



УДК 575.224

EDN JJTVUU

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-1-91-102>

## Обучение и память у дрозофилы: роль мутации *white*

Е. А. Никитина<sup>✉1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

<sup>2</sup> Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, 191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48

### Сведения об авторе

Екатерина Александровна Никитина, SPIN-код: 7844-8621, Scopus AuthorID: 56603106300, ResearcherID: L-5761-2014, ORCID: 0000-0003-1897-8392, e-mail: 21074@mail.ru

**Для цитирования:** Никитина, Е. А. (2023) Обучение и память у дрозофилы: роль мутации *white*. *Интегративная физиология*, т. 4, № 1, с. 91–102. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-1-91-102> EDN JJTVUU

**Получена** 12 декабря 2022; прошла рецензирование 7 февраля 2023; принята 9 февраля 2023.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке Государственной программы РФ 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030) (тема 63.1).

**Права:** © Е. А. Никитина (2023). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях [лицензии CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

**Аннотация.** С момента открытия Т. Х. Морганом в 1910 г. ген *white* дрозофилы стал одним из наиболее интенсивно изучаемых и широко использовался в качестве генетического маркера. Многочисленные ключевые научные открытия были сделаны с привлечением трансгенных линий *Drosophila melanogaster*, многие из которых сконструированы на генетическом фоне мутантных линий *white*. Кодированный геном *white* ABC-переносчик критически важен не только для биосинтеза глазных пигментов, но и для транспортировки многих молекулярных субстратов, в том числе биогенных аминов и нейротрансмиттеров. Этим обусловлен тот факт, что данная мутация приводит к образованию сложного фенотипа, затрагивающего не только нарушения зрения, но и двигательную и половую активность, устойчивость к действию стресса, способность к обучению и формированию памяти. Ген *white* играет роль в нескольких парадигмах обучения, ухудшая оперантное обучение и не затрагивая ольфакторное. Цель данной работы состояла в оценке роли мутации *w<sup>1118</sup>* дрозофилы в обучении и формировании памяти в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания, основанного на ольфакторных стимулах. Впервые показано, что мутантная линия *w<sup>1118</sup>* является способной к обучению и характеризуется нормальным протеканием процессов среднесрочной и долгосрочной памяти, как в нормальных условиях, так при воздействии теплового шока.

**Ключевые слова:** дрозофила, мутация *white*, обучение, память, условно-рефлекторное подавление ухаживания

# Learning and memory in *Drosophila*: Role of *white* mutation

E. A. Nikitina<sup>✉1,2</sup>

<sup>1</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

<sup>2</sup> Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

## Author

Ekaterina A. Nikitina, SPIN: 7844-8621, Scopus AuthorID: 56603106300, ResearcherID: L-5761-2014, ORCID: 0000-0003-1897-8392, e-mail: 21074@mail.ru

**For citation:** Nikitina, E. A. (2023) Learning and memory in *Drosophila*: Role of *white* mutation. *Integrative Physiology*, vol. 4, no. 1, pp. 91–102. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-1-91-192> EDN JJTVUU

**Received** 12 December 2022; reviewed 7 February 2023; accepted 9 February 2023.

**Funding:** This study was supported by the Government Program of the Russian Federation 47 GP “Scientific and Technological Development of the Russian Federation” (2019-2030) (63.1).

**Copyright:** © E. A. Nikitina (2023). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

**Abstract.** Since the discovery by T. H. Morgan in 1910, *Drosophila white* gene has become one of the most intensively studied and has been widely used as a genetic marker. Numerous key scientific discoveries have been made involving *Drosophila melanogaster* transgenic stocks, many of which are engineered against the genetic background of *white* mutant stocks. The *white* gene encoded ABC-transporter is critical not only for the biosynthesis of eye pigments, but also for the transport of many molecular substrates, including biogenic amines and neurotransmitters. This is due to the fact that this mutation leads to the formation of a complex phenotype that affects not only vision, but also locomotor and sexual activity, resistance to stress, learning and memory formation. The *white* gene plays a role in several learning paradigms, degrading operant learning and not affecting olfactory. The aim of this study was to assess the role of *Drosophila w<sup>1118</sup>* mutation in learning and memory formation in the conditioned courtship suppression based on olfactory stimuli. For the first time, it has been shown that the *w<sup>1118</sup>* mutant is capable of learning and has normal medium-term and long-term memory, both under normal conditions and under the influence of heat shock.

**Keywords:** *Drosophila*, *white* mutation, learning, memory, conditioned courtship suppression

Белый — это вовсе не нейтральный цвет.  
Это цвет спокойствия — яркий, но не кричащий.

Уолтер Айзексон «Стив Джобс: биография»  
2011

## Введение

История изучения гена *white* (*w*) дрозофилы насчитывает уже свыше 100 лет. Впервые он описан в 1910 г. Томасом Хантом Морганом, отметившим, что этот ген наследуется сцепленно с полом (Morgan 1910). Мэлвин Грин полагает это открытие началом современной генетики (Green 2010). Экспериментальные доказательства связи гена *white* с X-хромосомой были получены в 1916 г. Кэлвином Бриджесом (Bridges 1916). Роль данного гена в становлении и развитии генетики невозможно переоценить. К его изучению обращались ученые при исследовании гетерохроматина и эффекта положения, дозовой компенсации, мобильных генетических элементов, механизмов инсерционного мутагенеза, кроссинговера (Green 2010).

Однако по вопросу природы этого гена ученые долго не могли прийти к единому мнению. Эдвард Льюис отмечает, что Альфред Генри Стёртевант считал это специфичной мутацией, а Джордж Уэлс Бидл — набором аллелей, включающим дикий тип (Lewis 1995). На сегодняшний день известно, что локус *white* характеризуется достаточно сложной аллельной структурой. Согласно FlyBase насчитывается 1024 классических или инсерционных аллельных варианта, 313 хромосомных aberrаций и 436 трансгенных конструкторов. Изменения, лежащие в основе этой вариабельности, разнообразны по своей природе: от единичных замен нуклеотидов до делеций, инсерций и дупликаций. Вследствие этого образуются различные фенотипические варианты (от полной депигментации глаз до коричневых оттенков) (рис. 1).

