

УДК 575.22+591.3:599.323.4

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА И ПОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКОВ МОЧИ КОМПЛЕКСА MUP В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ МЫШИ¹

© 2009 г. С. Н. Новиков, Г. А. Чураков, А. А. Филимоненко, И. И. Ермакова, Е. М. Федорова, И. А. Буркот

Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН

199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

E-mail: nosenick@infran.ru

Поступила в редакцию 12.11.08 г.

Окончательный вариант получен 09.02.09 г.

На самцах и самках мышей инбредных линий СВА/LacY и C57BL/6JY с помощью электрофореза в полиакриламидном геле изучали особенности экспрессии белков мочи комплекса MUP (major urinary protein) на 3, 4 и 12-й нед онтогенеза. Впервые дана сравнительная количественная характеристика восьми белковых фракций А–Н в зависимости от пола, возраста и генотипа животных. Рассмотрены актуальные вопросы генетического контроля и нейроэндокринной регуляции экспрессии MUPs в ходе индивидуального развития. В свете современных представлений о ключевой роли MUPs в процессе внутрипопуляционного информационного обмена с помощью феромонов высказано предположение о формировании в раннем онтогенезе на основе комбинаторики MUPs генетически детерминированной структуры обонятельного кода дефинитивного типа.

Ключевые слова: пре- и постпубертатный периоды, мыши, белки комплекса MUP, половые различия, феромоны, обонятельный образ, комбинаторика MUPs, структура обонятельного кода.

Одна из наиболее таинственных сторон в жизнедеятельности различных представителей отряда грызунов связана с феноменом “физиологической протеинурии” (Parfentjev, 1932). Несмотря на детальную изученность молекулярно-генетических основ и физиологических механизмов самого явления (Hastie et al., 1979; Berger, Szoka, 1981; Knopf et al., 1983; Kuhn et al., 1984; McIntosh, Bishop, 1989; Al-Shavi et al., 1992), функциональное значение резко повышенной экскреции белка в составе мочи до последнего времени оставалось труднейшей загадкой в биологии этой многочисленной систематической группы.

В начале 1990-х гг. появились первые сообщения о возможной регуляторной роли белков мочи домовой мыши и, прежде всего белков комплекса MUP (major urinary protein), в процессах внутрипопуляционного информационного обмена с помощью феромонов (Böcskei et al., 1992; Vacchini et al., 1992; Churakov et al., 1992; Robertson et al., 1993). Эти работы явились основой для проведения многочисленных экспериментальных и популяционно-генетических исследований, посвященных детальному анализу структурно-функциональных особенностей белков комплекса MUP (Чураков, Новиков, 2000; Бабалян, Новиков, 2001; Даев, Свердлова, 2002; Новиков,

2003; Robertson et al., 1996, 1997; Utsumi et al., 1999; Marchlewska-Koj et al., 2000; Marie et al., 2001; Timm et al., 2001; Hurst et al., 2001, 2005; Sharrow et al., 2002, 2005; Armstrong et al., 2005; Cavaggioni et al., 2006; Macek et al., 2006; More, 2006; Stopkova et al., 2007).

Принято считать, что выделение с мочой белков комплекса MUP характерно для самцов и непосредственно связано с андрогенным статусом организма (Szoka, Paigen, 1978, 1979; Berger, Szoka, 1981; Hayakawa et al., 1983). Между тем ранее мы показали, что качественный состав MUPs кастрированных самцов мышей идентичен таковому самок, а паттерн MUPs детерминирован генетически (Чураков, Новиков, 2000). Эти данные позволяют поставить вопрос о роли генетических и возрастных факторов в становлении половых различий по составу белков комплекса MUP в постнатальном онтогенезе мыши.

Цель нашего исследования – проведение сравнительного количественного анализа экспрессии белков MUPs у самцов и самок мышей двух генотипов в пре- и постпубертатном периодах развития.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на самцах и самках двух высокоинбредных генеалогически неродственных линий мышей СВА/LacY и C57BL/6JY ($n = 102$). Животных содержали группами по 4–6 особей в

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 04-04-63050, 02-04-49273).

Таблица 1. Возрастная динамика содержания фракций MUPs (мг/мл) в моче самцов и самок мышей линии CBA/LacY

Фракция белка	Возраст самцов, нед			К	Возраст самок, нед			К
	3	4	12		3	4	12	
A	0.015 ± 0.0042	0.02 ± 0.007	0.45 ± 0.075	30.0	0.020 ± 0.0033	0.060 ± 0.0187	0.27 ± 0.070	13.5
B	0	0.03 ± 0.013	0.23 ± 0.019	7.7	–	–	–	–
C	0	0.07 ± 0.050	0.51 ± 0.082	7.3	–	–	–	–
D	0.014 ± 0.0031	0.16 ± 0.101	2.97 ± 0.141	212.1	0.008 ± 0.0014	0.028 ± 0.0062	0.24 ± 0.047	30.0
E	0.018 ± 0.0046	0.06 ± 0.037	1.06 ± 0.045	58.9	0.021 ± 0.0056	0.075 ± 0.0212	0.56 ± 0.103	26.7
F	–	–	–	–	–	–	–	–
G	0.010 ± 0.0029	0.02 ± 0.007	0.15 ± 0.012	15.0	0.010 ± 0.0021	0.031 ± 0.0101	0.07 ± 0.006	7.0
H	0.005 ± 0.0009	0.01 ± 0.003	0.13 ± 0.009	26.0	0.008 ± 0.0019	0.014 ± 0.0044	0.04 ± 0.005	5.0
Σ _{A-H}	0.064 ± 0.0116	0.37 ± 0.213	5.49 ± 0.127	85.8	0.068 ± 0.0103	0.210 ± 0.0561	1.19 ± 0.213	17.5

