

ГЕНОТИП ЭНДОСИМБИОНТА *Wolbachia pipientis* ВЛИЯЕТ НА МЕТАБОЛИЗМ ОКТОПАМИНА У САМОК *Drosophila melanogaster*

© 2019 г. Н. В. Адоньева¹, Е. В. Бурдина¹, Р. А. Быков¹, Н. Е. Груntenко¹, И. Ю. Раушенбах¹, *

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: iraushen@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 03.07.2018 г.

После доработки 07.08.2018 г.

Принята к публикации 20.08.2018 г.

Исследовано влияние генотипа эндосимбионта дрозофилы *Wolbachia pipientis* на метаболизм октопамина, одного из основных биогенных аминов насекомых, у молодых самок *Drosophila melanogaster*. Измерялись активность ключевого фермента синтеза октопамина – тирозиндекарбоксилазы и активность фермента его деградации – октопамин-зависимой N-ацетилтрансферазы. Показано, что в нормальных условиях у самок, инфицированных бактериями патогенного штамма *wMelPop*, повышена, а бактериями генотипа *wMelCS* снижена активность обоих исследованных ферментов, в то время как у самок, инфицированных *wMel*-генотипом, она не отличается от таковой у неинфицированных мух. Обнаружено также, что у всех самок, инфицированных *Wolbachia*, снижена интенсивность ответа тирозиндекарбоксилазы на тепловой стресс. Таким образом, впервые продемонстрировано влияние *Wolbachia* на метаболизм октопамина у самок дрозофилы и показано, что характер этого влияния определяется генотипом симбионта.

Ключевые слова: тирозиндекарбоксилаза, октопамин-зависимая N-ацетилтрансфераза, *Wolbachia*, *Drosophila*, стресс.

DOI: 10.1134/S0016675819050023

Одним из самых распространенных прокариотических симбионтов беспозвоночных является внутриклеточная α -протеобактерия *Wolbachia pipientis*, которая встречается у 40% наземных членистоногих [1]. *Wolbachia* передается по материнской линии и может манипулировать детерминацией пола и репродуктивной системой хозяина для того, чтобы способствовать распространению *Wolbachia* в популяции хозяина [2]. С другой стороны, инфицирование *Wolbachia* может быть полезно для хозяина [3, 4]. Различия в фенотипических проявлениях инфицирования могут быть связаны с особенностями физиологии организма хозяина, включая процессы эндокринной регуляции роста, развития и приспособленности [4–6]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе взаимодействий *Wolbachia*–хозяин, а также физиологические механизмы, с помощью которых *Wolbachia* способствует адаптации организма хозяина, остаются во многом невыясненными. Одним из таких механизмов может быть влияние *Wolbachia* на метаболизм октопамина – одного из стресс-связанных гормонов насекомых.

Октопамин – один из основных биогенных аминов насекомых – функционирует как 1) нейротрансмиттер, пропускающий нервный импульс через синаптическую щель; 2) нейромодулятор, локально влияющий на соседние клетки центральной нервной системы, модифицируя действие нейротрансмиттера, и 3) нейрогормон, который транспортируется с током гемолимфы и действует на значительных расстояниях [7]. Октопамин контролирует устойчивость к голоданию, продолжительность жизни и баланс между экономным и затратным метаболическими режимами у дрозофилы [8].

Содержание биогенных аминов в каждый момент времени определяется соотношением их синтеза и деградации [7, 9]. Ключевым ферментом синтеза октопамина является тирозиндекарбоксилаза (ТДК), превращающая тирозин в тирамин, предшественник октопамина. Основным ферментом, катаболизирующим октопамин, является октопамин-зависимая арилалкиламин-N-ацетилтрансфераза (ОАТ) [7, 9].

