



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

УДК 577.25

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОТОРНЫХ ФУНКЦИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

✿ Для исследования молекулярных механизмов функционирования центральных генераторов моторного паттерна (ЦГМП) проведен скрининг коллекции Р-инсерционных мутантов дрозофилы на сильные отклонения в локомоции и песне ухаживания. У 21 мутанта был установлен сайт инсерции Р-элемента в геноме путем секвенирования фланговых последовательностей геномной ДНК. Биоинформационный анализ позволил определить группу генов-кандидатов, возможных участников развития и функционирования ЦГМП. Для некоторых из выявленных генов возможность участия в ритмических моторных актах предполагается впервые (CG15630, Map205).

✿ **Ключевые слова:** дрозофила; моторные функции; локомоция; звукопродукция; песня ухаживания; Р-элемент; инсерционные мутации; скрининг; гены-кандидаты.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование нервных механизмов генерации ритмических движений является необходимым для лечения моторных дисфункций и восстановления утерянной двигательной активности в результате повреждений нервной системы (Gordon et al., 2006; Pearson, 2000). Несмотря на определенные успехи в изучении генераторов моторного паттерна на человеке и других млекопитающих (Goulding, Pfaff, 2005; Kiehn, Butt, 2003), исследования механизмов их работы на молекулярно-клеточном уровне в составе нейронных ансамблей продвигаются крайне медленно и находятся на начальной стадии.

Drosophila melanogaster обладает простой нервной системой, является модельным объектом, для которого разработаны уникальные по своим возможностям генетические методы. Поэтому ее использование может внести значительный вклад в исследование механизмов реализации моторных функций, в частности механизмов функционирования и управления работой центральных генераторов моторного паттерна (ЦГМП). Наличие сходства на молекулярном уровне в функционировании нервной системы позвоночных и насекомых (Fradkin et al., 2010; Marder, Bucher, 2001) позволяет переносить выявленные закономерности на более сложные объекты.

Исследование нервных структур и групп нейронов, чья активность связана с генерацией и регуляцией моторного паттерна локомоторных и других ритмических актов у дрозофилы, ведется достаточно давно (Clyne, Miesenböck, 2008; Martin et al., 1998; Schlichter, Hall, 1979; Strauss, 2002; Strauss, Heisenberg, 1990; Suster, Bate, 2002; Suster et al., 2003). Однако данные о молекулярных механизмах работы ЦГМП носят лишь фрагментарный характер (Banerjee et al., 2004). В такой ситуации часто является продуктивным использование скрининга мутантных линий с фенотипическими отклонениями от нормы (Moran, Kyriacou, 2009; Landis et al., 2003; Strauss, 2002; Venken, Bellen, 2007).

В нашей работе было проведено тестирование Р-инсерционных мутантов на наличие отклонений в локомоторном поведении и параметрах звукопродукции при сравнении с линией дикого типа Canton-S. По результатам тестирования была отобрана 21 линия, проявляющая нарушения и в обеих формах поведения. Проведенный молекулярно-генетический анализ позволил определить список генов-кандидатов, продукты которых с высокой степенью вероятности участвуют в генерации ритмических движений. Для каждого из генов выполнен тщательный анализ литературных данных, что позволило выдвинуть предположения о возможной его роли в функционировании нервной системы. Наличие среди генов-кандидатов таких, которые кодируют вероятных участников ремоделирования микротрубочковой сети (Map205) и сигналинга, запускаемого тирозинкиназными рецепторами (*drl*, *MESR4*),

Поступила в редакцию 21.11.2011.
Принята к публикации 20.01.2012

позволяют предположить особое значение этих процессов в морфофункциональной организации генераторов моторного паттерна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестирование моторной активности мутантных линий

В исследовании использовали созданную нами ранее коллекцию мутантных линий *Drosophila melanogaster* (более 1000 линий), полученных методом Р-инсерционного мутагенеза (Cooley et al., 1988). Каждая линия несет одиночную случайную инсерцию Р-элемента — *PdL*-транспозона (рис. 1) (Landis et al., 2001) — в одной из аутосом. В качестве контроля служила линия дикого типа Canton-S (CS). Мух разводили и содержали на стандартной изюмно-дрожжевой среде при 25 °С и 12-часовом световом дне.

Регистрацию двигательной активности и запись песни ухаживания самца проводили у трехсуточных самцов с 9.00 до 18.00 при $t = 25$ °С. Для измерения двигательной активности мух собирали под холодным наркозом и содержали до опыта в группе по 30 особей. Для регистрации звукопродукции самцов собирали без наркоза и содержали до опыта индивидуально. Запись звуков осуществляли при ухаживании самца за оплодотворенной самкой линии CS.

Запись двигательной активности одновременно 20 особей осуществляли с помощью двух веб-камер и программы *Drosophila tracks* (автор — Н. Г. Камышев) с частотой 10 Гц с последующей обработкой данных анализирующим модулем программы (Камышев, 2011).

Регистрацию звукопродукции проводили по ранее описанному методу (Попов и др., 2000). Программа DCSA (*Drosophila courtship song analysis*, автор — Н. Г. Камышев) автоматически распознавала импульсный (ИП) и синусоидальный компоненты (СП) песни самца (рис. 2) и рассчитывала различные параметры песни ухаживания.

Статистический анализ параметров двигательной активности и звукопродукции проводили тестом рандомизации (Edgington, 1995).

Определение локализации и направленности *PdL*-транспозона в геноме

ДНК выделяли из 10 самок каждой мутантной линии. Для этого мух замораживали (–20 °С, 5 мин), гомогенизировали в 200 мкл лизирующего буфера (0,1M NaCl, 6,8 % сахара, 0,1M Трис-НСl, pH 8,5, 0,05M EDTA, 0,5 % SDS, 0,5 % DEPC), инкубировали лизат 30 мин при 65 °С, добавляли в лизат 300 мкл ацетата натрия (pH 5,2), перемешивали, инкубировали на льду 30 мин и центрифугировали в течение 10 мин. при 12100 g. Полученный супернатант переносили в новый эпепдорф и осаждали ДНК 96 %-м этанолом

с последующим центрифугированием. Осажденную ДНК промывали 75 %-м этанолом, центрифугировали, подсушивали в термостате (10 мин, 37 °С), растворяли в 0,01M Трис-НСl, pH 7,5 и помещали на хранение при –20 °С.

