

**ІНАКТИВАЦІЯ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗИ У НЕЙРОНАХ НЕ ВПЛИВАЄ
НА РОЗВИТОК НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИХ ЗМІН У МОЗКУ
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

Н. Матійців, М. Вітушинська, Я. Черник

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: matiytsiv@yahoo.com*

Здійснено функціональний нокаут генів *Sod1* і *Sod2* у нейронах імаго *Drosophila melanogaster* за допомогою *UAS-GAL4* системи тканиноспецифічної експресії. У особин із функціональною інактивацією генів *Sods* у нейронах спостерігали підвищену чутливість до умов оксидативного стресу. Разом з тим, у цих особин не виявлено змін у структурі мозку. Результати дають підстави стверджувати, що дисфункція супероксиддисмутази у нейронах не є визначальною причиною формування нейродегенерації в мозку мутантів за генами *Sod*.

Ключові слова: гени *Sods*, *Drosophila melanogaster*, нейродегенерація, оксидативний стрес, *elav-Gal4*.

Є переконливі докази участі оксидативного стресу в розвитку як гострих, спорадичних, так і спадкових форм нейродегенеративних розладів, таких як інсульт, хвороба Паркінсона, аміотрофічний латеральний склероз [11, 16]. Збільшення рівня активних форм кисню (АФК), яке перевершує можливості антиоксидантної системи захисту, призводить до окисного ушкодження та загибелі клітин. Особливо строго регульованим вміст АФК є у клітинах із високим рівнем енергетичних затрат, зокрема, в клітинах мозку. Тому зниження активності ферментів антиоксидантного захисту, зокрема супероксиддисмутази (СОД), відіграє важливу роль у формуванні нейродегенерацій. Відомо, що при дегенеративних захворюваннях людини, здебільшого, відбувається специфічне відмирання клітин у певному відділі мозку, що зумовлює характерні симптоматичні прояви кожної патології. Так, при хворобі Паркінсона відмирають дофамінові нейрони чорної субстанції, при аміотрофічному латеральному склерозі дегенерують мотонейрони кори та спинного мозку [4, 8]. Мозок дрозофіли не характеризується аналогічними до людського анатомічними відділами з диференційними функціями. Однак функціонування окремих типів клітин мозку, нейромедіаторів та механізмів антиоксидантного захисту є подібними у хребетних і безхребетних. Тому дослідження ролі СОД у формуванні нейродегенеративних змін може бути здійснене на модельному об'єкті *D. melanogaster*.

У дрозофіли є дві форми ферменту, що кодується різними генами, – *Sod1* та *Sod2*. Ген *Sod1* кодує Cu/Zn залежну СОД, що функціонує у ядрі та цитоплазматичному матриксі. Ген *Sod2* відповідає за Mn залежну СОД, що функціонує у мітохондріях. Ці гени дрозофіли є гомологами відповідних генів людини [13]. Відомо, що мутанти за генами *Sod1* і *Sod2* мають підвищену чутливість до оксидативного стресу, вкорочену тривалість життя і дегенерацію тканини мозку [1, 6]. Особливістю нейродегенеративного фенотипу в мутантів за генами *Sod* є вакуолізація по всій тканині – у центральному мозку та очних долях. Такий характер змін свідчить про значний патологічний процес, який може охоплювати нейрони різних типів, гліальні клітини й аксони, викликаючи в них як структурні, так і функці-

ональні порушення. Залишається відкритим питання, наскільки важливим є функціонування СОД у різних клітинах мозку. З'ясування молекулярних механізмів СОД-залежної нейродегенерації є ключовою умовою для розробки сучасних терапевтичних методів на основі молекулярного механізму РНК інтерференції [7]. Цей найновіший підхід передбачає клітинспецифічний вплив, а отже, потребує визначення клітин-мішеней.

Метою роботи було дослідити вплив функціональної інактивації генів *Sods* у нейронах мозку *D. melanogaster* із застосуванням *UAS-GAL4* бінарної системи тканинспецифічної експресії на виживання і розвиток нейродегенеративних змін.