Ген *white*<sup>+</sup> кодирует трансмембранный ABC-переносчик (рис. 2), который осуществляет транспорт 3-гидроксикинурина — предшественника глазного пигмента оммохрома. Одна



Рис. 1. Аллели локуса *white* *Drosophila melanogaster*. А — дикий тип, В — *white*<sup>1118</sup>, С — *white*<sup>m4h</sup> (Gibert, Peronnet 2021)

Fig. 1. *Drosophila melanogaster white* locus alleles. А—wild type, В—*white*<sup>1118</sup>, С—*white*<sup>m4h</sup> (Gibert, Peronnet 2021)

из функций пигментных гранул глаза мухи — улучшить остроту зрения за счет оптической изоляции рабдомеров внутри каждого омматидия. Соответственно, мухи *w* имеют повышенную светочувствительность (Wu, Wong 1977), но недостаточную остроту зрения (Kalmus 1943). Другая функция белка *white* заключается в защите фоторецепторов сетчатки от чрезмерного воздействия света (Richard et al. 2022). Данный ген экспрессируется в основном в пигментных клетках глаз, мальпигиевых канальцах и семен-

никах (Evans et al. 2008; Sullivan, Sullivan 1975). Очень низкие уровни экспрессии отмечены в глии и нейронах мозга (Bogucz et al. 2008). Кроме того, белок *white* транспортирует биоамины, нейромедиаторы, промежуточные продукты метаболизма, вторичные посредники (Bogucz et al. 2008; Evans et al. 2008). Ген *white* является геном домашнего хозяйства в центральной нервной системе в дополнение к своей классической роли в пигментации глаз (Xiao, Robertson 2017).

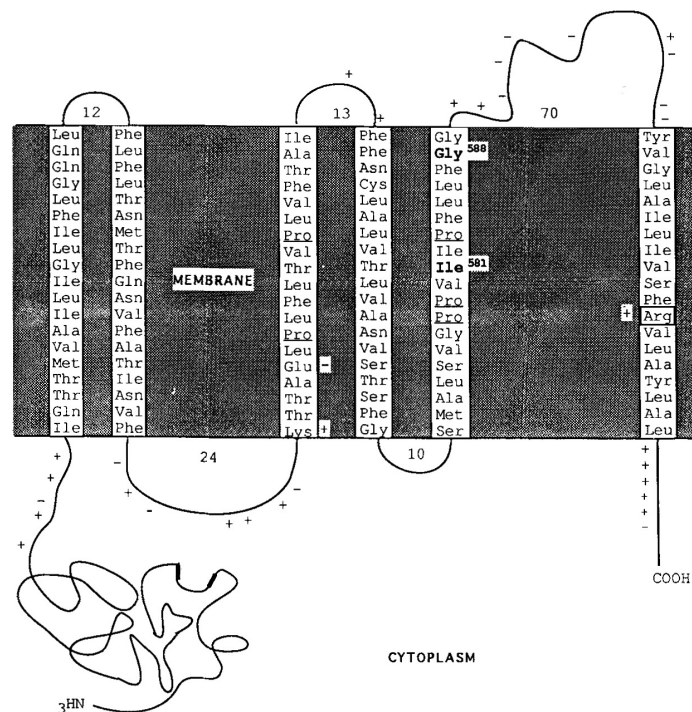


Рис. 2. Модель субъединицы, кодируемой *white*. Числа внутри петель указывают количество аминокислот в петле. Распределение заряженных аминокислот обозначено + или - (Ewart et al. 1994)

Fig. 2. A model of the *white*-encoded subunit. The numbers inside the intra-helical loops indicate the number of amino acids in the loop. The relative distribution of charged amino acids is indicated by + or - (Ewart et al. 1994)

Продукт гена *white* участвует в метаболизме гуанина и триптофана, необходимых для синтеза красного (дрозоптерина) и коричневого (оммохрома) пигментов насекомых (Ewart et al. 1994). У дрозофилы метаболизм данных аминокислот связан с биосинтезом допамина и серотонина (рис. 3). Мутанты по гену *white* характеризуются измененным количеством и распределением в тканях этих нейротрансмиттеров (Vorycz et al. 2008). Таким образом, ген *white* вовлечен в нейрональный контроль различных форм поведения.

Различные мутантные линии по локусу *white* характеризуются отличиями в уровне локомоторной активности, лежащей в основе большинства поведенческих актов — с увеличением интенсивности пигментации возрастали значения локомоторной активности самок и самцов, наименьшими показателями характеризовались белоглазые мухи  $w^1$  (Kostenko, Vorobyova 2012). При этом мутация  $w^{1118}$  приводит к избирательному увеличению высокочастотных (> 0,1 Гц) двигательных компонентов (Xiao, Qiu 2021).

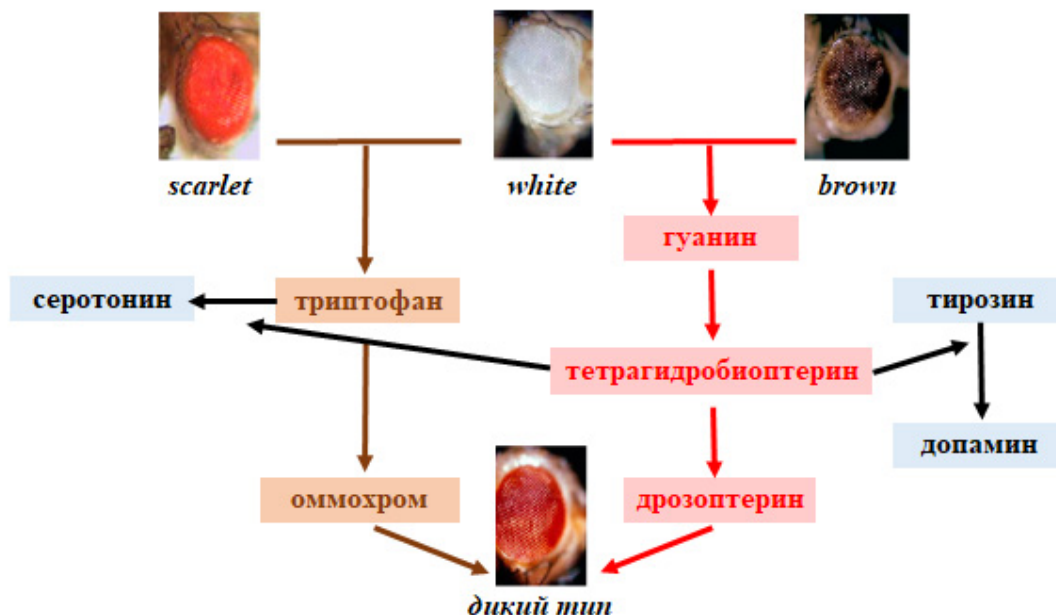


Рис. 3. Вовлеченность белка *white* в биосинтез глазных пигментов дрозофилы и нейротрансмиттеров серотонина и допамина

