0,001	0,05;>0,05	5,47;<0,05	11,98;<0,001

Мутації *w* та *w^a* є різними алелями одного гену [6], що утворюються внаслідок інсерцій у ген *w⁺* мобільних елементів різного типу: *Dos* – у випадку алелі *w* та *coria* – у випадку *w^a* [7]. Це дозволяє проаналізувати вплив алельного стану гену *w* і його взаємодії з загальним генетичним фоном на ознаки статевої поведінки. Встановлено, що алельний стан досліджуваного локусу може бути самостійним фактором впливу, як на статевою активність, так і на статевою рецептивність самиць. При цьому сила впливу складає 6,6 % і 15,6 % відповідно.

Таблиця 3

Сила впливу генетичних факторів на ознаки статевої поведінки *D. melanogaster*
 $h_x^2 \pm S_{hx^2}$ (%); p

Маркер лінії	Статева активність самців			Статева рецептивність самиць		
	Мутація	Ген. фон	Комбінація	Мутація	Ген. фон	Комбінація
<i>y</i>	1,7±0,84; >0,05	60±0,37; <0,001	7,5±2,3; >0,05	4,9±0,8; <0,05	10,5±0,8; <0,01	28±1,9; <0,01
<i>w</i>	-	-	66±0,85; <0,001	23,3±0,65; <0,01	3,2±0,82; >0,05	22,1±2,1; <0,01
<i>w^a</i>	7,2±0,79; <0,01	91±0,08; <0,001	-	12±0,79; <0,01	29,8±0,6; <0,01	-
<i>b</i>	17±0,7; <0,001	-	44±1,4; <0,001	3,4±0,82; <0,05	-	52±1,2; <0,01
<i>cn</i>	1,1±0,84; >0,05	-	53,8±1,2; <0,001	-	5,2±0,81; <0,01	25,4±1,9; <0,001

Щодо механізмів, які лежать в основі впливу досліджуваних мутацій на поведінку. Первинними продуктами активності генів *b* та *cn* є ферменти. Зокрема, продуктом гену *cn* – є фермент кінуренін-3-гідроксилаза [8]. В мутантів заблоковане гідроксилювання кінуреніну, що призводить до накопичення кінуренової кислоти [2]. Зазначимо, що накопичення кінуренової кислоти у мозку людини призводить до прояву симптомів шизофренії [9]. Можливим механізмом впливу генів *w*, *w^a* та *cn* на поведінку є участь ферментів кінуренінової гілки метаболізму триптофану та побічних метаболітів у модуляції окремих ланок сигнального каскаду “рецептори глутамату – актин цитоскелету” у надглотковому ганглії дрозофіли [10]. Відомо, що мутанти *b* дрозофіли не здатні синтезувати β-аланін та характеризуються зниженням аспартат декарбоксилазної активності. Як наслідок, спостерігається порушення меланіногенезу, процесу, що, у свою чергу, тісно пов’язаний з обміном катехоламінів, дофаміну зокрема [11, 12], який є нейромедіатором не тільки для досліджуваного виду, а й у для багатьох інших. Таким чином, на наш погляд, порушення активності генів *b* та *cn* є типовими ферментопатіями, які характеризуються чисельними системними порушеннями. Щодо гену *y*, продукт його активності, з одного боку, регулює інтенсивність та розташування меланіну в кутикулі [13], а отже може плейотропно впливати на обмін катехоламінів. З іншого боку, існує гіпотеза, що на ранніх стадіях розвитку дрозофіли Yellow-протеїн може діяти подібно до гормонів чи факторів росту та є одним з регуляторів *fruitless*-опосередкованої гілки детермінації статі [14], порушення якої спричиняють зміни стать-специфічної програми поведінки [15].

Висновки

Досліджений вплив пігментних мутацій, які призводять до порушень певних реакцій обміну амінокислот-джерел нейроактивних речовин, на статево поведінку *D. melanogaster*. Виявлений істотний моногенний ефект мутації *b* на статево активність самців та мутації *w* на статево рецептивність самиць. Встановлено, що алельний стан досліджуваного локусу може бути самостійним фактором впливу на ознаки статевої поведінки дрозофіли.