Для амплификации в инвертированной полимеразной цепной реакции (ПЦР) фланговой последовательности геномной ДНК, примыкающей к месту вставки *PdL*-транспозона, выделенную ДНК в количестве эквивалентном трем мухам расщепляли рестриктазой TaqI при 65 °С в течение 2 часов, а затем проводили лигирование фрагментов ДНК самих на себя Т4-лигазой при 4 °С на протяжении 16 часов. После рестрикции и самолигирования ДНК осаждали 96 %-м этанолом с последующим центрифугированием. Полученный осадок подсушивали в термостате (10 мин, 37 °С) и растворяли в бидистиллированной воде. ПЦР-амплификацию осуществляли с использованием праймеров HSP (CTGCAGATTGTTTAGCTTGTTT) и IRS (CGGGACCCACCTTATGTTAT) в термоциклере «Veriti» (Applied Biosystems) при следующих условиях: 95 °С (3 мин) × 1; [95 °С (30 с), 53 °С (30 с), 72 °С (60 с)] × 35; 72 °С (7 мин) × 1.

Секвенирование очищенного продукта ПЦР выполняли методом Сэнгера на оборудовании и реактивах Applied Biosystems. Секвенсную реакцию проводили с использованием праймера HSP при следующих условиях: 95 °С (60 с) × 1; [95 °С (10 с), 50 °С (5 с), 60 °С (4 мин)] × 25. Обработка секвенсов осуществлялась с помощью лицензионного программного обеспечения Applied Biosystems: Data Collection v3.0, Sequencing Analysis 5.3.1, SeqScape® Software. Полученную фланговую нуклеотидную последовательность сопоставляли с базой данных о геномной последовательности ДНК *Drosophila melanogaster* в программе Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), предоставляемых в интернет-ресурсе National Center for Biotechnology Information (NCBI).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отбор мутантных линий, проявляющих наиболее выраженные отклонения в параметрах двух типов моторной активности

По результатам поведенческого тестирования из коллекции Р-инсерционных мутантов дрозофилы отобрана 21 линия с ярко выраженными и воспроизводимыми отклонениями по параметрам локомоторной активности и песни ухаживания при сравнении с линией дикого типа CS (рис. 3). Особое внимание уделялось значениям межимпульсных интервалов и несущей частоте в импульсной песне самца, непосредственно характеризующих работу песенного генератора моторного паттерна (рис. 3).



Рис. 1. Структура *PdL*-транспозона. 5'- и 3'- концевые последовательности Р-элемента необходимые для транспозиции обозначены заштрихованными прямоугольниками. Показаны сайт рестрикции *Taq1* и праймеры, используемые в инвертированной ПЦР для амплификации фланговой последовательности геномной ДНК со стороны 3'-конца транспозона. Масштабы не соблюдены

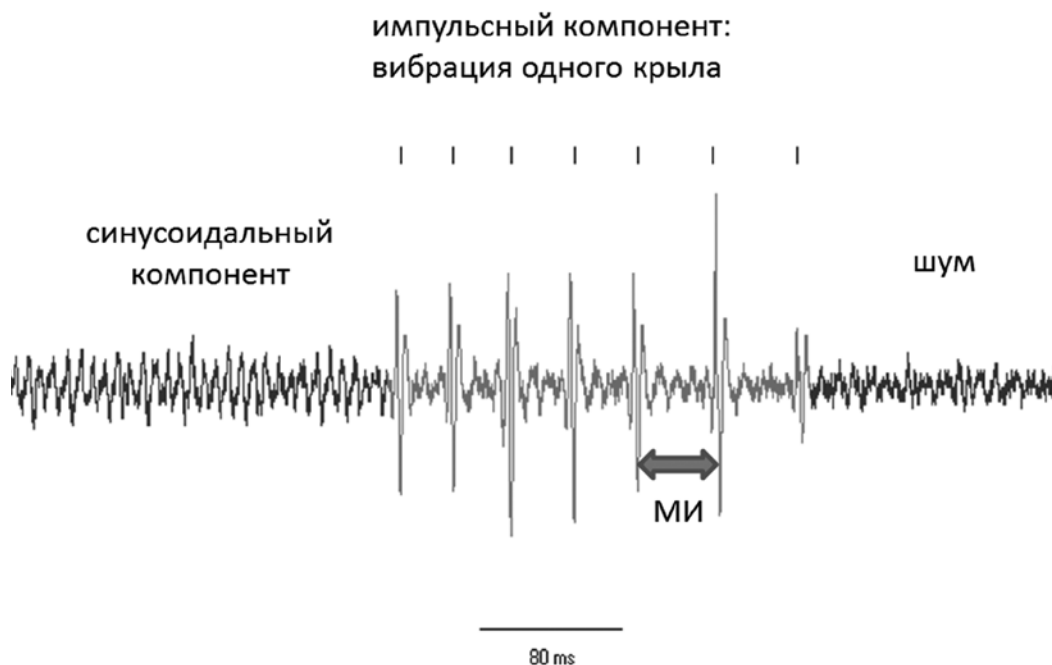


Рис. 2. Участок записи песни ухаживания самца дрозофилы. МИ — межимпульсный интервал

Идентификация генов-кандидатов, определяющих параметры ритмических движений

Для выделенных по отклонениям в моторной активности мутантных линий определены локализация и направленность *PdL*-транспозона в геноме. Каждая из 21 проанализированных линий имела уникальную точку инсерции *PdL*-транспозона. В 13 случаях вставка транспозона произошла в некодирующих участках в начале генов *Cf2*, *Dpg-1*, *Ext2*, *lola*, *MESR4*, *Map205*, *Mef2*, *Sps2*, *Treh*, *wdp*, *CG5807*, *CG6746*, *CG15630*; в двух случаях в кодирующей области генов *jumi*, *CG8708*; в одном случае в кластере транспозонов в перичентромерной области; в пяти остальных случаях в той или иной степени удаленности от 5'-конца генов *drl*, *jing*, *mir-8*, *olf413*, *Hsrw* (табл. 1).