Матеріали та методи

У роботі використано наступні лінії *D. melanogaster*: лінію дикого типу *Oregon R*; делеційного мутанта за геном *Sod* – лінія *Sod^{K-39}*, зі зниженим синтезом Cu/Zn СОД; *UAS-Sod1-RNAi* – для RNA інтерференції гена *Sod1*; *UAS-Sod2-RNAi* – для RNA інтерференції гена *Sod2*; *elav-Gal4* – для специфічної експресії Gal4 у нейронах; *UAS-CD8:GFP* – для експресії GFP (зеленого флуоресцентного) білка. Дослідні лінії одержано з Bloomington Stock Center (Університет штату Індіана, США). Для функціонального нокауту застосували *UAS-Gal4* систему тканинспецифічної експресії [2, 5]. Культури дрозофіли утримували на стандартному середовищі при температурі 24–25°C [3].

Для виявлення патерну експресії драйверної лінії *elav-Gal4* мозок дрозофіли препарували методом «whole-mount» і проводили імуногістохімічну детекцію експресії GFP білка за стандартною методикою [10], первинні anti-GFP використовували у концентрації 1:200. Препарати аналізували на скануючому лазерному конфокальному мікроскопі Nikon LSM A1 Clem Confocal Microscope.

Парафінові гістологічні зрізи мозку товщиною 7 мкм виготовляли за методикою Хайзенберга [9]. Аналіз препаратів здійснювали в ультрафіолетовому світлі на мікроскопі Laboval-3 Carl Zeiss Jena при збільшенні 15×40.

Стійкість до умов оксидативного стресу визначали за модифікованою методикою [15]: 200 триденних самців поміщали у пробірки з агарозним середовищем (по 20 особин), на фільтр наносили по 200 мкл 5%-ного H₂O₂ в 10%-ній сахарозі. Через кожні дві доби мух пересаджували у свіжі пробірки. Через 96 год визначали відсоток виживання особин. Контролем слугували показники виживання особин на 10%-ній сахарозі.

Статистичну обробку параметрів тривалості життя проводили з використанням показника "t" (критерій Стьюдента). Відмінність між величинами вважали статистично значущою при P≤0,05. Рівні значущості позначали "*" для P≤0,05, "***" для P≤0,01, "****" для P≤0,001.

Результати і їхнє обговорення

Важливо враховувати, що багатьом генам хребетних і безхребетних тварин властива диференційна активність. Вивчення природи дегенеративних змін тканини мозку передбачає розуміння особливостей функціонування продуктів досліджуваних генів у різних типах клітин мозку, зокрема, у нейронах. Застосування бінарної системи тканинспецифічної експресії *UAS-GAL4* дає змогу з високою ефективністю досягати функціонального інгібування конкретного гена у певній тканині (або типі клітин) у визначений період онтогенезу [5]. Така обширна дегенерація тканини мозку в його центральній частині, яка характерна точковим мутантам за генами *Sods* (рис. 1, Б), переважно зумовлена відмиранням саме тіл нейронів, які становлять основну частку центрального мозку дрозофіли. З'ясовано функціональну роль СОД у дегенерації дофамінових нейронів дрозофіли [4, 16]. Відомо також, що мутації у гені *Sod1* людини зумовлюють відмирання мотонейронів [11, 14].