Здесь и в табл. 2: К – коэффициент возрастания величины фракции.

стандартных полипропиленовых клетках T-2 (“Velaz”, Чехия) в условиях инвертированного светового цикла (день – 12 ч, ночь – 12 ч). Эксперименты проводили в весенний период.

Сбор мочи у мышей с помощью легкого массажа брюшной части тела проводили на 3, 4 и 12-й нед жизни в пластиковые пробирки Эппендорф объемом 2 мл строго индивидуально в одно и то же время суток и хранили при температуре –18°C.

Белки комплекса MUP анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Разделение нативных белков проводили в 0.1 М *трис*-ацетатном буфере, pH 5.5. Пробы готовили, смешивая аликвоты мочи (2–10 мкл) с 0.1 М буфером *трис*-HCl, pH 7.4, содержащим 20% глицерина и 0.01% бромфенолового синего. Белковые фракции окрашивали Кумасси G-250 (“Serva”, Германия). Оценку молекулярного веса MUPs вели с помощью набора калибровочных белков (“Sigma”, США).

Содержание общего белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976). Количественный анализ фракционированных белков комплекса MUP проводили на базе отдела биохимии Всероссийского института растениеводства РАСХН (ВИР) с помощью денситометра GelScan XL (“Pharmacia”, Швеция).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакета программ GraphPad Prism 4 (“GraphPad Software”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Возрастная динамика экспрессии MUPs у самцов и самок мышей линии CBA/LacY. Как следует из табл. 1, уже на 3-й нед онтогенеза комплекс MUP у самцов этого генотипа характеризуется выраженной гетерогенностью; в возрасте 4 нед в

пробах мочи появляются фракции B и C. Суммарная парциальная величина этих фракций на фоне прогрессивного возрастания их абсолютных значений к 12-й нед жизни (табл. 1) в течение рассматриваемого периода падает с 25.7 до 13.4% (рисунок, а).

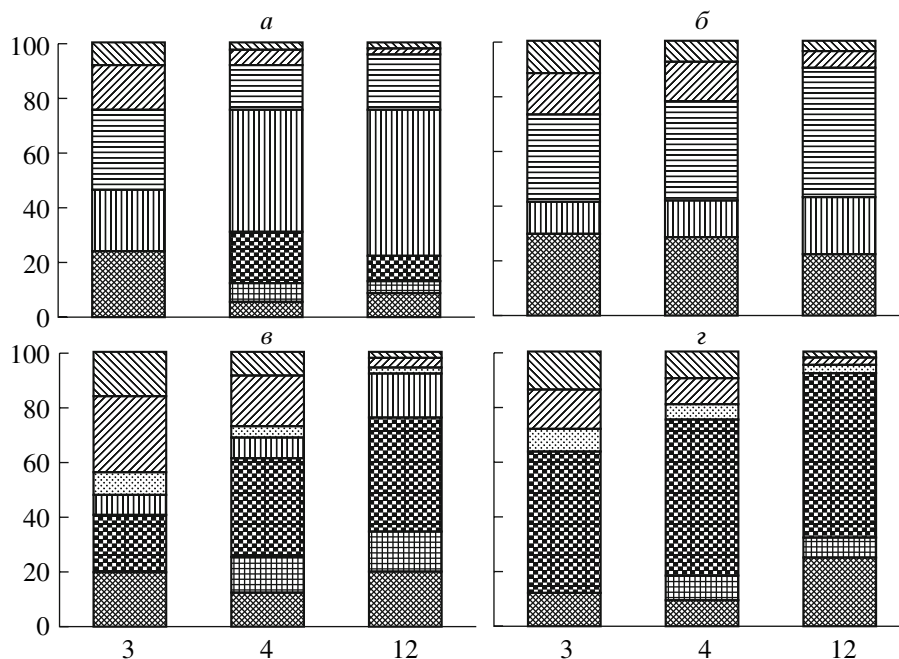
Общее содержание белков комплекса MUP у самцов возрастает к 12-й нед в 85.8 раза; минимальный коэффициент возрастания характерен для фракции C ($K_C = 7.3$), максимальный – для фракции D ($K_D = 212.1$). Доля этой мажорной фракции в общем пуле MUPs возрастает с 22.6% у неполовозрелых 3-недельных животных до 54.1% у 12-недельных самцов ($p < 0.01$) (рисунок, а).