На основе анализа существующих экспериментальных и биоинформационных данных по генам, затронутым вставкой *PdL*-транспозона (интернет-ресурсы FlyBase, NCBI), были определены или предположены функции продуктов этих генов и их роль в функционировании организма (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

В группе предположительно затронутых мутациями генов-кандидатов, которые могут определять параметры моторной активности, половина кодирует факторы транскрипции и трансляции (7 генов) и рецепторные компоненты в мембранах клетки (4 гена). Другая половина представлена генами двух регуляторных РНК-молекул, двух гликозилтрансфераз, белка MAP205, связанного с микротрубочками, и различных ферментов клеточного метаболизма. Для генов *lola* и *drl* ранее была показана их вовлеченность в ритмическую активность у дрозофилы. Феминизация клеток, экспрессирующих *lola*, сопровождалась прекращением звукопродукции (Mogan, Kyriacou, 2009), а для *drl* в исследовании с картированием локусов количественных признаков было показано, что он является существенным фактором, определяющим локомоторные параметры у мухи (Jordan et al., 2006).

Среди генов-кандидатов, кодирующих транскрипционные факторы (ТФ), можно четко выделить под-

Таблица 1

Локализация *PdL*-транспозона в геноме у мутантных линий и гены-кандидаты, нарушение функций которых может отвечать за наблюдаемые отклонения моторного поведения

Линия	Положение инсерции и направленность <i>PdL</i> -транспозона	Ген-кандидат	Продукт гена	Функция гена	Локализация продукта гена в клетке	Гомолог у человека
3724	2L- 4882790- for	<i>Cf2</i>	Транскрипционный фактор РНК-полимеразы II	Развитие мышечных органов	Ядро	<i>ZNF853</i>
663	2R-5842843-rev	<i>Mef2</i>	Предположительно транскрипционный фактор	Развитие скелетных, гладких и сердечных мышц, регуляция активности нейронов, определяющих суточные ритмы	Ядро	<i>MEF2A</i>
5493	3R- 6182222- for	<i>jumu</i>	Предположительно транскрипционный фактор	Нейрогенез	—	—
5282b	2R-6429208- for	<i>lola</i>	Предположительно транскрипционный фактор	Регуляция роста нервных окончаний	Ядро	—
2169	2R-13435745-for	<i>MESR4</i>	Предположительно транскрипционный фактор	Клеточный ответ на гипоксию	—	<i>PELP1</i>
3494	2R-2389393-rev	<i>jing</i>	Транскрипционный репрессор	Развитие трахейной и центральной нервной системы	Ядро	—
843K	2R- 14059049- for	<i>Dgp-1</i>	Предположительно трансляционный фактор элонгации	Ответ на стрессорные воздействия	—	<i>GTPBP1</i>
5567a	3R-27894136-rev	<i>Map205</i>	Белок, связывающий микротрубочки	Участие в ремоделировании тубулиновой сети при митозе	Цитоплазма	<i>MAP4</i>
3328b	3R-20639718-rev	<i>CG5807</i>	Предположительно мембранный рецептор гидрофобных агентов в составе липокалина	Развитие половых клеток, регуляция секреции	—	<i>LMBR1L</i>
3404a	2L- 4793956- for	<i>CG15630</i>	Предположительно рецепторный компонент плазматической мембраны	—	—	<i>PALLD</i>
2248	2L-19190341-rev	<i>drl</i>	Предположительно тирозинкиназный рецептор	Направление роста нервных окончаний, Wnt-сигналинг	—	<i>RYK</i>

Таблица 1 (окончание)

Линия	Положение инсерции и направ- ленность <i>PdL</i> - транспозона	Ген-кандидат	Продукт гена	Функция гена	Локализация продукта гена в клетке	Гомолог у человека
3979a- s2	2R-18199553- rev	<i>wdp</i>	Предположительно мембранный рецептор	Направление роста аксонов	Плазма- тическая мембрана	—
6225a	2L-20116133-for	—	Предположительно пиРНК	—	—	—
3290	2R-12716378-rev	<i>mir-8</i>	МикроРНК	Регуляция уровня атрофина, ингибирование <i>Notch</i> - индуцируемого роста	—	—
5433-t3	3R-17122251-for	<i>Hsr</i>	Предположительно РНК, связывающаяся со сплайсосомой и рибосомой	Регуляция созревания пре-мРНК, регуляция белкового синтеза	Ядро, цито- плазма	—
4653	2R-4047132-for	<i>CG8708</i>	Бета-1,3- галактозил- трансфераза	О-гликозилиро- вание белков	—	<i>B3GALT5</i>
6387a- s2	2R-12036471-for	<i>CG10731</i>	Предположительно регуляторный компонент митохондриальной АТФ-синтазы	—	—	<i>ATP5S</i>
		<i>Ext2</i>	Предположительно гликозил- трансфераза	Биосинтез протеогликанов	Аппарат Гольджи и эндоплаз- матическая сеть	<i>EXT2</i>
5769	2L-10342643-for	<i>Sps2</i>	Предположительно синтетаза моноселено- фосфата	Синтез селеноцистеина	Цитоплазма	<i>SEPHS2</i>
5511-t3	3L-22094200-for	<i>olf413</i>	Предположительно дофамин-бета- монооксигеназа	Синтез нейроэндокрин- ных пептидов, октопамина	—	<i>MOXD1</i>
3389	2L-12002261-rev	<i>CG6746</i>	Предположительно протеинтирозино- вая фосфатаза	—	—	<i>PTPLB</i>
4262c- s2	2R-16964321-for	<i>Treh</i>	Трегалаза	Расщепление трегалоzy	Мембрана	<i>TREH</i>