Література

1. Greenspan R.J., Dierick H.A. ‘Am not I a fly like thee?’ From genes in fruit flies to behavior in humans // Human Molecular Genetics. – 2004. – V.13, Iss.2. – P. 267-273.
2. Savvateeva E., Popov A., Kamyshev N. et al. Age-dependent memory loss, synaptic pathology and altered brain plasticity in the Drosophila mutant *cardinal* accumulating 3-hydroxykynurenine // Journal of Neural Transmission. – 2000. – V. 107, No 5. – P. 581-601.

3. Полэ И.Р. Анализ генетической детерминации половой активности самцов *Drosophila melanogaster*: Автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.15 / - ЛГУ. – Л., 1979. – 20 с.
4. Субочева Е.А., Романова Н.И., Карпова Н.Н. и др. Репродуктивное поведение самцов в линиях *Drosophila melanogaster*, отличающихся по аллелям гена *flamenco* // Генетика. - 2003. - Т. 39, № 5. - С.675–681.
5. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
6. Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic Variations of *Drosophila melanogaster*. - Carnegie Inst. Wash. Publ., 1968. – 627 p.
7. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. – 479 с.
8. Rongvaux A., Andris F., Van Gool F., Leo O. Reconstructing Eukaryotic NAD Metabolism // BioEssays. – 2003. – V. 25, No 7. – P. 683-690.
9. Электронный ресурс [http://www.thelocal.se/9013/]: Link found between TBE and schizophrenia. - Published: November 6 2007 (09:26 CET).
10. 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.
11. Phillips A. M., Smart R., Strauss R. et al. The *Drosophila black* enigma: The molecular and behavioural characterization of the *black¹* mutant allele // Gene. – 2005. – V. 351. – P. 131-142.
12. Walter M.F., Zeineh L.L., Black B.C. et al. Catecholamine metabolism and *in vitro* induction of premature cuticle melanization in wild type and pigmentation mutants of *Drosophila melanogaster* // Arch. Insect Biochem. Physiol. – 1996. – V. 31, No 2. – P. 219-233.
13. Walter M.F., Black B.C., Afshar G. et al. Temporal and spatial expression of the *yellow* gene in correlation with cuticle formation and DOPA decarboxylase activity in *drosophila* development // Developmental Biology. – 1991. – V. 147, Iss. 1. – P. 32-45.
14. Drapeau M.D. A Novel Hypothesis on the Biochemical Role of the *Drosophila* Yellow Protein // Biochem. and Biophys. Research Communications. – 2003. – V. 311. – P. 1-3.
15. Hall J.C. The Mating of a Fly // Science. – 1994. - V. 264, No 5166. - P. 1702-1714.

Резюме

Встановлено вплив низки мутацій (*y*, *w*, *w^a*, *b*, *cn*) у генах, які контролюють певні реакції обміну амінокислот-джерел нейроактивних речовин та біосинтезу пігментів, на статеву поведінку *D. melanogaster*. Розглянуто можливі механізми впливу даних генів на ознаки поведінки та обговорюється можливість моделювання на дрозофілі ферментопатій та нервових розладів людини.

Установлено влияние ряда мутаций (*y*, *w*, *w^a*, *b*, *cn*) в генах, контролирующих определённые реакции обмена аминокислот-источников нейроактивных веществ и биосинтеза пигментов, на половое поведение *D. melanogaster*. Рассмотрены возможные механизмы влияния данных генов на признаки поведения и обсуждается возможность моделирования на дрозофиле ферментопатий и нервных расстройств человека.

The influence of mutations (*y*, *w*, *w^a*, *b*, *cn*) in genes that control definite metabolic reactions of amino acid precursors of neuro active substances and pigments biosynthesis on *D. melanogaster* mating behavior is demonstrated. Possible mechanisms of these genes effects on behavior traits are reviewed, and the possibility of human enzymatic pathologies and nervous disorders modeling in *Drosophila* is discussed.