У самок этой линии в отличие от самцов в комплексе MUP полностью отсутствуют фракции B и C (табл. 1); парциальные величины остальных пяти фракций на фоне прогрессивного роста их абсолютных значений остаются относительно неизменными (рисунок, б). Общее содержание белков комплекса MUP у самок возрастает к 12-й нед в 17.5 раз; минимальный коэффициент возрастания характерен для фракции H ($K_H = 5.0$), максимальный – для фракций D и E ($K_D = 30.0$, $K_E = 26.7$). Доля мажорной фракции E в общем пуле MUPs возрастает с 31.9% у неполовозрелых 3-недельных особей до 47.8% у 12-недельных самок ($p < 0.01$).

В целом темп увеличения содержания MUPs в моче самцов линии CBA/LacY превышает данный показатель у самок в 4.9 раза (табл. 1).

Возрастная динамика экспрессии MUPs у самцов и самок мышей линии C57BL/6JY. Как следует из данных табл. 2, гетерогенный состав комплекса MUP характерен уже для 3-недельных животных; в возрасте 4 нед в моче самцов данного генотипа появляется фракция B.

Общее количество MUPs в рассматриваемый отрезок онтогенеза возрастает у самцов в 123.6 раза; минимальный коэффициент возрастания харак-



Доли фракций MUP (по оси ординат, %) в онтогенезе самцов (*а, в*) и самок (*б, г*) мышей линий СВА/ЛасУ (*а, б*) и С57BL/6JY (*в, г*) разного возраста (по оси абсцисс, нед). А – (■), В – (▨), С – (▩), D – (▧), E – (▦), F – (▥), G – (▤), H – (▣).

терен для фракции G ($K_G = 13.8$); максимальный – для D ($K_D = 265.0$). Парциальная величина данной фракции существенно различается в пре- и пост-пубертатном периодах и составляет у 3, 4, и 12-недельных особей 7.9, 7.1 и 15.6% соответственно. Доля доминирующей у взрослых животных фракции C (41.7%) составляет у неполовозрелых 3-недельных самцов 21.1% (рисунок, *в*).

У самок этой линии в отличие от самцов в комплексе MUP полностью отсутствует фракция D; в возрасте 4 нед в составе MUPs появляется фракция В (табл. 2). Общее содержание белков комплекса MUP возрастает к 12-й нед в 38.6 раза; минимальный коэффициент возрастания характе-

рен для фракции H ($K_H = 5.0$), максимальный – для фракции А ($K_A = 84.0$), доля мажорной фракции С практически не изменяется (рисунок, *г*).

В целом темп увеличения содержания MUPs в моче самцов линии С57BL/6JY превышает данный показатель у самок в 3.2 раза (табл. 2).

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа свидетельствуют о том, что возраст оказывает высоко достоверное влияние только на абсолютное содержание фракций MUPs и практически не влияет на их относительную (парциальную) величину (табл. 3, 4).

Таблица 2. Возрастная динамика содержания фракций MUPs (мг/мл) в моче самцов и самок мышей линии С57BL/6JY

Фракция белка	Возраст самцов, нед			К	Возраст самок, нед			К
	3	4	12		3	4	12	
A	0.005 ± 0.0009	0.007 ± 0.0013	0.68 ± 0.157	136.0	0.005 ± 0.0014	0.007 ± 0.0016	0.42 ± 0.125	84.0
B	0	0.006 ± 0.0017	0.51 ± 0.111	85.0	0	0.007 ± 0.0037	0.13 ± 0.040	18.6
C	0.006 ± 0.0014	0.018 ± 0.0078	1.43 ± 0.182	238.3	0.022 ± 0.0134	0.041 ± 0.0295	0.99 ± 0.197	45.0
D	0.002 ± 0.0003	0.004 ± 0.0008	0.53 ± 0.152	265.0	–	–	–	–
E	–	–	–	–	–	–	–	–
F	0.002 ± 0.0002	0.002 ± 0.0004	0.09 ± 0.031	45.0	0.003 ± 0.0014	0.004 ± 0.0016	0.06 ± 0.019	20.0
G	0.008 ± 0.0013	0.009 ± 0.0030	0.11 ± 0.022	13.8	0.006 ± 0.0030	0.007 ± 0.0034	0.04 ± 0.010	6.7
H	0.004 ± 0.0005	0.004 ± 0.0010	0.07 ± 0.010	17.5	0.006 ± 0.0025	0.007 ± 0.0035	0.03 ± 0.006	5.0
Σ_{A-H}	0.028 ± 0.0030	0.050 ± 0.0140	3.46 ± 0.628	123.6	0.043 ± 0.0205	0.072 ± 0.0406	1.66 ± 0.370	38.6

Таблица 3. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа динамики абсолютных величин фракций MUPs в онтогенезе самцов и самок мышей линий CBA/LacY и C57BL/6JY