В обозначении положения инсерции и направленности *PdL*-транспозона цифры 2 и 3 обозначают вторую или третью хромосомы, буквы R и L — правое или левое плечо соответствующей хромосомы, многозначное число — номер нуклеотида следующего за инсерцией, for и rev — направленность 3'-конца транспозона к окончанию нумерации нуклеотидов в хромосоме или к ее началу

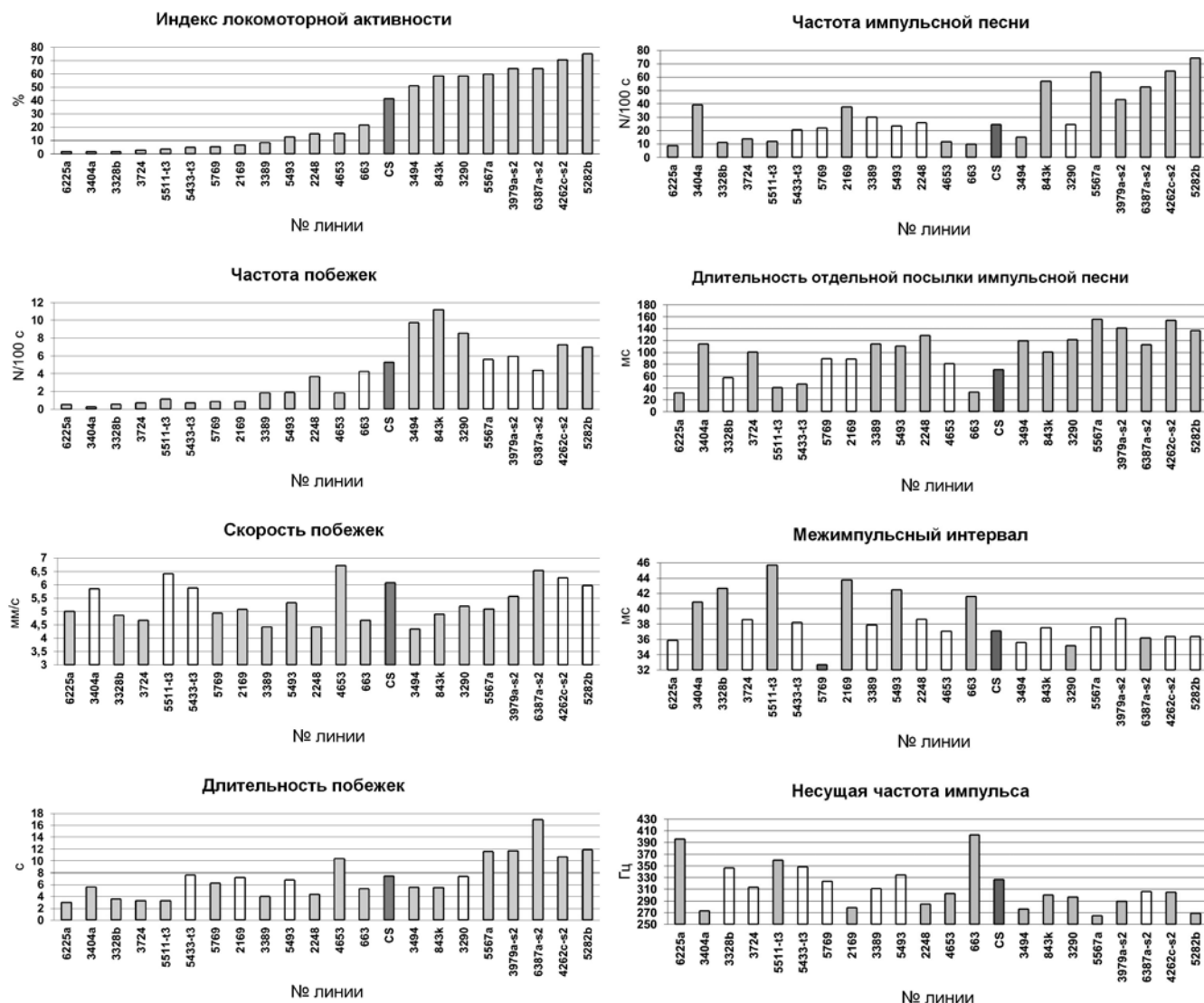


Рис. 3. Отклонения в локомоторной активности и импульсной песне 21 мутантной линии в сравнении с линией дикого типа CS. На графиках представлены средние значения. Достоверно отличные значения выделены серым (тест рандомизации, 10000 итераций, $P < 0,05$).

Индекс двигательной активности — время, занятое локомоцией, %; частота побегов — количество инициаций побегов за 100 с; частота импульсной песни — количество инициаций посылок за 100 с; несущая частота импульса — $1/\text{длительность самого выраженного цикла в импульсе}$.

группу из генов *juma*, *lola*, *jing*, определяющих развитие центральной нервной системы (ЦНС) с первых этапов ее формирования (Cheah et al., 2000; Crowner et al., 2002; Sonnenfeld et al., 2004). Экспрессия генов этих ТФ максимальна на эмбриональной стадии развития, а затем многократно снижается (Graveley et al., 2011). Моторные отклонения, вызываемые мутациями этих генов, существенно различаются и вероятнее всего вызваны множественными структурными дефектами на уровне органов и клеток ЦНС.

В данную подгруппу не включен ген *MESR4* из-за ограниченности сведений о его роли в функционировании организма. Известно, что *MESR4* является

негативным регулятором EGFR/Ras/MAPK сигнального пути и его мисэкспрессия приводит к дефектам кутикулярных сенсорных органов и фоторецепторов (Abdelilah-Seyfried et al., 2000; Huang, Rubin, 2000; Pena-Rangel et al., 2002). Наблюдаемое изменение паттерна импульсной песни у мутантов *MESR4* в сторону увеличения межимпульсного интервала и длительности импульса может быть связано с нарушениями в формировании рецепторов (Pearson, Wolf, 1987).