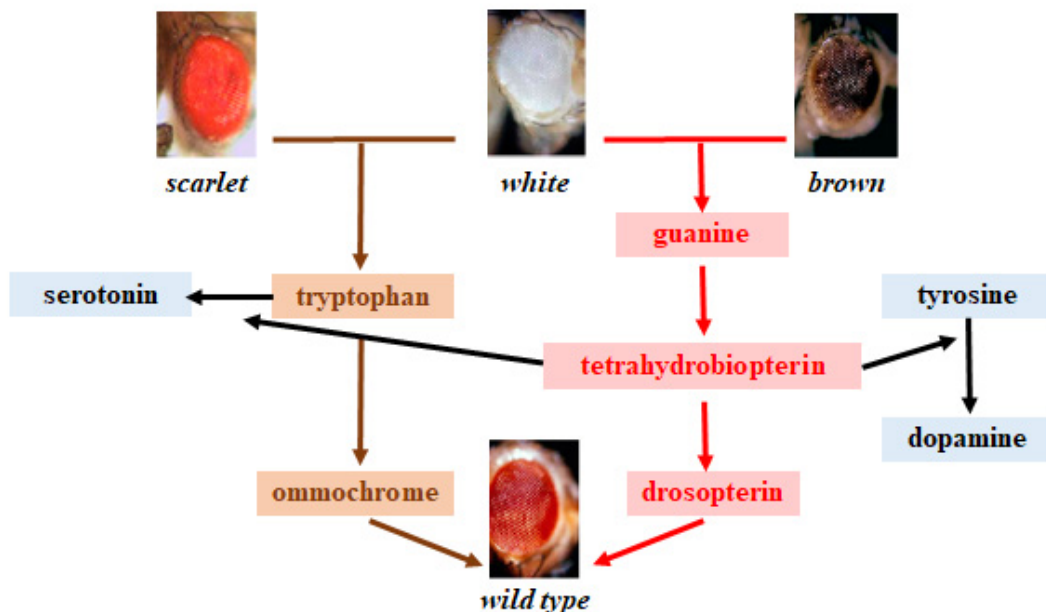


Fig. 3. Involvement of *white* protein in the biosynthesis of *Drosophila* eye pigments and neurotransmitters serotonin and dopamine

Также выявлена вовлеченность гена *white* в восстановление двигательной активности — по сравнению с диким типом мутанты  $w^{1118}$  значительно медленнее восстанавливали локомоторную активность после аноксии (Xiao, Robertson 2016). Это подтверждает плейотропное действие мутации *white* (Hersh 2016).

Дофамин у дрозофилы модулирует широкий спектр поведения, от сна и движения до ухода и обучения. Его повышенный уровень приводит к увеличению общего возбуждения, что влечет за собой повышенную поведенческую реактивность, а именно более энергичные акты ухода (Van Swinderen, Andretic 2011). Это согласуется с результатами исследования агрессивности мутантов *white*. Мутантные самцы, несущие нулевую аллель  $w^{1118}$ , демонстрировали резко сниженный уровень агрессии (лишь 3% от уровня дикого типа). Это может быть объяснено необходимостью для реализации агрессивного поведения полноценного зрительного восприятия, нарушенного у белоглазых мух. Однако у трансгенных мух с нормальным цветом глаз на генетическом фоне  $w^{1118}$  склонность к агрессии восстанавливалась лишь частично (Noyer et al. 2008). Нетривиальные данные получены при изучении сна у дрозофилы, отличающегося выраженными межлинейными различиями. Для мутантов  $w^{1118}$  характерна большая продолжительность ночного сна самцов по сравнению с самками и оплодотворенных самок по сравнению с девственными (Zimmerman et al. 2012).

Мутация *white* также приводит к изменению поведения ухода и способности к обучению. Еще в 1915 г. Стёртевант писал, что самцы *white* менее успешны в уходе за самками, нежели самцы дикого типа (Sturtevant 1915). Однако до сих пор нет прямых доказательств вовлеченности этого гена в успешность спаривания самца и самки. Исследование Костенко, посвященное анализу полового поведения, показало, что мутанты по локусу *white* с более интенсивной пигментацией характеризуются активным поведением на стадиях ухода. Выявлена связь между временными признаками полового поведения и степенью пигментации глаз имаго, которая показывает, что для интенсивно пигментированных особей характерным является меньшая задержка копуляции и, следовательно, более длительный ее процесс (Kostenko 2017). Сходные данные получены и канадскими учеными: 82,5% мух дикого типа копулировали в течение 60 мин, в то время лишь единичные мутанты  $w^{1118}$  вступали в копуляцию, причем эта способность была нарушена именно

у самцов (Xiao et al. 2017). По-видимому, наблюдаемые изменения полового (Kostenko 2017) и двигательного поведения (Kostenko, Vorobyova 2012) на модели локуса *white* имеют общую природу и связаны с плейотропным эффектом мутаций, нарушающих обмен триптофана и приводящих к накоплению промежуточных метаболитов в организме мухи (Zhuravlev et al. 2020).

Упомянутое выше увеличение общего возбуждения самцов *w*, приводящее к возрастанию интенсивности ухода, может иметь косвенным эффектом усиленное ухаживание самца за самцом. В ряде исследований показано, что эктопическая экспрессия гена *white* индуцирует ухаживание самца за самцом. При этом в группе насекомых могут образовываться цепочки и круги из ухаживающих друг за другом самцов (Anaka et al. 2008; Zhang, Odenwald 1995).

Мутация *white* влияет на поведение ухода. У самцов  $w^{1118}$  активность ухода была резко снижена по сравнению с диким типом при дневном свете, но не в темноте. Авторы полагают, что наблюдаемые ими изменения поведения ухода могут быть обусловлены низким уровнем серотонина (Krstic et al. 2013). К рассмотрению роли серотонина обратились и Ситараман с соавторами, показавшие нарушение оперантного пространственного обучения и памяти у мутанта  $w^{1118}$ . Анализ данных по фармакологической коррекции уровня серотонина и дофамина позволяет предположить, что именно серотонин может быть вовлечен в формирование пространственной памяти у дрозофилы (Sitaraman et al. 2008). Однако уровни серотонина в головах дикого типа в этом исследовании были выше по сравнению с другими работами. Более того, Ярали с соавторами не обнаружили различий в уровнях серотонина в мозге мутанта  $w^{1118}$  и мух дикого типа (Yarali et al. 2009). В этой связи внимание исследователей было направлено на другие биохимические пути. Майерс с коллегами связывают обнаруженные ими дефекты ольфакторного ассоциативного обучения у мутанта  $w^{1118}$  с нарушениями гомеостаза холестерина (Myers et al. 2021). Авторы показали, что в парадигме ольфакторного ассоциативного обучения с негативным подкреплением электрошоком мутантные самцы  $w^{1118}$  обучаются хуже по сравнению с диким типом. Крайне интересным является тот факт, что при дополнительных тренировках мутантные самцы  $w^{1118}$  достигали уровня обучения дикого типа. Подобный эффект был показан и ранее другими исследователями — предварительные тренировки повышали частоту

копуляции у мутанта  $w^{1118}$  (Xiao et al. 2017). Опыт спаривания способствует и улучшению эпизодической двигательной активности, сниженной у мутанта  $w^{1118}$  (Qiu et al. 2021).