Источник изменчивости	Число степеней свободы, df	Средний квадрат, M	Критерий Фишера, F	Уровень значимости, p
Самцы CBA				
Возраст	2	11.84	830.1	<0.0001
Фракция	6	3.396	238.2	<0.0001
Взаимодействие	12	2.910	204.1	<0.0001
Случайные отклонения	175	0.01426		
Самки CBA				
Возраст	2	0.9527	50.51	<0.0001
Фракция	4	0.2428	12.87	<0.0001
Взаимодействие	8	0.1655	8.775	<0.0001
Случайные отклонения	180	0.01886		
Самцы C57BL/6				
Возраст	2	3.608	107.6	<0.0001
Фракция	6	0.5266	15.7	<0.0001
Взаимодействие	12	0.5115	15.25	<0.0001
Случайные отклонения	119	0.03355		
Самки C57BL/6				
Возраст	2	0.6924	29.14	<0.0001
Фракция	5	0.2577	10.84	<0.0001
Взаимодействие	10	0.2209	9.296	<0.0001
Случайные отклонения	72	0.02376		

ОБСУЖДЕНИЕ

Постнатальный онтогенез домовей мыши *Mus musculus* L. принято разделять на ряд периодов. Особое значение имеет этап так называемой “социализации”, связанный с выходом молодых мышей из гнезда и переходом на активное питание: этот период длительностью 5–7 сут оканчивается к 4–5-й нед онтогенеза. Непосредственно за ним следует период формирования у самцов иерархических отношений, сопровождающийся резким повышением уровня агрессивности (McKinney, Desjardins, 1973; Barkley, Goldman, 1977), физиологической основой которого является изменение нейроэндокринного статуса особи, в первую очередь – многократное увеличение семенниками продукции тестостерона (Selmanoff et al., 1977a,b; Jean-Faucher, 1978). Этот относительно продолжительный период, заканчивающийся к 7–8-й нед, сопровождается также созреванием ряда ферментативных систем, участвующих в метаболизме тестосте-

рона, и клеточных рецепторов к дигидротестостерону (Minetti et al., 1986; Muroso, Washburn, 1989).

Результаты нашей работы хорошо соответствуют литературным данным о возрастной динамике мРНК MUPs в клетках печени мышей (Derman, 1981; Barth et al., 1982). Вместе с тем выделение пре- и постпубертатного периодов в процессе исследования позволило выявить значительные межлинейные различия в особенностях изменения концентрации одноименных белковых фракций у самцов и самок.

Прогрессивное увеличение содержания фракций MUPs характерно при развитии мышей обеих линий (табл. 1, 2). Обращает на себя внимание то, что стартовые величины концентрации большинства фракций у неполовозрелых 3-недельных животных линии CBA/LacY существенно выше, чем у их сверстников из линии C57BL/6JY. Ранее мы показали, что у самцов в возрасте 8 нед эти различия исчезают, а коэффициент ранговой корреляции между абсолютными значениями одноимен-

Таблица 4. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа динамики относительных величин MUPs в онтогенезе самцов и самок мышей линий CBA/LacY и C57BL/6JY

Источник изменчивости	Число степеней свободы, df	Средний квадрат, M	Критерий Фишера, F	Уровень значимости, p
Самцы CBA				
Возраст	2	0.0	0.0	Нд
Фракция	6	0.4467	6.290	<0.0001
Взаимодействие	12	0.08342	1.175	Нд
Случайные отклонения	175	0.01426		
Самки CBA				
Возраст	2	0.0	0.0	Нд
Фракция	4	0.6343	12.25	<0.0001
Взаимодействие	8	0.04813	0.9292	Нд
Случайные отклонения	180	0.05180		
Самцы C57BL/6				
Возраст	2	0.0	0.0	Нд
Фракция	6	0.1770	2.482	<0.05
Взаимодействие	12	0.04651	0.6521	Нд
Случайные отклонения	119	0.07133		
Самки C57BL/6				
Возраст	2	0.0	0.0	Нд
Фракция	5	0.5643	5.903	<0.0001
Взаимодействие	10	0.01820	0.1904	Нд
Случайные отклонения	72	0.09560		

Примечание: Нд – влияние фактора незначительно.

ных фракций у ювенильных 4-недельных и взрослых 8-недельных животных линии CBA/LacY характеризуется высоко достоверной положительной зависимостью ($r_s = +0.96$, $p < 0.01$) (Чураков, Новиков, 2000). Эти данные свидетельствуют о том, что у половозрелых мышей данного генотипа паттерн парциальных величин MUPs соответствует таковому у половозрелых животных. Таким образом, при условии структурно-молекулярной идентичности белков комплекса MUP у ювенильных и взрослых особей линии CBA/LacY и на основании данных по андрогенному контролю синтеза MUPs можно утверждать, что генетический контроль биосинтеза этих белков по “взрослому типу” в раннем онтогенезе и формирование соответствующего “взрослого” паттерна MUPs как признака у самцов этой линии хронологически предшествует резкому подъему уровня тестостерона в крови на

30-е сут постнатального онтогенеза (Selmanoff et al., 1977b; Jean-Faucher et al., 1978).