К другой подгруппе ТФ следует отнести продукты генов *Mef2* и *Cf2*. Данные ТФ довольно подробно изучены в первую очередь с позиций их участия в

развитии мышечных органов дрозофилы (Baker et al., 2005; Gajewski, Schulz, 2010). MEF2 и CF2 являются активаторами генов актина *Act57B*, тропонина I *TnI* и тяжелой цепи миозина *Mhc* на эмбриональных и личиночных стадиях. При этом CF2 подвергается регуляции со стороны MEF2 (Tanaka et al., 2008). Недавно было показано, что MEF2 поддерживает суточные ритмы активности, регулируя экспрессию основных генов и влияя на взаимодействие нейронов, определяющих эти ритмы (Blanchard et al., 2010).

Таким образом, эффект мутаций генов *Mef2* и *Cf2* в виде депрессии моторной активности вероятнее всего связан с нарушениями в развитии мускулатуры животного. Однако сокращение межимпульсного интервала у мутантов по *Mef2* на фоне данных об участии этого гена в работе нейронов мозга имаго указывают на возможные аномалии развития или работы элементов ЦНС. Мутация гена *Cf2* с меньшей вероятностью связана с нарушениями ЦНС, учитывая сохранение паттерна импульсной песни.

Ген *Dgp-1* обнаруживает гомологию с консервативными доменами фактора элонгации 1 (Hunter et al., 2009). У млекопитающих наиболее близким гомологом является ген *GTPBP1*, прекращение функционирования которого не приводит к видимым фенотипическим отклонениям у мышей (Senju, et al., 2000). Для *GTPBP1* показана положительная регуляция интерфероном гамма, что может быть обобщено с данными об усилении экспрессии *Dgp-1* при оксидативном стрессе (Girardot et al., 2004; Gruenewald et al., 2009). Также экспрессия *Dgp-1* и еще одного гена, выявленного в настоящем скрининге, *Map205*, увеличена почти в 2 раза у мутантов по гену *park* (на стадии куколки). Последний кодирует лигазу белка убиквитина, и прекращение функционирования его гомолога у человека приводит к развитию аутосомального рецессивного ювенильного паркинсонизма. Более того, у мутантов по гену *park* при прекращении функционирования генов *Map205* и *Dgp-1*, снижается выживаемость на 25 и 100 % соответственно (Greene et al., 2005). Витальность мутантов с нефункционирующим *GTPBP1* и усиление экспрессии *Dgp-1* в условиях оксидативного стресса и на фоне мутации гена убиквитинлигазы *park*, позволяют предположить особое значение продуктов *Dgp-1* в противодействии нарушениям белкового метаболизма.

Мутация по гену *Map205*, задействованному в моделировании тубулиновых волокон (Archambault et al., 2008), как и в случае с мутацией по гену *Dgp-1* приводит к снижению скорости побежки и несущей частоты импульсной песни, но не затрагивает межимпульсный интервал. На С-конце *Map205* располагается консервативная последовательность, обнаруженная также в белке человека атаксин-2. Функция

атаксина-2 не определена, но в его составе выявлен полиглутаминовый участок (CAG-повторы), экспансия повторов в котором связывается с развитием у человека спинозжечковой атаксии второго типа (Lorenzetti, et al., 1997). В гене *Map205* также обнаруживается последовательность, кодирующая 5 глутаматных остатков примерно в том же положении, что и повтор из 20 глутаматных остатков в атаксине-2 у человека.

Принимая во внимание все вышесказанное, можно предположить, что инсерции в генах *Dgp-1* и *Map205* приводят к нарушениям метаболизма белков в клетке, и как следствие этого, к сходным нейродегенеративным процессам, которые, однако, не затрагивают значения межимпульсного интервала в песне ухаживания.

Наряду с ТФ, другой подгруппой генов, определяющих параметры двигательной активности, являются рецепторные компоненты клеточных мембран, функционирование которых непосредственно связано с формированием и работой нейрональных ансамблей. В частности, хорошо изученный ген *drl* кодирует тирозинкиназный рецептор, лигандом которого является белок Wnt5, выделяемый аксонами нейронов (Wnt/Ryk сигналинг, Fradkin et al., 2010). Показано участие *drl* в направлении роста аксонов в брюшной нервной цепочке на стадии эмбрионального развития, развитии мозга имаго в процессе метаморфоза, в формировании нервно-мышечных синапсов личинок и других процессах развития (Liebl et al., 2008; Moreau-Fauvarque et al., 1998; Sakurai et al., 2009). Снижение локомоторной активности мутантов по этому гену вероятнее всего обусловлено структурными дефектами центрального комплекса мозга мухи (Strauss, 2002), а изменение характеристик импульсной песни может быть связано с нарушениями в восприятии и анализа обонятельных сигналов от самки, процессируемых в антеннальных долях и грибовидных телах (Yao et al., 2007). Следует отметить, что по результатам исследований многих авторов мутации генов, вовлеченных в тирозинкиназный сигналинг и его регуляцию (MESR3, aos, Gap1, lola, egh), приводят к различным моторным отклонениям и структурным аномалиям ЦНС дрозофилы (Boube et al., 1997; Moran, Kyriacou, 2009; Friedman, Perrimon, 2006; Huang, Rubin, 2000; Sawamoto et al., 1998).