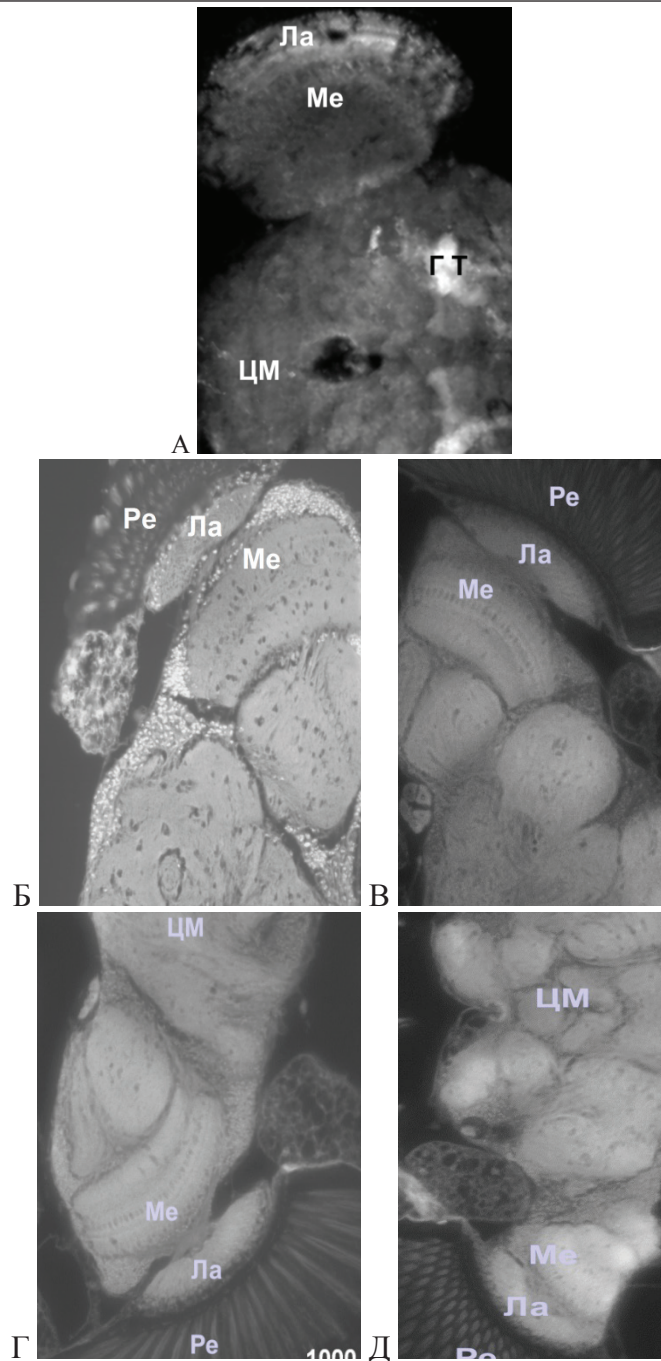


Рис. 1. А – Z-проекція серії зображень тканини мозку зі конфокального мікроскопа відображає патерн експресії драйверної лінії *elav-Gal4/UAS-CD8:GFP*. Парафінові зрізи тканини мозку особин *D. melanogaster*: Б – мутант *Sod^[X-39]*; В – *elav-Gal4/Oregon*; Г – *UAS-Sod1-RNAi/elav-Gal4*; Д – *UAS-Sod2-RNAi/elav-Gal4*. Ре – ретина, Ла – ламіна, Ме – медула, Ло – лобула, ЦМ – центральний мозок, ГТ – грибоподібні тіла.

Нами було використано драйверну лінію *elav-Gal4*, яка забезпечує активацію транскрипції у всіх нейронах мозку імаго. Як видно з ілюстрації 1А, промоторна ділянка *elav*, що походить з геному дрозофіли, забезпечує практично рівномірну активацію конструкту по всій тканині мозку; сильніша експресія відбувається у грибоподібних тілах, де скупчення різних типів нейронів є максимальним. Такий патерн експресії свідчить про те, що за умов інактивзації функціонально значущого білка під контролем промотора *elav* фенотиповий прояв має охоплювати всі ділянки мозку дрозофіли.

Ми здійснили функціональний нокаут – *UAS-Sod1-RNAi/elav-Gal4*, *UAS-Sod2-RNAi/elav-Gal4* генів *Sod1* та *Sod2* дрозофіли у нейронах імаго. Негативним контролем слугувала мутантна за геном *Sod1* лінія *Sod1^[X-39]* (рис. 1, Б). Як позитивний контроль було використано гетерозиготну драйверну лінію *elav-Gal4/Oregon*. У попередніх дослідженнях нами [1] було виявлено підвищену чутливість мутантів *Sod1^[X-39]* до оксидативного стресу, створеного розчином 5%-ного H_2O_2 в 10%-ній сахарозі. Для виявлення функціонального порушення в результаті інактивзації СОД у нейронах ми провели аналогічний тест на чутливість до оксидативного стресу досліджуваних особин та виявили у них значне зниження чутливості порівняно з контрольними *Oregon R* та *elav-Gal4/Oregon* (рис. 2). Більше того, показано, що за умов функціонального нокауту генів *Sod1* і *Sod2* у нейронах відсоток виживання особин нижчий, ніж у мутантів за геном *Sod1*. Якщо відомо [1], що виживання особин лінії дикого типу *Oregon R* за дії 5%-ного H_2O_2 становить близько 81%, а мутанта *Sod1^[X-39]* – 77%, то в наших експериментах цей показник у контрольних особин *elav-Gal4/Oregon* становив 69%, а у досліджуваних мух *UAS-Sod1-RNAi/elav-Gal4* та *UAS-Sod2-RNAi/elav-Gal4* – лише 23 та 20% відповідно (рис. 2).