Представленные результаты подтверждают ранее сделанный вывод об андрогенозависимом характере экспрессии фракций В и С у животных линии CBA/LacY и фракции D – у линии C57BL/6JY (Чураков, Новиков, 2000). Обращает на себя внимание отсутствие у 3-недельных животных фракции В в обеих линиях и фракции С – в линии CBA/LacY. С другой стороны, фракция D экспрессируется у животных этого генотипа уже на 3-й нед на фоне отсутствия в составе MUPs андрогенозависимой фракции В. Это может свидетельствовать либо о повышенной индуцибельности биосинтеза белков, составляющих электрофоретическую фракцию D, либо о существовании межлинейных различий в характере экспрессии фракции В.

В пользу первого предположения говорит резкое увеличение у 12-недельных животных содержания именно фракции D (табл. 1), в пользу второго – выраженные межлинейные различия в динамике изменения содержания фракции В в процессе развития (табл. 1, 2).

Следует подчеркнуть, что характерной особенностью самцов мышей семейства линий C57 в отличие от других линий является относительно низкий уровень плазменного тестостерона (Дюжикова, 1994; Sustarsic, Wolfe, 1976; Selmanoff et al., 1977b; Stalvey, Payne, 1983) и повышенная тканевая чувствительность к его физиологически активному метаболиту – дигидротестостерону (Bartke, 1974). По-видимому, именно этим объясняется резкое повышение интенсивности биосинтеза белков комплекса MUP с 4-й по 8-ю нед онтогенеза в линии C57BL/6JY; в первую очередь это относится к андрогенозависимой фракции D (табл. 2). Известно также, что самцы линии C57BL/Kw, в отличие от самцов линии CBA/Kw, характеризуются снижением функциональной активности щитовидной железы (Marchlewska-Koj et al., 1974). Учитывая данные по тироксиназависимой экспрессии генов комплекса *Mur* (Knopf et al., 1983; Kuhn et al., 1984), можно полагать, что полученные нами результаты отражают межлинейные различия по уровню этого гормона в постнатальном онтогенезе мыши (Minetti et al., 1986). Существенную роль в формировании половых различий при изменении одноименных фракций MUPs в процессе развития животных могут также играть гормон роста и пролактин (Michael et al., 1980; Norstedt, Palmiter, 1984; Johnson et al., 1995).

Особый интерес в плане дальнейших исследований структурных и функциональных особенностей MUPs может представлять изучение гормонального контроля экспрессии ряда отдельных белковых фракций, в первую очередь фракции E в линии CBA/LacY и H – в линии C57BL/6JY, в процессе развития самок. С одной стороны, фракция E, являясь мажорным биохимическим маркером линии CBA/LacY, экспрессируется как у самцов, так и у самок (табл. 1), с другой – связана отрицательной корреляцией с уровнем плазменного тестостерона ($r_s = -0.98, p < 0.05$); парциальная величина этой фракции у половозрелых самцов резко возрастает после кастрации, а у половозрелых самок составляет более 50% от общего пула MUPs (Чураков, Новиков, 2000). На основании представленных нами данных можно предполагать, что гены *Mur*, кодирующие белки фракции E, находятся под частичным репрессорным влиянием тестостерона, физиологическая роль которого на разных этапах онтогенеза мыши зависит от генотипа (Ахмерова и др., 2002; Ахмерова, 2006).

Что касается минорной фракции H у животных линии C57BL/6JY, то, как мы показали ранее (Чураков, Новиков, 2000), на фоне отрицательной корреляции с уровнем плазменного тестостерона у половозрелых самцов ($r_s = -0.78, p < 0.05$) ее парциальная величина в ходе развития прогрессивно уменьшается (рисунок, в, з).

В целом проведенный анализ свидетельствует о сложных и гетерохронных механизмах экспрессии белков комплекса MUP в постнатальном онтогенезе самцов и самок мышей двух генеалогически неродственных линий – CBA/LacY и C57BL/6JY, различающихся по физиологической активности андрогенозависимых феромонов (Новиков, 1988).

В нашей работе впервые показан координированный и независимый от возраста паттерн экспрессии генов кластера *Mur*, кодирующих парциальные величины отдельных изоформ MUPs. Эти данные хорошо соответствуют современным представлениям о существовании генетических регуляторных механизмов координации и дифференциальной экспрессии генов *Mur* (Chamero et al., 2007; Logan et al., 2008; Mudge et al., 2008).

Дальнейшие перспективы исследования белков комплекса MUP мы связываем с расшифровкой структурно-функциональной основы обонятельного кода и изучением закономерностей его формирования в онтогенезе домового мыши (Novikov et al., 2008). В основу нашей модели положены представления о конкурентном характере связывания отдельных фракций MUPs с низкомолекулярными лигандами феромональной природы (Новиков, 2003). Проводя аналогию с буквенным кодом (алфавитом), можно предположить, что феромональные лиганды представляют собой химические символы (буквы), а определенная комбинация изоформ MUPs формирует из этих букв семантически значимое сообщение (обонятельный образ) об индивидуальных характеристиках донора (генотип, пол, возраст, иерархический статус и т.д.) (Novikov, 2007; Novikov et al., 2008).