Три остальных гена рецепторов практически не описаны в литературе. Для гена *wdp* показано, что его сверхэкспрессия в мышцах личинки вызывает нарушения в иннервации отдельных мышц аксонами мотонейронов (mistargeting) (Kurusu et al., 2008). Эти нарушения иннервации могут быть причиной снижения несущей частоты импульса, наблюдаемой у данной мутантной линии. Функциональные харак-

теристика консервативных доменов гена *CG15630*, представленных интернет-ресурсом InterPro (Hunter et al., 2009), и роль продуктов гомологичных ему генов у млекопитающих (Palld, Chien et al., 2002) позволяют предположить, что *CG15630* кодирует белок, локализующийся на клеточной поверхности нейрональных клеток, где участвует в ремоделировании цитоскелета клетки, управляя формой клеток, их взаимодействием и миграцией (Boukhelifa et al., 2003; Luo et al., 2005; Otey et al., 2005). Описание консервативных доменов в InterPro (Hunter et al., 2009) и список выявленных взаимодействий в дигибридном анализе (Stark et al., 2011) по гену *CG5807*, указывают на то, что *CG5807* может кодировать мембранный рецептор гидрофобных агентов (гормоны, токсины) в составе липокалина, посредством которого регулируются сигнальные каскады в клетке, связанные с развитием половых клеток и процессами секреции (Redl, 2000; Schulz et al., 2004).

К группе мембранных рецепторов близок по своей роли в определении нейрональных взаимодействий ген *Ext2*, который кодирует гликозилтрансферазу, необходимую для биосинтеза гепарансульфата (McCormick et al., 2000). Гепарансульфаты являются компонентами плазматических мембран клеток, где они могут функционировать как рецепторы и участвовать в клеточной адгезии и межклеточных взаимодействиях. Они также выступают компонентами синаптических пузырьков и других мембранных органелл. Установлено, что *Ext2*, влияя на синтез гепарансульфатпротеогликанов, играет ключевую роль в распределении морфогенов hedgehog, wingless и Decapentaplegic (Takei et al., 2004). Соответственно, влияние мутации *Ext2* на параметры моторных функций могут быть связаны с нарушениями в развитии мухи, однако, учитывая преобладание экспрессии гена в ЦНС на стадиях личинки и имаго (Chintapalli et al., 2007; Graveley et al., 2011), можно предполагать особое значение продукта *Ext2* в определении рецепторных свойств протеогликанов в составе цитоплазматической, везикулярной и других мембран клетки. Так как межимпульсный интервал изменен незначительно, то, вероятно, непосредственно работа ЦГМП не затронута, но существенно изменена регуляция его активности (увеличенные параметры локомоции и звукопродукции).

В заключение следует отметить наличие для большинства выявленных генов-кандидатов гомологов у млекопитающих и человека, что предполагает возможность переноса в дальнейшем результатов исследования молекулярных механизмов работы генераторов моторного паттерна на более сложноорганизованные нервные сети. Следует, однако, иметь в виду, что действие мутации в той или иной степе-

ни распространяется на функционирование всех систем органов, и более определенно утверждать о вовлеченности гена в нервные механизмы генерации ритмической активности можно будет лишь по результатам изучения локальной экспрессии генов-кандидатов в нервной системе и ее отделах.

Благодарности:

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00997, подпрограммой «Генофонды и генетическое разнообразие» Президиума РАН и Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камышев Н. Г., 2011. 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 // Международная научная конференция «Измерительные и информационные технологии в охране здоровья (МЕТРОМЕД-2011)», Сборник научных трудов, Санкт-Петербург, С. 152–160.
2. Попов А. В., Савватеева-Попова Е. В., Камышев Н. Г., 2000. Особенности акустической коммуникации у плодовых мушек *Drosophila melanogaster* // Сенсорные системы. Т. 14. № 1. С. 60–74.
3. Abdelilah-Seyfried S., Chan Y. M., Zeng C. et al., 2000. A gain-of-function screen for genes that affect the development of the *Drosophila* adult external sensory organ // Genetics. Vol. 155. P. 733–752.
4. Archambault V., D'Avino P. P., Deery M. J. et al., 2008. Sequestration of Polo kinase to microtubules by phosphopriming-independent binding to *Map205* is relieved by phosphorylation at a CDK site in mitosis // Genes Dev. Vol. 22. P. 2707–2720.
5. Baker P. W., Tanaka K. K., Klitgord N., Cripps R. M., 2005. Adult myogenesis in *Drosophila melanogaster* can proceed independently of myocyte enhancer factor-2 // Genetics. Vol. 170. P. 1747–1759.
6. Banerjee S., Lee J., Venkatesh K. et al., 2004. Loss of flight and associated neuronal rhythmicity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mutants of *Drosophila* // J. Neurosci. Vol. 24. P. 7869–7878.
7. Blanchard F. J., Collins B., Cyran S. A. et al., 2010. The transcription factor Mef2 is required for normal circadian behavior in *Drosophila* // J. Neurosci. Vol. 30. P. 5855–5865.
8. Boubé M., Benassayag C., Seroude L., Cribbs D. L., 1997. Ras1-mediated modulation of *Drosophila* ho-