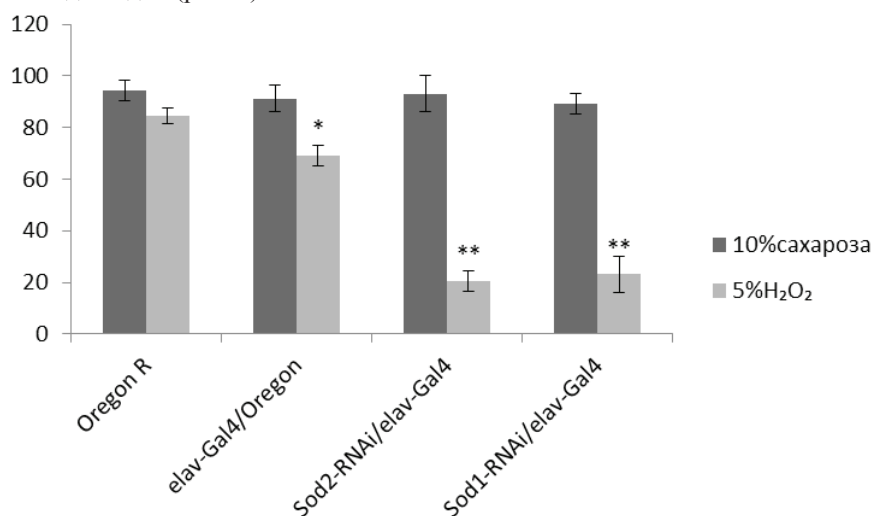


Рис. 2. Виживання *D. melanogaster* у нормі (10%-на сахароза) та за умов оксидативного стресу (5%-ний H_2O_2).

Шляхом аналізу гістологічних парафінових зрізів тканини мозку нами виявлено відсутність специфічного фенотипу за умови нокауту генів *Sod1* та *Sod2* дрозофіли у нейронах імаго (рис. 1, Г, Д). Структура тканини особин *UAS-Sod1-RNAi/elav-Gal4*, *UAS-Sod2-RNAi/elav-Gal4* не відрізнялася від такої у контрольних *elav-Gal4/Oregon* (рис. 1, В), у яких було зафіксовано слабкий, неспецифічний фенотип – поодинокі дрібні вакуолі. Це свідчить про вплив на формування фенотипу драйверної лінії з сильним промотором і підтверджує не-

обхідність використання як контролю гетерозиготної *Gal4* лінії у дослідженнях із застосуванням *UAS-GAL4* системи. Разом з тим, не було виявлено змін, подібних до фенотипу мутанта *Sod1^[X-39]* (рис. 1, Б). Це дає змогу припустити, що всупереч очікуванням, дисфункція ферменту СОД у нейронах не є визначальною причиною формування нейродегенеративного фенотипу у мутантів за геном *Sod*. Ймовірно, первинна дегенерація виникає в інших клітинах мозку або відростках нейронів, а масштабне відмирання тканини, що захоплює власне нейрони, відбувається вторинно.

На даний час накопичено багато відомостей щодо ролі нейронів і нейромедіаторів у розвитку патологій людини, пов'язаних з оксидативним стресом [4, 8, 11]. У той же час є нестача інформації щодо залучення в ці процеси гліальних клітин. Лише впродовж останніх років з'явилися поодинокі повідомлення про роль гліоцитів у патологіях, зумовлених мутантними формами СОД. Нещодавнє дослідження на культурах клітин людини показало, що щільність клітин нейронів була знижена приблизно на 45%, коли нейрони з функціональним геном *Sod1* культивували спільно з мутантними за *Sod1* клітинами глії, в яких активність СОД була практично відсутня [12]. Подібних досліджень *in vivo* на цей час немає. Ми припускаємо, що в розвитку нейродегенеративних змін визначальну роль має втрата ферментативної активності СОД саме у гліальних клітинах. Тому подальші дослідження повинні бути спрямовані як на вивчення функціонування СОД у гліоцитах, так і на дослідження зв'язків між глією та нейронами за умов послабленого антиоксидантного захисту. Важливо встановити ті клітини, які повинні бути мішенями терапевтичного впливу при розробці лікарських засобів нового покоління, котрі мають мішенню впливу визначені молекули, зокрема РНК.

За результатами нашого дослідження можна підсумувати, що прогресуюча нейродегенерація тканини мозку не зумовлена функціональною інактивацією генів *Sod1* і *Sod2* у нейронах дорослих особин *D. melanogaster*.