Большой интерес при изучении закономерностей формирования обонятельного кода у домового мыши могут представлять данные по экспрессии генов *Mur* у прямых и реципрокных гибридов F₁: на фоне практически идеального фенотипического сходства в пределах одного пола у животных CBAxB6F₁ и B6CBAF₁, фенотипические маркеры E и F экспрессируются как у самцов, так и у самок обоих генотипов независимо от направления скрещивания (Чураков, Новиков, 2000). Это может свидетельствовать о том, что гены, контролирующие экспрессию *Mur* у гибридов F₁, не локализованы на Y-хромосоме, а признак в своем выражении не подвержен влиянию материнского организма и

обнаруживает аддитивный характер наследования в гетерозиготе F₁.

Принципиальный вопрос о модифицирующей роли окружающей среды, в частности феромонального импринтинга, в формировании при развитии половой избирательности у самцов и самок домового мыши *Mus musculus* L. на основе MUPs остается в настоящее время неизученным.

Авторы выражают глубокую благодарность С.В. Мыльникову за помощь при статистической обработке экспериментальных данных и конструктивное обсуждение материалов работы при подготовке рукописи к печати.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ахмерова Л.Г. Развитие клеток Лейдига // Успехи физиол. наук. 2006. Т. 37. № 1. С. 28–36.
- Ахмерова Л.Г., Свечников К.В., Осадчук А.В. Влияние генотипа на формирование гормональной функции клеток Лейдига в постнатальном развитии мышей // Онтогенез. 2002. Т. 33. № 4. С. 268–275.
- Бабалян В.В., Новиков С.Н. Феромон, подавляющий сперматогенез у лабораторных мышей, связан с белковой фракцией мочи // Докл. АН. 2001. Т. 378. № 3. С. 407–409.
- Давев Е.В., Свердлова О.Л. Изучение феромональной индукции цитогенетических нарушений в зависимости от состава главных белков мочи у самцов лабораторных мышей // Генетика. 2002. Т. 38. № 2. С. 190–195.
- Дюжикова Н.А. Роль тестостерона в регуляции агрессивного поведения самцов лабораторных мышей различных линий // ЖВНД. 1994. Т. 44. № 3. С. 507–515.
- Новиков С.Н. Феромоны и размножение млекопитающих: физиологические аспекты. Л.: Наука, 1988. 168 с.
- Новиков С.Н. Координированная экспрессия генов *Gus* и *Мир* как потенциальная основа функциональной активности андрогензависимых феромонов домового мыши *Mus musculus* L. // Докл. РАН. 2003. Т. 391. № 5. С. 707–711.
- Чураков Г.А., Новиков С.Н. Гетерогенность и дифференциальная экспрессия белков комплекса MUP как генетическая основа физиологической активности андрогензависимых феромонов // Там же. 2000. Т. 375. № 1. С. 130–133.
- Al-Shawi R., Wallace H., Harrison S. et al. Sexual dimorphism and growth hormone regulation of a hybrid gene in transgenic mice // Mol. Endocrinol. 1992. V. 6. P. № 2. 181–190.
- Armstrong S.D., Robertson D.H., Cheetham S.A. et al. Structural and functional differences in isoforms of mouse major urinary proteins: a male-specific protein that preferentially binds a male pheromone // Biochem. J. 2005. V. 391. Pt. 2. P. 343–350.
- Bacchini A., Gaetani E., Cavaggioni A. Pheromone binding proteins of the mouse, *Mus musculus* // Experientia. 1992. V. 48. № 4. P. 419–421.
- Barkley M.S., Goldman B.D. A quantitative study of serum testosterone, sex accessory organ growth, and the development of intermale aggression in the mouse // Horm. Behav. 1977. V. 8. № 2. P. 208–218.
- Barth R.K., Gross K.W., Gremke L.C., Hastie N.D. Developmentally regulated mRNAs in mouse liver // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 2. P. 500–504.
- Bartke A. Increased sensitivity of seminal vesicles to testosterone in a mouse strain with low plasma testosterone levels // J. Endocrinol. 1974. V. 60. № 1. P. 145–148.
- Berger F.G., Szoka P. Biosynthesis of the major urinary proteins in mouse liver: a biochemical genetic study // Biochem. Genet. 1981. V. 19. № 11. P. 1261–1273.
- Böcskei Z., Groom C.R., Flower D.R. et al. Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography // Nature. 1992. V. 360. № 6400. P. 186–188.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
- Cavaggioni A., Mucignat-Caretta C., Redaelli M., Zagotto G. The scent of urine spots of male mice, *Mus musculus*: changes of chemical composition over time // Rapid Comm. Mass Spectrom. 2006. V. 20. № 24. P. 3741–3746.
- Chamero P., Marton T.F., Logan D.W. et al. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour // Nature. 2007. V. 450. № 7171. P. 899–902.
- Churakov G.A., Philimonenko A.A., Novikov S.N. Genetic control and expression of the major urinary proteins (MUPs) in the laboratory mice: MUPs as a potential pheromone messengers? // Proc. 14th Meeting of the Association for Chemoreception Sciences (AChemS). Sarasota, USA, 1992. P. 18.
- Derman E. Isolation of a cDNA clone for mouse urinary proteins: age- and sex-related expression of mouse urinary protein genes is transcriptionally controlled // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 9. P. 5425–5429.
- Hastie N.D., Held W.A., Toole J.J. Multiple genes coding for the androgen-regulated major urinary proteins of the mouse // Cell. 1979. V. 17. № 2. P. 449–457.
- Hayakawa J., Nikaido H., Koizumi T. Components of major urinary proteins (MUP's) in the mouse: sex, strain, and subspecies differences // J. Hered. 1983. V. 74. № 6. P. 453–456.
- Hurst J.L., Payne C.E., Nevison C.M. et al. Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins // Nature. 2001. V. 414. № 6864. P. 631–634.
- Hurst J.L., Thom M.D., Nevison C.M. et al. MHC odours are not required or sufficient for recognition of individual scent owners // Proc. Biol. Sci. 2005. V. 272. № 1564. P. 715–724.
- Jean-Faucher Ch., Berger M., De Turckheim M. et al. Developmental patterns of plasma and testicular testosterone in mice from birth to adulthood // Acta Endocrinol. 1978. V. 89. № 4. P. 780–788.
- Johnson D., Al-Shawi R., Bishop J.O. Sexual dimorphism and growth hormone induction of murine pheromone-binding proteins // J. Mol. Endocrinol. 1995. V. 14. № 1. P. 21–34.
- Knopf J.L., Gallagher J.F., Held W.A. Differential, multihormonal regulation of the mouse major urinary protein gene