Рошайб с соавт. [10] исследовали влияние инфицирования мух *wMelPop*, *wMel* и *wMelCS* вари-

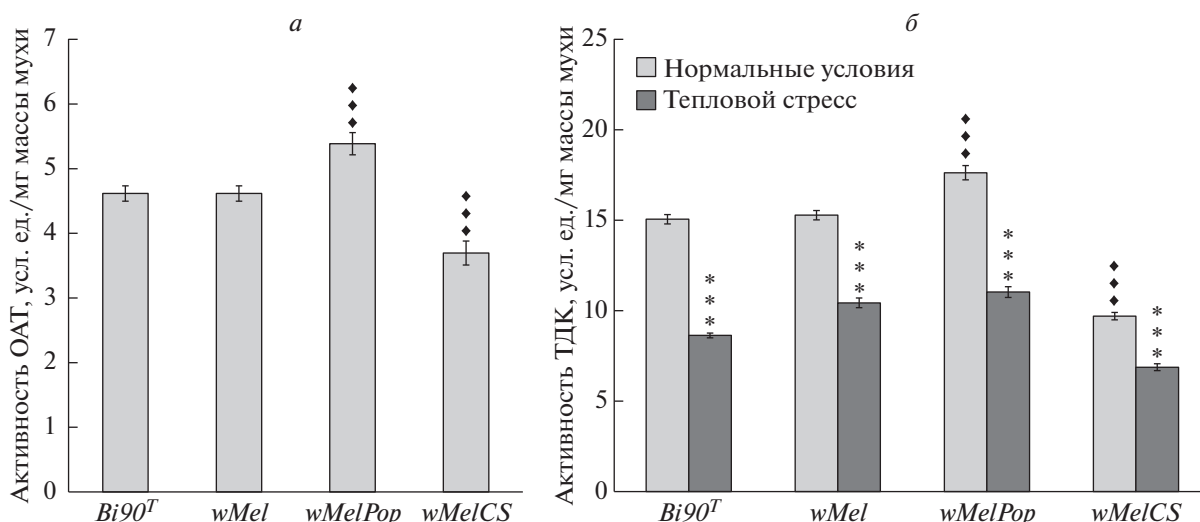


Рис. 1. Влияние генотипа *Wolbachia pipientis* на метаболизм октопамина (ОА) у 1-суточных самок *Drosophila melanogaster*. Активность (а) фермента, деградирующего ОА, ОА-зависимой N-ацетилтрансферазы (ОАТ), и (б) ключевого фермента синтеза ОА, тирозиндекарбоксилазы (ТДК), в нормальных условиях и после теплового стресса (38°C, 1 ч) у самок линий *Bi90^T* и *Bi90*, инфицированных типами *Wolbachia wMel*, *wMelPop* и *wMelCS*. Каждое значение – среднее из 10–20 измерений. Ромб – достоверность отличий от неинфицированных особей, звездочка – достоверность различий контрольных и стрессированных самок одного генотипа (три ромба или звездочки – достоверность отличий при $p < 0.001$).

антами *Wolbachia* на уровень и биосинтез октопамина (уровень транскрипции ТДК2 и тирозин- β -гидроксилазы) в головах самцов *D. melanogaster* и обнаружили негативное влияние штамма *wMelPop* на оба параметра, но не обнаружили разницы в пути биосинтеза октопамина между неинфицированными особями и мухами, инфицированными генотипами *wMel* и *wMelCS*.

В настоящей работе мы исследовали влияние различных вариантов инфекции *Wolbachia pipientis* (*wMel*, *wMelPop* и *wMelCS*) на метаболизм октопамина в теле самок дрозофилы – активность ОАТ в нормальных условиях и активность ТДК в нормальных условиях и при тепловом стрессе (ранее мы показали, что у дрозофилы ТДК является компонентом стресс-реакции [11]). Мы также убедились посредством ПЦР-анализа со специфическими праймерами к генам *Wolbachia wsp* и *16SrRNA*, что тепловой стресс 38°C длительностью 1 ч не приводит к потере инфекции [12, 13].