В этой связи возникает обоснованный вопрос — влияет ли мутация *white* на обучение и память дрозофилы в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания? Преимущество данной методики — ее естественность и физиологичность, в отличие от метода обучения с негативным подкреплением электрошоком (Zhuravlev et al. 2015). Кроме того, показано, что у мутантов  $w^{1118}$  нарушена устойчивость к различным видам стресса (голод, обогащенная сахаром диета, воздействие перекисью водорода) (Ferreiro et al. 2018). Каков же будет эффект других видов стресса, в частности, теплового шока (ТШ)? В предыдущих работах нами было выявлено влияние ТШ на обучение и формирование памяти у дрозофилы, приводившее как к их ухудшению (Nikitina et al. 2003; 2012; Zhuravlev et al. 2022), так и к восстановлению до уровня дикого типа (Nikitina et al. 2014), а также отсутствие такового влияния (Savvateeva-Rorova et al. 2007; 2008).

Таким образом, цель данной работы состояла в оценке роли мутации  $w^{1118}$  дрозофилы в обучении и формировании памяти в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания.

## Материал и методы

### Линии дрозофилы

Работа проведена на животных из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем». Использовали следующие линии *Drosophila melanogaster*:

- 1) *Canton S (CS)* — линия дикого типа; темно-красный цвет глаз.
- 2)  $w^{1118}$  ( $w^{1118}$ ) — мутантная линия, несущая частичную делецию локуса *white* (X: 3B6-3B6); отсутствие глазных пигментов, белый цвет глаз.

Мух выращивали в стаканчиках объемом 160 мл на стандартной изюмно-дрожжевой среде при  $+25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 60% влажности и светотемновом цикле 12 : 12 ч.

### Предъявление теплового шока

Тепловое воздействие проводили в водяном термостате GFL 1086 (GFL, Германия) при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин на стадии самцов-имаго, которых помещали в термостат в предварительно прогретых пробирках,

погруженных в воду. ТШ осуществляли за один час до проведения поведенческого эксперимента (Nikitina et al. 2003).

### Оценка способности к обучению и формированию памяти

Для поведенческих опытов использовали самцов дрозофилы в возрасте пяти суток, которых собирали без эфирного наркоза и содержали индивидуально на изюмно-дрожжевой среде. В качестве объектов ухаживания использовали оплодотворенных за сутки до опыта самок линии *CS* в возрасте пяти суток. Тренировку и тестирование проводили в экспериментальных камерах из оргстекла (диаметр — 15 мм, высота — 5 мм).

Для оценки способности к обучению и формированию среднесрочной (ССП) и долгосрочной (ДСП) памяти самцов дрозофилы была использована методика условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ) (Kamyshev et al. 1999). Для выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания (тренировки) пятисуточного самца исследуемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали вместе с оплодотворенной пятисуточной самкой *CS*: для оценки способности к обучению и формированию SSP — в экспериментальную камеру на 30 мин; для оценки способности к обучению и формированию ДСП — в стакан с питательной средой (объем свободного пространства — около 3 см<sup>3</sup>) на пять часов. Память тестировали через разные интервалы времени после тренировки: для оценки способности к обучению и формированию SSP — 0 и 3 ч; для оценки способности к обучению и формированию ДСП — 0, 2 и 8 суток. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения. Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 с, фиксируя время начала отдельных элементов ухаживания (ориентация и преследование, вибрация, лизание, попытка копуляции), а также время исполнения элементов, не связанных с ухаживанием (побежка, прининг, покой). Регистрацию начинали через 45 с после помещения мухи в камеру. В каждой группе (контрольной, сразу после тренировки и через определенные интервалы времени после тренировки) тестировали не менее 20 пар мух.

Для каждого самца вычисляли индекс ухаживания (ИУ), т. е. время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах от общего времени наблюдения. Для количественной оценки результатов обучения вычисляли индекс обучения (ИО) по следующей формуле:

$$\text{ИО} = \left[ \frac{\text{ИУ}_H - \text{ИУ}_T}{\text{ИУ}_H} \right] \times 100\% = \left( 1 - \frac{\text{ИУ}_T}{\text{ИУ}_H} \right) \times 100\%$$

где ИУ<sub>н</sub> и ИУ<sub>т</sub> — средние индексы ухаживания для независимых выборок самцов, не имеющих опыта полового поведения, и самцов, прошедших тренировку (Kamyshov et al. 1999; Sokal, Rohlf 1995).

Статистическую обработку результатов проводили при помощи рандомизационного анализа ( $\alpha_r < 0,05$ ).

### Результаты

#### Оценка способности к обучению и формированию среднесрочной памяти

У линии дикого типа *CS* в интактном контроле происходила выработка УРПУ, что говорит о способности к обучению. Через три часа ИО не снижался по сравнению с уровнем, достигнутым сразу после окончания тренировки, что свидетельствует о нормальном формиро-

вании процессов ССП (рис. 4А). Это вполне согласуется с нашими предыдущими работами (Nikitina et al. 2021).

У мутанта *w<sup>1118</sup>* в интактном контроле также тренировка приводила к выработке УРПУ, и ИО длительное время сохранялся на исходном уровне, не отличаясь от показателей линии дикого типа (рис. 4А). Это еще раз убеждает в отсутствии нарушений обучения и ССП, недавно продемонстрированном нами (Zatserina et al. 2021; 2022).

Сопоставляя полученные результаты, мы задались закономерным вопросом — будет ли мутация *white* влиять на процессы обучения и памяти при стрессе? Однако воздействие ТШ не оказывало влияния на процессы обучения и ССП у обеих исследуемых линий. ИО сразу после тренировки и через три часа после нее были сопоставимы с таковыми в интактном контроле как у линии *CS*, так и у мутанта *w<sup>1118</sup>* (рис. 4В). Межлинейных различий также не наблюдали.