- family in the liver // *Mol. Cell. Biol.* 1983. V. 3. № 12. P. 2232–2240.
- Kuhn N.J., Woodworth-Gutai M., Gross K.W., Held W.A. Subfamilies of the mouse major urinary protein (MUP) multi-gene family: sequence analysis of cDNA clones and differential regulation in the liver // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 15. P. 6073–6090.
- Logan D.W., Marton T.F., Stowers L. Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution // *PLoS ONE*. 2008. V. 3. № 9. P. e3280.
- Macek P., Novak P., Krizova H. et al. Molecular dynamics study of major urinary protein-pheromone interactions: a structural model for ligand-induced flexibility increase // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. № 2. P. 682–684.
- Marchlewska-Koj A., Styrna J., Dubin A. Differences in the thyroid function of four inbred strains of mice // *Folia Biol.* 1974. V. 22. № 4. P. 149–156.
- Marchlewska-Koj A., Cavagioni A., Mucignat-Caretta C., Olejniczak P. Stimulation of estrus in female mice by male urinary proteins // *J. Chem. Ecol.* 2000. V. 26. № 5. P. 2355–2366.
- Marie A.D., Veggerby C., Robertson D.H.L. et al. Effects of polymorphisms on ligand binding by mouse major urinary proteins // *Protein Sci.* 2001. V. 10. № 2. P. 411–417.
- McIntosh I., Bishop J.O. Differential expression in male and female mouse liver of very similar mRNAs specified by two group 1 major urinary protein genes // *Mol. Cell. Biol.* 1989. V. 9. № 5. P. 2202–2207.
- McKinney T.D., Desjardins C. Postnatal development of the testis, fighting behavior, and fertility in house mice // *Biol. Reprod.* 1973. V. 9. № 3. P. 279–294.
- Michael S.D., Kaplan S.B., Macmillan B.T. Peripheral plasma concentrations of LH, FHS, prolactin and GH from birth to puberty in male and female mice // *J. Reprod. Fert.* 1980. V. 59. № 1. P. 217–222.
- Minetti C.A.S.A., Valle L.B.S., Favo-De-Moraes F. et al. Ontogenesis of androgen receptors in the mouse submandibular gland: correlation with (the) developmental profiles of circulating thyroid and testicular hormones // *Acta Endocrinol.* 1986. V. 112. № 2. P. 290–295.
- More L. Mouse major urinary proteins trigger ovulation via the vomeronasal organ // *Chem. Senses.* 2006. V. 31. № 5. P. 393–401.
- Mudge J.M., Armstrong S.D., McLaren K. et al. Dynamic instability of the major urinary protein gene family revealed by genomic and phenotypic comparisons between C57 and 129 strain mice // *Genome Biol.* 2008. V. 9. № 5. P. R91.
- Murono E.P., Washburn A.L. 5 α -Reductase activity regulates testosterone accumulation in two bands of immature cultured Leydig cells isolated on Percoll density gradients // *Acta Endocrinol.* 1989. V. 121. № 4. P. 538–544.
- Norstedt G., Palmiter R.D. Secretory rhythm of growth hormone regulates sexual differentiation of mouse liver // *Cell.* 1984. V. 36. № 4. P. 805–812.
- Novikov S.N. Major urinary proteins as a key component in rodent olfactory coding: from Mup genes to social behavior via pheromones // *Keystone Symp. "Chemical Senses: from Genes to Perception"*. Snowbird, USA, 2007. P. 47.
- Novikov S.N., Ermakova I.I., Fedorova E.M. Combinatorial co-expression of major urinary protein (MUP) genes during ontogenesis is essential for olfactory coding and social recognition in mice // *Proc. XV Symp. on Olfaction & Taste (ISOT)*. San Francisco, USA. 2008. P. 104–105.
- Parfentjev I.A. Calcium and nitrogen content in urine of normal and cancer mice // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1932. V. 29. № 9. P. 1285–1286.
- Robertson D.H.L., Beynon R.J., Evershed R.P. Extraction, characterization, and binding analysis of two pheromonally active ligands associated with major urinary protein of house mouse, *Mus musculus* // *J. Chem. Ecol.* 1993. V. 19. № 7. P. 1405–1416.