- meotic function in cell and segment identity // Genetics. Vol. 146. P. 619–628.
9. Boukhelifa M., Hwang S. J., Valtchanoff J. G. et al., 2003. A critical role for palladin in astrocyte morphology and response to injury // Mol. Cell Neurosci. Vol. 23. P. 661–668.
 10. Cheah P. Y., Chia W., Yang X., 2000. Jumeaux, a novel *Drosophila* winged-helix family protein, is required for generating asymmetric sibling neuronal cell fates // Development. Vol. 127. P. 3325–3335.
 11. Chien S., Reiter L. T., Bier E., Gribskov M., 2002. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila* // Nucleic Acids Research. Vol. 30. P. 149–151.
 12. Chintapalli V. R., Wang J., Dow J. A. T., 2007. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila* models of human disease // Nature Genetics. Vol. 39. P. 715–720.
 13. Clyne J. D., Miesenböck G., 2008. Sex-specific control and tuning of the pattern generator for courtship song in *Drosophila* // Cell. Vol. 133. P. 354–363.
 14. Cooley L., Kelley R., Spradling A., 1988. Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements // Science. Vol. 4. P. 1121–1128.
 15. Crowner D., Madden K., Goeke S., Giniger E., 2002. Lola regulates midline crossing of CNS axons in *Drosophila* // Development. Vol. 129. P. 1317–1325.
 16. Edgington E. S., 1995. Randomization tests (3rd ed.). New York: Marcel Dekker.
 17. Fradkin L. G., Dura J. M., Noordermeer J. N., 2010. Ryks: new partners for Wnts in the developing and regenerating nervous system // Trends in Neurosciences. Vol. 33. P. 84–92.
 18. Friedman A., Perrimon N., 2006. A functional RNAi screen for regulators of receptor tyrosine kinase and ERK signaling // Nature. Vol. 444. P. 230–234.
 19. Gajewski K. M., Schulz R. A., 2010. CF2 represses Actin 88F gene expression and maintains filament balance during indirect flight muscle development in *Drosophila* // PLoS ONE. Vol. 5. P. e10713.
 20. Girardot F., Monnier V., Tricoire H., 2004. Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster* // BMC Genomics. Vol. 5. P. 74.
 21. Gordon I. T., Whelan P. J., 2006. Deciphering the organization and modulation of spinal locomotor central pattern generators // J. Exp. Biol. Vol. 209. P. 2007–2014.
 22. Goulding M., Pfaff S. L., 2005. Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates // Curr. Opin. Neurobiol. Vol. 15. P. 14–20.
 23. Graveley B. R., Brooks A. N., Carlson J. W. et al., 2011. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster* // Nature. Vol. 471. P. 473–479.
 24. Greene J. C., Whitworth A. J., Andrews et al., 2005. Genetic and genomic studies of *Drosophila* parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis // Hum. Mol. Genet. Vol. 14. P. 799–811.
 25. Gruenewald C., Botella J. A., Bayersdorfer F. et al., 2009. Hyperoxia-induced neurodegeneration as a tool to identify neuroprotective genes in *Drosophila melanogaster* // Free Radical Biol. Med. Vol. 46. P. 1668–1676.
 26. Huang A. M., Rubin G. M., 2000. A misexpression screen identifies genes that can modulate RAS1 pathway signaling in *Drosophila melanogaster* // Genetics. Vol. 156. P. 1219–1230.
 27. Hunter S., Apweiler R., Attwood T. K. et al., 2009. InterPro: the integrative protein signature database // Nucleic Acids Res. Vol. 37. P. D211–D215.
 28. Jordan K. W., Morgan T. J., Mackay T. F., 2006. Quantitative trait loci for locomotor behavior in *Drosophila melanogaster* // Genetics. Vol. 174. P. 271–284.
 29. Kiehn O., Butt S. J. B., 2003. Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord // Progress in Neurobiology. Vol. 70. P. 347–361.
 30. Kurusu M., Cording A., Taniguchi M. et al., 2008. A screen of cell-surface molecules identifies leucine-rich repeat proteins as key mediators of synaptic target selection // Neuron. Vol. 59. P. 972–985.
 31. Landis G. N., Bhole D., Lu L., Tower J., 2001. High-frequency generation of conditional mutations affecting *Drosophila melanogaster* development and life span // Genetics. Vol. 158. P. 1167–1176.
 32. Landis G. N., Bhole D., Tower J., 2003. A search for doxycycline-dependent mutations that increase *Drosophila melanogaster* life span identifies the VhaSFD, Sugar baby, filamin, fwd and Cctl genes // Genome Biol. Vol. 4. P. R8.
 33. Liebl F. L., Wu Y., Featherstone D. E. et al., 2008. Derailed regulates development of the *Drosophila* neuromuscular junction // Dev. Neurobiol. Vol. 68. P. 152–165.
 34. Lorenzetti D., Bohlega S., Zoghbi H. Y., 1997. The expansion of the CAG repeat in ataxin-2 is a frequent cause of autosomal dominant spinocerebellar ataxia // Neurology. Vol. 49. P. 1009–1013.
 35. Luo H., Liu X., Wang F. et al., 2005. Disruption of palladin results in neural tube closure defects in mice // Mol. Cell. Neurosci. Vol. 29. P. 507–515.
 36. Marder E., Bucher D., 2001. Central pattern generators and the control of rhythmic movements // Curr. Biol. Vol. 11. P. R986–R996.