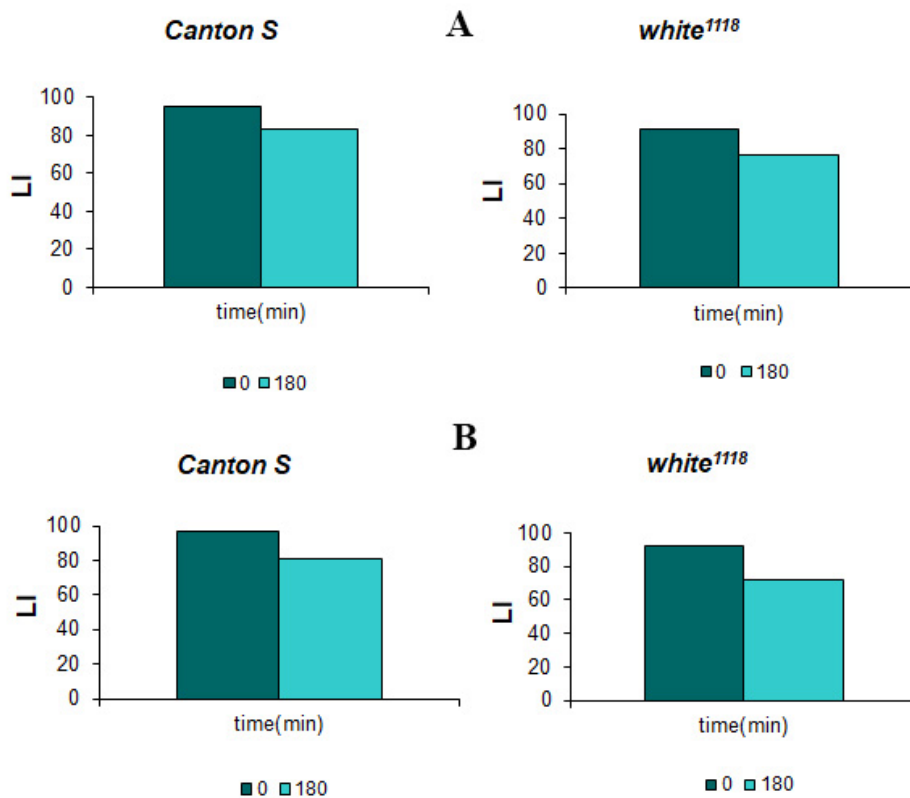


Рис. 4. Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания при тестировании среднесрочной памяти у самцов линии дикого типа *Canton S* и мутанта *white<sup>1118</sup>* *Drosophila melanogaster*. А — интактный контроль, В — воздействие тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки (мин); по оси ординат: LI — индекс обучения (learning index), у. е.

Fig. 4. Dynamics of learning acquisition and medium-term memory retention of conditioned courtship suppression in *D. melanogaster* males of wild type strain *Canton S* and *white<sup>1118</sup>* mutant. А—intact control, В—exposure to heat shock. Abscissa: time after training (min); ordinate: LI—learning index, standard units

Таким образом, ни у линии дикого типа *CS*, ни у мутанта *w<sup>1118</sup>* не выявлено дефектов обучения и ССП ни в норме, ни в условиях стресса.

#### Оценка способности к обучению и формированию долгосрочной памяти

Учитывая сложную нейрофизиологическую основу процессов ДСП (Zhuravlev et al. 2015), мы отдельно проанализировали ее формирование и сохранение у исследуемых линий.

У линии дикого типа *CS* в интактном контроле наблюдали выработку УРПУ после пятичасовой тренировки. ИО сохранялся на высоком уровне на протяжении восьми суток после тренировки, что является свидетельством нормального протекания процессов обучения и формирования ДСП (рис. 5А) и находится в русле наших предыдущих исследований.

У мутанта *w<sup>1118</sup>* в интактном контроле при пятичасовой тренировке не отмечено нарушений способности к обучению так же, как и при

30-минутной. ИО сохранялся на высоком уровне и через двое суток после тренировки. Через восемь суток отмечено снижение ИО, однако не выявлено достоверных отличий ни от ИО сразу после тренировки, ни от линии дикого типа (рис. 5А). Это подтверждает отсутствие нарушений ДСП у мутанта *w<sup>1118</sup>* (Zatserina et al. 2021; 2022).

Обратимся к рассмотрению влияния ТШ на процессы ДСП у исследуемых линий.

У линии дикого типа *CS* ИО сразу после тренировки сопоставим с интактным контролем, что указывает на сохранность способности к обучению. ИО через двое и восемь суток после тренировки снижены по сравнению с интактным контролем, однако достоверных отличий не выявлено (рис. 5В).

У мутанта *w<sup>1118</sup>* ТШ не оказывает влияния на процессы формирования и сохранения ДСП, подтверждением чему служат сходные величины ИО на всех временных интервалах в интактном контроле и при действии ТШ (рис. 5В).

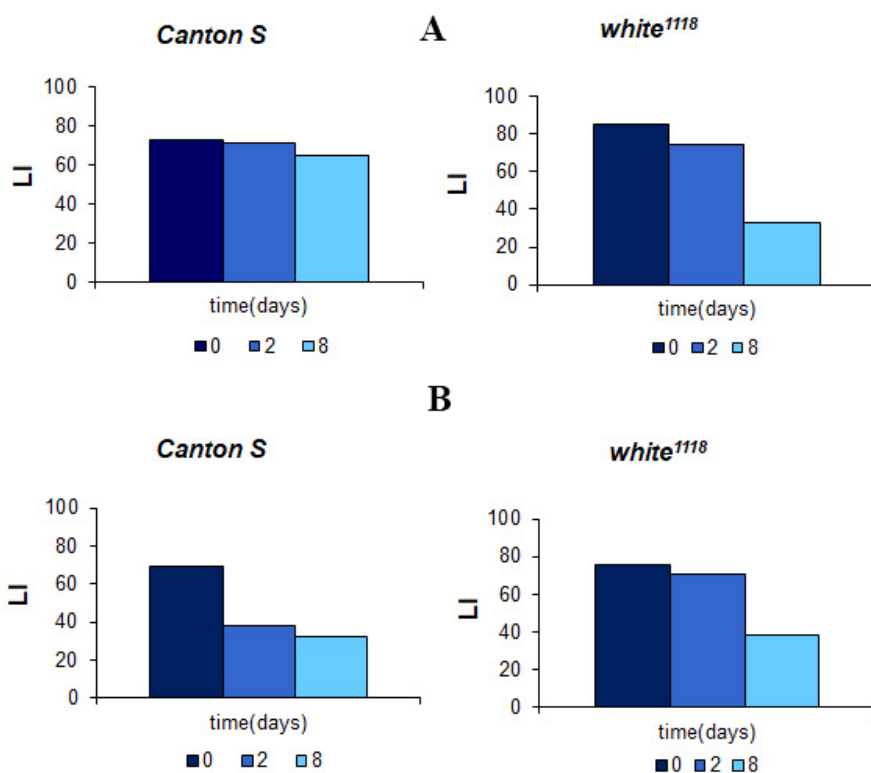


Рис. 5. Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания при тестировании долгосрочной памяти у самцов линии дикого типа *Canton S* и мутанта *white<sup>1118</sup>* *Drosophila melanogaster*. А — интактный контроль, В — воздействие тепловым шоком. По оси абсцисс: время после завершения тренировки (дни); по оси ординат: LI — индекс обучения (learning index), у. е.