- Robertson D.H.L., Cox K.A., Gaskell S.J. et al. Molecular heterogeneity in the major urinary proteins of the house mouse *Mus musculus* // *Biochem. J.* 1996. V. 316. Pt. 1. P. 265–272.
- Robertson D.H.L., Hurst J.L., Bolgar M.S. et al. Molecular heterogeneity of urinary proteins in wild house mouse populations // *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 1997. V. 11. № 7. P. 786–790.
- Selmanoff M.K., Goldman B.D., Ginsburg B.E. Serum testosterone, agonistic behavior, and dominance in inbred strains of mice // *Horm. Behav.* 1977a. V. 8. № 1. P. 107–119.
- Selmanoff M.K., Goldman B.D., Ginsburg B.E. Developmental changes in serum luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and androgen levels in males of two inbred mouse strains // *Endocrinology.* 1977b. V. 100. № 1. P. 122–127.
- Sharrow S.D., Vaughn J.L., Židek L. et al. Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins // *Protein Sci.* 2002. V. 11. № 9. P. 2247–2256.
- Sharrow S.D., Edmonds K.A., Goodman M.A. et al. Thermodynamic consequences of disrupting a water-mediated hydrogen bond network in a protein:pheromone complex // *Ibid.* 2005. V. 14. № 1. P. 249–256.
- Stalvey J.R.D., Payne A.H. Luteinizing hormone receptors and testosterone production in whole testes and purified Leydig cells from the mouse: differences among inbred strains // *Endocrinology.* 1983. V. 112. № 5. P. 1696–1701.
- Stopkova R., Stopka P., Janotova K., Jedelsky P.L. Species-specific expression of major urinary proteins in the house mice (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*) // *J. Chem. Ecol.* 2007. V. 33. № 4. P. 861–869.
- Sustarsic D.L., Wolfe H.G. Differences in male reproductive physiology between C3H/HeWe and C57BL/6We inbred strains of mice // *Genetics.* 1976. V. 83. № 3. P. S74–S75.
- Szoka P.R., Paigen K. Regulation of mouse major urinary protein production by the *Mup-a* gene // *Ibid.* 1978. V. 90. № 3. P. 597–612.
- Szoka P.R., Paigen K. Genetic regulation of MUP production in recombinant inbred mice // *Ibid.* 1979. V. 93. № 1. P. 173–181.
- Timm D.E., Baker L.J., Mueller H. et al. Structural basis of pheromone binding to mouse major urinary protein (MUP-I) // *Protein Sci.* 2001. V. 10. № 5. P. 997–1004.
- Utsumi M., Ohno K., Kawasaki Y. et al. Expression of major urinary protein genes in the nasal glands associated with general olfaction // *J. Neurobiol.* 1999. V. 39. № 2. P. 227–236.

The Pattern of Major Urinary Proteins (MUPS) Expression during Postnatal Ontogenesis of the Laboratory Mouse Depends on Genotype and Sex

S. N. Novikov, G. A. Churakov, A. A. Philimonenko, I. I. Ermakova,
E. M. Fedorova, and I. A. Burkot

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, nab. Makarova 6, 199034 Russia

Abstract—We investigated the specific pattern of major urinary proteins (MUPs) expression in 3-, 4-, and 12-week old mice of CBA/LacY and C57BL/6JY inbred strains using polyacrylamide gel electrophoresis. Quantitative evaluation of 8 protein fractions A-H with regard to sex, age, and genotype of the animals is presented for the first time. Actual problems of genetic control and neuroendocrine regulation of MUPs expression during ontogenesis are discussed. In the light of current views on MUPs as a key component in intrapopulation information exchange via pheromones, we put forward the idea that the genetically determined structure of the olfactory code of the definitive type is formed at an early ontogenetic stage on the basis of the MUPs combinatorial pattern.

Key words: pre- and postpubertal periods, laboratory mice, major urinary proteins, sex differences, pheromones, olfactory image, MUPs combinatorial pattern, structure of the olfactory code.