В работе использованы специально созданные нами линии с замещенной цитоплазмой на едином ядерном фоне [14]. В качестве донора ядерного фона использована изосамочная линия *Bi90*, которая была создана в 2004 г. на основе сборов в популяции г. Бишкек (Кыргызстан). Эта линия до начала настоящей работы прошла не менее 300 поколений внутрелинейных скрещиваний и мо-

жет считаться инбредной. Линия *Bi90* инфицирована *Wolbachia*, генотип *wMel*, клада V. Одна пара мух из общего пула *Bi90* была размножена, и потомки этой отводки использованы в экспериментах. В качестве контроля использовалась неинфицированная отводка линии *Bi90^T*, созданная посредством культивирования мух на корме, содержащем 0.03% тетрациклина, в течение трех поколений. Линии, инфицированные *Wolbachia* генотипов *wMel*, *wMelCS* и штамма *wMelPop*, получены путем последовательных скрещиваний самки, обладающей соответствующим цитоплазматическим фоном, с самцом неинфицированной линии *Bi90^T* в течение 20 поколений.

Рисунок 1,а демонстрирует результаты измерения активности ОАТ у 1-суточных неинфицированных самок линии *Bi90^T* и самок, инфицированных бактериями *wMel*, *wMelPop* и *wMelCS*. Видно, что активность ОАТ у линий, инфицированных *wMelPop*, существенно выше, а у инфицированных *wMelCS* – существенно ниже, чем у *Bi90^T* (различия достоверны при $p < 0.001$ для обоих типов *Wolbachia*). У самок линии с инфекцией *wMel* активность ОАТ не отличается от линии *Bi90^T*.

Повышение/снижение активности фермента, деградирующего октопамин, должно привести к снижению/повышению уровня амина. Ранее мы показали существование механизма негативной

обратной связи между уровнем биогенных аминов (дофамина и октопамина) и активностью ферментов их синтеза [15]. В таком случае можно ожидать, что снижение/повышение уровня октопамина (в результате повышения/снижения активности ОАТ) приведет к повышению/снижению активности ключевого фермента его синтеза. Чтобы это проверить, мы измерили активность ТДК у 1-суточных самок всех исследуемых линий.

На рис. 1,б представлены результаты измерения активности ТДК в нормальных условиях и после теплового (38°C, 1 ч) стресса. Видно, что активность ТДК у самок, инфицированных *Wolbachia wMel*-генотипа, такая же, как у неинфицированных самок линии *Bi90^T*. По сравнению с этим уровнем активность ТДК у самок, инфицированных *Wolbachia wMelPop*-штамма, повышена, а у самок, инфицированных *Wolbachia wMelCS*-генотипа, понижена (различия достоверны при $p < 0.001$ для обеих групп).

Необходимо отметить, что у всех самок, инфицированных *Wolbachia*, снижена интенсивность ответа (стресс-реактивность) на тепловой стресс: стресс-реактивность ТДК самок *Bi90^T* составляет 42.7%, инфицированных *wMel* – 30.9%, *wMelPop* – 37.4%, *wMelCS* – 29.1% (различия с *Bi90^T* достоверны при $p < 0.01$ для *wMelPop* и при $p < 0.001$ для *wMel* и *wMelCS*).

Итак, у самок дрозофилы разные генотипы *Wolbachia* оказывают различное влияние на метаболизм октопамина в нормальных условиях, но однонаправленно влияют на стресс-ответ хозяина. Таким образом, впервые продемонстрировано, что характер влияния *Wolbachia* на метаболизм октопамина у самок дрозофилы определяется генотипом симбионта.