Fig. 5. Dynamics of learning acquisition and long-term memory retention of conditioned courtship suppression in *D. melanogaster* males of wild type strain *Canton S* and *white<sup>1118</sup>* mutant. A—intact control, B—exposure to heat shock. Abscissa: time after training (days); ordinate: LI—learning index, standard units



Итак, у обеих линий не обнаружено нарушений обучения и ДСП ни в интактном контроле, ни при действии ТШ.

Резюмируя результаты экспериментов, можно сказать, что обе линии (*CS* и *w<sup>1118</sup>*) являются способными к обучению при различном режиме тренировок (30 минут и пять часов) и характеризуются нормальным протеканием процессов как среднесрочной, так и долгосрочной памяти. При этом ТШ не влияет на обучение и формирование различных типов памяти у этих линий. Если для линии дикого типа *CS* это было ожидаемо, то для мутанта *w<sup>1118</sup>* показано впервые.

### Обсуждение

У человека существует по меньшей мере восемь гомологов гена *white* дрозофилы. Полиморфизмы одного из них, *ABCG1*, связаны с паническими расстройствами у мужчин (Nakamura et al. 1999). Известно о вовлеченности этих генов в фосфолипидный метаболизм и в этиопатогенез болезни Танжера (Schmitz et al. 2001), а также в развитие атеросклероза (Matsuo 2022). Таким образом, в то время как различия между мозгом и поведением человека и дрозофилы неоспоримы, ген *white* дрозофилы крайне важен для проведения модельных исследований, являясь высококонсервативным и кодируя АВС-переносчик метаболитов с широкой специфичностью, что может обуславливать множественные биологические роли, включая нейрональный контроль различных форм поведения.

Половое поведение дрозофилы представляет собой сложный репертуар действий, включающих обмен зрительными, звуковыми и хемосенсорными сигналами между партнерами (Sturtevant 1915). Этот обмен происходит в определенном порядке и зависит от динамической обратной связи, причем каждый партнер изменяет свое поведение в ответ на принимаемые сигналы. Большинство аспектов поведения ухаживания дрозофилы имеет полигенную природу, причем вовлеченные гены часто имеют плейотропные эффекты (Hall 1994).

Разработка методов трансформации зародышевой линии привела к получению тысяч трансгенных линий дрозофилы, используемых для изучения широкого спектра биологических вопросов, в том числе и поведения. Это технология основана главным образом на использовании *white*-мутантных эмбрионов для конструирования трансгенных линий мух (St. Johnston 2013). В этой связи необходимо скрупулезно интерпретировать результаты экспериментов

с использованием трансгенных линий, полученных с использованием мутантов *white*, особенно в области исследований поведения. Это обусловлено тем, что данная мутация приводит к образованию сложного фенотипа, затрагивающего не только нарушения зрения, но и продолжительность жизни, двигательную и половую активность, устойчивость к действию стресса, способность к обучению и формированию памяти.

Критический вопрос, возникающий в данном контексте, — влияет ли нарушение зрения у мутанта *w<sup>1118</sup>* на поведение ухаживания, требующее обмена зрительными сигналами? Здесь крайне важно учитывать специфику методик исследования полового поведения. При использовании методик, основанных на ольфакторном обучении, ведущими являются обонятельные стимулы. Хотя, безусловно, нельзя отвергать роль зрительных сигналов. Так, в наших экспериментах мутанты *w<sup>1118</sup>* демонстрировали сниженную по сравнению с диким типом интенсивность ухаживания, сопоставимую с наблюдаемой нами в ранних работах для белоглазого мутанта *l(1)ts403*, несущего также мутации *brown* и *scarlet*, взаимодействие которых дает белый цвет глаз (Nikitina et al. 2003). Низкий уровень ухаживания может быть обусловлен нарушением зрения, а не специфичным действием мутации *white*, т. к. мухи *l(1)ts403; bw; st* несут аллель *w<sup>+</sup>*. Следует отдельно отметить, что ИО, используемый для количественной оценки результатов обучения, непосредственно не зависит от интенсивности ухаживания.

В то же время оценка остроты обоняния не выявила значимых различий между мутантами *w* и линией дикого типа *CS* (Diegelmann et al. 2006), что крайне важно для интерпретации результатов исследований с использованием методик ольфакторного обучения. Авторы сопоставили разные парадигмы обучения — ольфакторное и оперантное. Было выявлено нарушение оперантного пространственного обучения и памяти у мутанта *w<sup>1118</sup>*, подтвержденное впоследствии другими исследователями (Sitaraman et al. 2008). Однако в парадигме ольфакторного ассоциативного обучения с негативным подкреплением электрошоком данный мутант не демонстрировал нарушений обучения и краткосрочной памяти. Напротив, при низких значениях напряжения (10–30 В) уровень обучения *w<sup>1118</sup>* выше по сравнению с диким типом *CS* (Diegelmann et al. 2006). Эти результаты не согласуются с недавней работой Майерс с коллегами, показавшими ухудшение обучения и краткосрочной памяти *w<sup>1118</sup>* по сравнению

с диким типом в данной парадигме (Myers et al. 2021). Необходимо указать на методические детали постановки экспериментов — разные временные интервалы между ударами током, так называемая короткая программа по сравнению с классической длинной. А ведь в работе Ярали с коллегами как раз подмечено, что величина временных интервалов является критической (Yarali et al. 2009). Важно отметить, что Майерс с соавторами применяли напряжение 90 В, хотя известно, что мутант  $w^{1118}$  характеризуется повышенной чувствительностью к электрическому шоку (Diegelmann et al. 2006). Кроме того, авторы отмечают, что проведение дополнительных тренировок приводит к сопоставимым уровням обучения  $w^{1118}$  и *CS*. В контексте обсуждаемой проблемы хочется согласиться с мнением Сёрена Дигельманна о неидеальности метода ольфакторного ассоциативного обучения с негативным подкреплением электрошоком.

Возвращаясь к ключевому вопросу об интерпретации результатов поведенческих экспериментов с привлечением трансгенных линий на генетическом фоне *white*, необходимо акцентировать внимание на необходимости тщательного продумывания методических подходов, основываясь в том числе на их физиологичности. Также важно учитывать особенности мутантов *white*, в частности, известно, что дефекты, вызванные мутацией  $w^{1118}$ , слабо выражены в молодом возрасте (Ferreiro et al. 2018).