37. Martin J. R., Ernst R., Heisenberg M., 1998. Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster* // Learn. Mem. Vol. 5. P. 179–191.
38. McCormick C., Duncan G., Goutsos K. T., Tufaro F., 2000. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 97. P. 668–673.
39. Moran C. N., Kyriacou C. P., 2009. Functional neurogenomics of the courtship song of male *Drosophila melanogaster* // Cortex. Vol. 45. P. 18–34.
40. Moreau-Fauvarque C., Taillebourg E., Boissoneau E. et al., 1998. The receptor tyrosine kinase gene *linotte* is required for neuronal pathway selection in the *Drosophila* mushroom bodies // Mech. Dev. Vol. 78. P. 47–61.
41. Otey C. A., Rachlin A., Moza M. et al., 2005. The palladin/myotilin/myopalladin family of actin-associated scaffolds // Int. Rev. Cytol. Vol. 246. P. 31–58.
42. Pearson K. G., 2000. Neural adaptation in the generation of rhythmic behavior // Annu. Rev. Physiol. Vol. 62. P. 723–753.
43. Pearson K. C., Wolf H., 1987. Comparison of motor patterns in the intact and deafferented flight system of the locust. I. Electromyographic analysis // J. Comp. Physiol. A. Vol. 160. P. 259–268.
44. Pena-Rangel M. T., Rodriguez I., Riesgo-Escovar J. R., 2002. A misexpression study examining dorsal thorax formation in *Drosophila melanogaster* // Genetics. Vol. 160. P. 1035–1050.
45. Redl B., 2000. Human tear lipocalin // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1482. P. 241–248.
46. Sakurai M., Aoki T., Yoshikawa S. et al., 2009. Differentially expressed *Drl* and *Drl-2* play opposing roles in Wnt5 signaling during *Drosophila* olfactory system development // J. Neurosci. Vol. 29. P. 4972–4980.
47. Sawamoto K., Taguchi A., Hirota Y. et al., 1998. Argos induces programmed cell death in the developing *Drosophila* eye by inhibition of the Ras pathway // Cell Death Differ. Vol. 5. P. 262–270.
48. Schlicht F., Hall J. C., 1979. Neural topography of courtship song in sex mosaics of *Drosophila melanogaster* // J. Comp. Physiol. A. Vol. 129. P. 85–95.
49. Schulz C., Kiger A. A., Tazuke S. I. et al., 2004. A misexpression screen reveals effects of bag-of-marbles and TGF beta class signaling on the *Drosophila* male germ-line stem cell lineage // Genetics. Vol. 167. P. 707–723.
50. Senju S., Iyama K., Kudo H. et al., 2000. Immunocytochemical analyses and targeted gene disruption of *GTPBP1* // Mol. Cell. Biol. Vol. 20. P. 6195–6200.
51. Sonnenfeld M. J., Barazesh N., Sedaghat Y., Fan C., 2004. The jing and ras1 pathways are functionally related during CNS midline and tracheal development // Mech. Dev. Vol. 121. P. 1531–1547.
52. Stark C., Breitzkreutz B. J., Chatr-Aryamontri A. et al., 2011. The BioGRID interaction database: 2011 update // Nucleic Acids Res. Vol. 39. P. D698–D704.
53. Strauss R., 2002. The central complex and the genetic dissection of locomotor behavior // Curr. Opin. Neurobiol. Vol. 12. P. 633–638.
54. Strauss R., Heisenberg M., 1990. Coordination of legs during straight walking and turning in *Drosophila melanogaster* // J. Comp. Physiol. A. Vol. 167. P. 403–412.
55. Suster M. L., Bate M., 2002. Embryonic assembly of a central pattern generator without sensory input // Nature. Vol. 416. P. 174–178.
56. Suster M. L., Martin J. R., Sung C., Robinow S., 2003. Targeted expression of tetanus toxin reveals sets of neurons involved in larval locomotion in *Drosophila* // J. Neurobiol. Vol. 55. P. 233–246.
57. Takei Y., Ozawa Y., Sato M. et al., 2004. Three *Drosophila* EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans // Development. Vol. 131. P. 73–82.
58. Tanaka K. K., Bryantsev A. L., Cripps R. M., 2008. Myocyte enhancer factor 2 and chorion factor 2 collaborate in activation of the myogenic program in *Drosophila* // Mol. Cell. Biol. Vol. 28. P. 1616–1629.
59. Venken K. J., Bellen H. J., 2007. Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster* // Development. Vol. 134. P. 3571–3584.
60. Yao Y., Wu Y., Yin C. et al., 2007. Antagonistic roles of *Wnt5* and the *Drl* receptor in patterning the *Drosophila* antennal lobe // Nat. Neurosci. Vol. 10. P. 1423–1432.

GENETIC STUDY OF MOTOR FUNCTIONS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Fedotov S. A., Bragina J. V., Besedina N. G.,
Danilenkova L. V., Kamysheva E. A., Kamyshev N. G.

✳ **SUMMARY:** To investigate molecular mechanisms of central pattern generators (CPG s) functioning, we carried out a screening of collection of *Drosophila* P-insertional mutants for strong deviations in locomotion and courtship song. In 21 mutants, the site of the P-insertion was localized by sequencing of the fragments of genomic DNA flanking the P-element. Bioinformational analysis revealed a list of candidate genes, potential players in development and functioning of CPG s. Possible involvement of certain identified genes in rhythmic motor activity is suggested for the first time (*CG15630*, *Map205*).



KEY WORDS: *Drosophila*; motor functions; locomotion; sound production; courtship song; P element; insertional mutations; screening; candidate genes.

✿ Информация об авторах

Федотов Сергей Александрович — аспирант, младший научный сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН. Лаборатория физиологии высшей нервной деятельности. Санкт-Петербург, 199034, наб. Макарова, д. 6.

Брагина Юлия Валерьевна — старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН. Лаборатория сравнительной генетики поведения. Санкт-Петербург, 199034, наб. Макарова, д. 6.

Беседина Наталья Геннадьевна — старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН. Лаборатория сравнительной генетики поведения. Санкт-Петербург, 199034, наб. Макарова, д. 6.

Даниленкова Лариса Владимировна — младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН. Лаборатория сравнительной генетики поведения. Санкт-Петербург, 199034, наб. Макарова, д. 6.

Камышева Елена Аркадьевна — младший научный сотрудник, без ученой степени, Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН. Лаборатория сравнительной генетики поведения. Санкт-Петербург, 199034, наб. Макарова, д. 6.

Камышев Николай Григорьевич — руководитель лаборатории, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН. Лаборатория сравнительной генетики поведения. Санкт-Петербург, 199034, наб. Макарова, д. 6. E-mail: nkam@pavlov.infran.ru

Fedotov Sergey Aleksandrovich — Phd student, junior researcher. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. Laboratory of physiology of the higher nervous activity. Saint-Petersburg, 199034, Makarova emb., 6.

Bragina Julia Valerjevna — senior staff scientist, candidate of biological science. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. Laboratory of comparative genetics of behavior. Saint-Petersburg, 199034, Makarova emb., 6.

Besedina Natalia Gennadievna — senior staff scientist, candidate of biological science. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. Laboratory of comparative genetics of behavior. Saint-Petersburg, 199034, Makarova emb., 6.

Danilenkova Larisa Vladimirovna — junior researcher, candidate of biological science. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. Laboratory of comparative genetics of behavior. Saint-Petersburg, 199034, Makarova emb., 6.

Kamysheva Elena Arkadjevna — junior researcher. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. Laboratory of comparative genetics of behavior. Saint-Petersburg, 199034, Makarova emb., 6.

Kamyshev Nikolai Grigorjevich — Head of laboratory, doctor of biological science, senior staff scientist. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. Laboratory of comparative genetics of behavior. Saint-Petersburg, 199034, Makarova emb., 6. E-mail: nkam@pavlov.infran.ru