Авторы благодарят доктора Луиса Тейшейру (Институт науки им. Гюльбенкяна, Лиссабон, Португалия) за предоставление линии *D. melanogaster*, инфицированной штаммом *Wolbachia wMelPop*.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-04-00060 и Б.П. № 0324-2019-0016.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zug R., Hammerstein P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected // PLoS One. 2012. 7(6): e38544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038544>
2. Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology // Nat. Rev. Microbiol. 2008. V. 6 (10). P. 741–751. doi 10.1038/nrmicro1969
3. Weeks A.R., Turelli M., Harcombe W.R. et al. From parasite to mutualist: Rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila* // PLoS Biol. 2007. V. 5(5). doi.org/10.1371/journal.pbio.0050114
4. Teixeira L., Ferreira A., Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* // PLoS Biol. 2008. doi.org/10.1371/journal.pbio.1000002
5. Ikeya T., Broughton S., Alic N. et al. The endosymbiont *Wolbachia* increases insulin/IGF-like signalling in *Drosophila* // Proc. R. Soc. Biol. Sci. 2009. V. 276(1674). P. 3799–3807. doi 10.1098/rspb.2009.0778
6. Faria V.G., Martins N.E., Magalhães S. et al. *Drosophila* adaptation to viral infection through defensive symbiont evolution // PLoS Genet. 2016. V. 12(9): e1006297. doi.org/10.1371/journal.pgen.1006297
7. Toivonen J.M., Partridge L. Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila* // Mol. Cell. Endocrinol. 2009. V. 299. P. 39–50. doi 10.1016/j.mce.2008.07.005
8. Li Y., Hoffmann J., Li Y. et al. Octopamine controls starvation resistance, life span and metabolic traits in *Drosophila* // Sci. Rep. 2016. V. 6: e35359. doi 10.1038/srep35359
9. Rauschenbach I.Yu., Adonyeva N.V., Alekseev A.A. et al. Role of arylalkylamine N-acetyltransferase in regulation of biogenic amines levels by gonadotropins in *Drosophila* // J. Comp. Physiol. B. 2008. V. 178. P. 315–320. doi 10.1007/s00360-007-0224-x
10. Rohrscheib C.E., Bondy E., Josh P. et al. *Wolbachia* influences the production of octopamine and affects *Drosophila* male aggression // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 4573–4580. doi 10.1128/AEM.00573-15
11. Gruntenko N.E., Chentsova N.A., Andreenkova E.V. et al. The effect of mutations altering biogenic amine metabolism in *Drosophila* on viability and the response to heat stress // Arch. Insect. Biochem. Physiol. 2004. V. 55. P. 55–67. <https://doi.org/10.1002/arch.10123>
12. O'Neill S.L., Giordano R., Colbert A.M.E. et al. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 2699–2702. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2699>
13. Braig H.R., Zhou W., Dobson S.L. et al. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipitensis* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 2373–2378. doi 10.1360/02tb9320
14. Gruntenko N.E., Ilinsky Y.Y., Adonyeva N.V. et al. Various *Wolbachia* genotypes differently influence host *Drosophila* dopamine metabolism and survival under heat stress conditions // BMC Evol. Biol. 2017. V. 17(Suppl. 2). P. 252. doi 10.1186/s12862-017-1104-y
15. Груntenко Н.Е., Андреевкова Е.В., Монастириоти М., Раушенбах И.Ю. Биогенные амины негативно регулируют активность синтезирующих их ферментов у имаго *Drosophila* // Докл. РАН. 2001. Т. 379. С. 567–569.

**Genotype of the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*
Influences Octopamine Metabolism in *Drosophila melanogaster* Females**

N. V. Adonyeva^a, E. V. Burdina^a, R. A. Bykov^a, N. E. Gruntenko^a, and I. Yu. Rauschenbach^{a,*}

^a*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

^{*}*e-mail: iraushen@bionet.nsc.ru*

The influence of the genotype of the endosymbiont *Wolbachia pipientis* on the metabolism of octopamine, one of the main biogenic amines of insects, in young females of *Drosophila melanogaster* was studied. The activity of the key enzyme for the synthesis of octopamine, tyrosine decarboxylase, and the activity of the enzyme for its degradation, octopamine-dependent N-acetyltransferase, were measured. It was shown that under normal conditions, the activities of both enzymes were increased in the females infected with the *wMelPop* strain, and the activity of both enzymes were reduced with the *wMelCS* genotype, while females infected with the *wMel* genotype did not differ from that of uninfected flies. It was also found that in all females infected with *Wolbachia*, the intensity of the tyrosine decarboxylase response to heat stress was reduced. Thus, it was first demonstrated the *Wolbachia* effect on the level of octopamine in *Drosophila* females. It was also shown that the pattern of this effect depends on the genotype of the symbiont.

Keywords: tyrosine decarboxylase, octopamine-dependent N-acetyltransferase, *Wolbachia*, *Drosophila*, stress.