## Заключение

Использование мутантной линии *white* при конструировании трансгенных линий дрозофилы оправданно в свете наличия легко и однозначно определяемых генетических маркеров. Однако это привносит сложности в интерпретацию экспериментальных результатов, так как данный ген характеризуется плеiotропным действием, затрагивающим не только зрение, но и другие аспекты жизнедеятельности, включая поведение, обучение и память. Отсутствие светоэкранирующих пигментов ухудшает способность самца визуально отслеживать партнера, уменьшая успех при спаривании. Ген *white* играет роль в нескольких парадигмах обучения, ухудшая оперантное обучение и не затрагивая ольфакторное, что подтверждает различия механизмов их реализации. Особенности как обучения, так и поведения ухаживания мутанта *white* могут быть обусловлены нейромедиаторами, уровни которых зависят от кодируемого этим геном ABC-переносчика. Хотя многочисленные исследования связывают проявления *white* с изменением уровня серотонина, их биохимические механизмы пока детально неясны.

## Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

## Conflict of Interest

The author declares that there is no conflict of interest, either existing or potential.

## References

- Anaka, M., MacDonald, C. D., Barkova, E. et al. (2008) The *white* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a protein with a role in courtship behavior. *Journal of Neurogenetics*, vol. 22, no. 4, pp. 243–276. <https://doi.org/10.1080/01677060802309629> (In English)
- Borycz, J., Borycz, J. A., Kubów, A. et al. (2008) *Drosophila* ABC transporter mutants *white*, *brown* and *scarlet* have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *Journal of Experimental Biology*, vol. 211, no. 21, pp. 3454–3466. <https://doi.org/10.1242/jeb.021162> (In English)
- Bridges, C. B. (1916) Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity (Concluded). *Genetics*, vol. 1, no. 2, pp. 107–163. <https://doi.org/10.1093/genetics/1.2.107> (In English)
- Diegelmann, S., Zars, M., Zars, T. (2006) Genetic dissociation of acquisition and memory strength in the heat-box spatial learning paradigm in *Drosophila*. *Learning & Memory*, vol. 13, no. 1, pp. 72–83. <https://doi.org/10.1101/lm.45506> (In English)
- Evans, J. M., Day, J. P., Cabrero, P. et al. (2008) A new role for a classical gene: *White* transports cyclic GMP. *Journal of Experimental Biology*, vol. 211, no. 6, pp. 890–899. <https://doi.org/10.1242/jeb.014837> (In English)
- Ewart, G. D., Cannell, D., Cox, G. B., Howells, A. J. (1994) Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 14, pp. 10370–10377. PMID: 8144619 (In English)
- Ferreiro, M. J., Pérez, C., Marchesano, M. et al. (2018) *Drosophila melanogaster white* mutant  $w^{1118}$  undergo retinal degeneration. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 11, article 732. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00732> (In English)
- Gibert, J.-M., Peronnet, F. (2021) The paramount role of *Drosophila melanogaster* in the study of epigenetics: From simple phenotypes to molecular dissection and higher-order genome organization. *Insects*, vol. 12, no. 10, article 884. <https://doi.org/10.3390/insects12100884> (In English)

- Green, M. M. (2010) 2010: A century of *Drosophila* genetics through the prism of the white gene. *Genetics*, vol. 184, no. 1, pp. 3–7. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.110015> (In English)
- Hall, J. C. (1994) The mating of a fly. *Science*, vol. 264, no. 5166, pp. 1702–1714. <https://doi.org/10.1126/science.8209251> (In English)
- Hersh, B. M. (2016) More than meets the eye: A primer for “Timing of locomotor recovery from anoxia modulated by the *white* gene in *Drosophila melanogaster*”. *Genetics*, vol. 204, no. 4, pp. 1369–1375. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.196519> (In English)
- Hoyer, S. C., Eckart, A., Herrel, A. et al. (2008) Octopamine in male aggression of *Drosophila*. *Current Biology*, vol. 18, no. 3, pp. 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.052> (In English)
- Kalmus, H. (1943) The optomotor responses of some eye mutants of *Drosophila*. *Journal of Genetics*, vol. 45, pp. 206–213. <https://doi.org/10.1007/BF02982936> (In English)
- Kamyshev, N. G., Iliadi, K. G., Bragina, J. V. (1999) *Drosophila* conditioned courtship: Two ways of testing memory. *Learning & Memory*, vol. 6, no. 1, pp. 1–20. PMID: [10355520](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10355520/) (In English)
- Kostenko, V. V. (2017) Sravnitel'nyj analiz priznakov polovogo povedeniya u mutantov lokusa *white* imago *Drosophila melanogaster* [Comparative analysis of mating behavior characteristics of mutants at the *white* locus of *Drosophila melanogaster*]. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya: Estestvennyye nauki — Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series*, vol. 159, no. 2, pp. 293–305. (In Russian)
- Kostenko, V. V., Vorobyova, L. I. (2012) Vliyanie alelej lokusa *white* i geneticheskogo fona na lokomotornyuyu aktivnost' imago *Drosophila melanogaster* [The influence of *white* alleles and genetic background on locomotor activity of adult *Drosophila melanogaster*]. *Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta im. V. N. Karazina. Seriya: Biologiya — The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series: Biology*, vol. 16, no. 1035, pp. 90–96. (In Russian)
- Krstic, D., Boll, W., Noll, M. (2013) Influence of the *white* locus on the courtship behaviour of *Drosophila* males. *PLoS One*, vol. 8, no. 10, article e77904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077904> (In English)
- Lewis, E. B. (1995) Remembering Sturtevant. *Genetics*, vol. 141, no. 4, pp. 1227–1230. <https://doi.org/10.1093/genetics/141.4.1227> (In English)
- Matsuo, M. (2022) ABCA1 and ABCG1 as potential therapeutic targets for the prevention of atherosclerosis. *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 148, no. 2, pp. 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2021.11.005> (In English)
- Morgan, T. H. (1910) Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science*, vol. 32, no. 812, pp. 120–122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120> (In English)
- Myers, J. L., Porter, M., Narwold, N. et al. (2021) Mutants of the *white* ABCG transporter in *Drosophila melanogaster* have deficient olfactory learning and cholesterol homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 23, article 12967. <https://doi.org/10.3390/ijms222312967> (In English)
- Nakamura, M., Ueno, S., Sano, A., Tanabe, H. (1999) Polymorphisms of the human homologue of the *Drosophila white* gene are associated with mood and panic disorders. *Molecular Psychiatry*, vol. 4, no. 2, pp. 155–162. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000515> (In English)
- Nikitina, E. A., Kaminskaya, A. N., Molotkov, D. A. et al. (2014) Effect of heat shock on courtship behavior, sound production, and learning in comparison with the brain content of LIMK1 in *Drosophila melanogaster* males with altered structure of the *limk1* gene. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 50, no. 2, pp. 154–166. <https://doi.org/10.1134/S0022093014020082> (In English)
- Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V., Dolgaya, Yu. F. et al. (2012) Involvement of GDNF and LIMK1 and heat shock proteins in *Drosophila* learning and memory formation. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 48, no. 5-6, pp. 529–539. <https://doi.org/10.1134/S0022093012050076> (In English)
- Nikitina, E. A., Tokmatcheva, E. V., Savateeva-Popova, E. V. (2003) Heat shock during the development of central structures of the *Drosophila* brain: Memory formation in the *l(1)ts403* mutant of *Drosophila melanogaster*. *Russian Journal of Genetics*, vol. 39, no. 1, pp. 25–31. <https://doi.org/10.1023/A:1022062609102> (In English)
- Nikitina, E. A., Zhuravlev, A. V., Savateeva-Popova, E. V. (2021) Vliyanie narusheniya sinteza kinureninov na pamyat' u drozofily [Effect of impaired kynurenine synthesis on memory in *Drosophila*]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1, pp. 49–60. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-49-60> (In Russian)
- Qiu, S., Li, C., Cao, G., Xiao, C. (2021) Mating experience modifies locomotor performance and promotes episodic motor activity in *Drosophila melanogaster*. *Zoology*, vol. 144, article 125854. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2020.125854> (In English)
- Richard, M., Doubková, K., Nitta, Yo. et al. (2022) A quantitative model of sporadic axonal degeneration in the *Drosophila* visual system. *Journal of Neuroscience*, vol. 42, no. 24, pp. 4937–4952. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2115-21.2022> (In English)
- Savateeva-Popova, E. V., Popov, A. V., Grossman, A. et al. (2007) Pathogenic chaperone-like RNA induces congophilic aggregates and facilitates neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell Stress & Chaperones*, vol. 12, no. 1, pp. 9–19. (In English)

- Savvateeva-Popova, E. V., Popov, A. V., Grossman, A. et al. (2008) Non-coding RNA as a trigger of neuropathologic disorder phenotypes in transgenic *Drosophila*. *Journal of Neuronal Transmission*, vol. 115, no. 12, pp. 1629–1642. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0078-8> (In English)
- Schmitz, G., Langmann, T., Heimerl, S. (2001) Role of *ABCG1* and other *ABCG* family members in lipid metabolism. *Journal of Lipid Research*, vol. 42, no. 10, pp. 1513–11520. PMID: [11590207](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11590207/) (In English)
- Sitaraman, D., Zars, M., LaFerriere, H. et al. (2008) Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 105, no. 14, pp. 5579–5584. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710168105> (In English)
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1995) *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: W. H. Freeman Publ., 887 đ. (In English)
- St. Johnston, D. (2013) Using mutants, knockdowns, and transgenesis to investigate gene function in *Drosophila*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, vol. 2, no. 5, pp. 587–613. <https://doi.org/10.1002/wdev.101> (In English)
- Sturtevant, A. H. (1915) Experiments on sex recognition and the problem of sexual selection in *Drosophila*. *Journal of Animal Behavior*, vol. 5, no. 5, pp. 351–366. <https://doi.org/10.1037/h0074109> (In English)
- Sullivan, D. T., Sullivan, M. C. (1975) Transport defects as the physiological basis for eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Genetics*, vol. 13, no. 9-10, pp. 603–613. <https://doi.org/10.1007/BF00484918> (In English)
- Van Swinderen, B., Andretic, R. (2011) Dopamine in *Drosophila*: Setting arousal thresholds in a miniature brain. *Proceedings of the Royal Society. Series B: Biological Sciences*, vol. 278, no. 1707, pp. 906–913. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2564> (In English)
- Wu, C. F., Wong, F. (1977) Frequency characteristics in the fly visual system of *Drosophila*: Genetic dissection of electroretinogram components. *Journal of General Physiology*, vol. 69, no. 6, pp. 705–724. <https://doi.org/10.1085/jgp.69.6.705> (In English)
- Xiao, C., Robertson, R. M. (2016) Timing of locomotor recovery from anoxia modulated by the *white* gene in *Drosophila*. *Genetics*, vol. 203, no. 2, pp. 787–797. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185066> (In English)
- Xiao, C., Robertson, R. M. (2017) White—cGMP interaction promotes fast locomotor recovery from anoxia in adult *Drosophila*. *PLoS One*, vol. 12, no. 1, article e0168361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168361> (In English)
- Xiao, C., Qiu, S. (2021) Frequency-specific modification of locomotor components by the *white* gene in *Drosophila melanogaster* adult flies. *Genes, Brain and Behavior*, vol. 20, no. 2, article e12703. <https://doi.org/10.1111/gbb.12703> (In English)
- Xiao, C., Qiu, S., Robertson, R. M. (2017) The *white* gene controls copulation success in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, vol. 7, article 7712. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08155-y> (In English)
- Yarali, A., Krischke, M., Michels, B. et al. (2009) Genetic distortion of the balance between punishment and relief learning in *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics*, vol. 23, no. 1-2, pp. 235–247. <https://doi.org/10.1080/01677060802441372> (In English)
- Zatsepina, O. G., Chuvakova, L. N., Nikitina E. A. et al. (2022) Genes responsible for H<sub>2</sub>S production and metabolism are involved in learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *Biomolecules*, vol. 12, no. 6, article 751. <https://doi.org/10.3390/biom12060751> (In English)
- Zatsepina, O. G., Nikitina, E. A., Shilova, V. Y. et al. (2021) *Hsp70* affects memory formation and behaviorally relevant gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress and Chaperones*, vol. 26, no. 3, pp. 575–594. <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01203-7> (In English)
- Zhang, S. D., Odenwald, W. F. (1995) Misexpression of the *white* (*w*) gene triggers male-male courtship in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 92, no. 12, pp. 5525–5529. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5525> (In English)
- Zhuravlev, A. V., Nikitina, E. A., Savvateeva-Popova, E. V. (2015) Obuchenie i pamyat' u drozofily: fiziologo-geneticheskie osnovy [Learning and memory in *Drosophila*: Physiologic and genetic bases]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*, vol. 46, no. 1, pp. 76–92. (In Russian)
- Zhuravlev, A. V., Nikitina, E. A., Savvateeva-Popova, E. V. (2020) Rol' kinureninov v regulyatsii povedeniya i protsessov pamyati u drozofily [Role of kynurenines in regulation of behavior and memory processes in *Drosophila*]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 1, no. 1, pp. 40–50. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-1-40-50> (In Russian)
- Zhuravlev, A. V., Shchegolev, B. F., Zakharov, G. A. et al. (2022) 3-hydroxykynurenine as a potential ligand for *hsp70* proteins and its effects on *Drosophila* memory after heat shock. *Molecular Neurobiology*, vol. 59, pp. 1862–1871. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02704-3> (In English)
- Zimmerman, J. E., Chan, M. T., Jackson, N. et al. (2012) Genetic background has a major impact on differences in sleep resulting from environmental influences in *Drosophila*. *SLEEP*, vol. 35, no. 4, pp. 545–557. <http://doi.org/10.5665/sleep.1744> (In English)