Робота виконана за підтримки гранту West-Ukrainian Biomedical Research Center (WUBMRC).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Вітушинська М., Матійців Н., Черник Я. Чутливість до умов оксидативного стресу, тривалість життя та нейродегенеративні зміни у структурі мозку у мутантів *Drosophila melanogaster* за генами супероксиддисмутази // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 62. С. 108–116.
2. Могиляк І., Матійців Н., Черник Я. Вплив тканинно-специфічного функціонального інгібування гена *sws* на формування структури складного ока *Drosophila melanogaster* // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 62. С. 117–122.
3. Ashburner M. *Drosophila: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 456 p.
4. Botella J., Bayersdorfer F., Schneuwly S. Superoxide dismutase overexpression protects dopaminergic neurons in a *Drosophila* model of Parkinson's disease // *Neurobiology of Disease*. 2008. Vol. 11. P. 65–73.
5. Brand A., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // *Development*. 1993. Vol. 118. P. 401–415.
6. Celotto A., Zhao L., Andrew P. et al. A novel *Drosophila* SOD2 mutant demonstrates a role for mitochondrial ROS in neurodevelopment and disease // *Brain and Behavior*. 2012. Vol. 2. P. 424–434.

7. Deng Y., Wang C., Choy K. et al. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies // *Gene*. 2014. Vol. 538. P. 217–227.
8. Ferraiuolo L., Kirby J., Grierson A. et al. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis // *Nat. Rev. Neurol.* 2011. Vol. 7. P. 616–630.
9. Heisenberg M., Bohl M. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means // *Naturforsch.* 1979. Vol. 34. P. 143–147.
10. Helfrich-Forster C. Immunohistochemistry in *Drosophila*: sections and whole mounts // *Methods Mol. Biol.* 2007. Vol. 362. P. 533–547.
11. Jerome M., Srinivasan R., Capone R., Whitlock J. Mutant SOD1 forms ion channel: Implications for ALS pathophysiology Proc // *J. Neurochem.* 2012. Vol. 45. P. 831–832.
12. Kunze A., Lengacher S., Dirren E. et al. Astrocyte-neuron co-culture on microchips based on the model of SOD mutation to mimic ALS // *Integr. Biol.* 2013. Vol. 5. P. 964–975.
13. Landis G., Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation // *Mech. Ageing Dev.* 2005. Vol. 126. P. 365–79.
14. Saccon R., Bunton-Stasyshyn R., Fisher E., Fratta P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? // *Brain*. 2013. Vol. 136. P. 2342–2358.
15. Sharma S. K., Babitch J. A. Application of Bradford's protein assay to chick brain subcellular fractions // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1980. Vol. 2. P. 247–250.
16. Thomas M., Chartrand K., Reynolds A. et al. Ion channel blockade attenuates aggregated alpha synuclein induction of microglial reactive oxygen species: Relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease // *J. Neurochem.* 2007. Vol. 100. P. 503–519.

Стаття: надійшла до редакції 02.03.14

доопрацьована 06.04.14

прийнята до друку 12.06.14

SUPEROXIDISMUTASE INACTIVATION IN NEURONS DOES NOT INFLUENCE THE NEURODEGENERATIVE CHANGES IN THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* BRAIN

N. Matiytsiv, M. Vitushinska, Ya. Chernyk

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: matiytsiv@yahoo.com*

We performed functional knockout *Sod2* and *Sod1* genes in *Drosophila melanogaster* imago neurons using tissue specific *UAS-GAL4* system expression. Flies with functional inactivation of *Sods* genes in neurons had increased sensitivity to oxidative stress conditions. However, in brain structure of these individuals we did not detect changes. The results suggest that the superoxidismutase dysfunction in neurons is not a factor in causing the formation of neurodegeneration in the *Sod* mutants brain.

Keywords: genes *Sods*, *Drosophila melanogaster*, neurodegeneration, oxidative stress, *elav-Gal4*.

**ИНАКТИВАЦИЯ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ В НЕЙРОНАХ
НЕ ВЛИЯЕТ НА РАЗВИТИЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
В МОЗГЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Н. Матийцев, М. Витушинская, Я. Черник

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: matiytsiv@yahoo.com*

Осуществлен функциональный нокаут генов *Sod1* и *Sod2* в нейронах имаго *Drosophila melanogaster* с помощью *UAS-GAL4* системы тканеспецифической экспрессии. У особей с функциональной инактивацией генов *Sods* в нейронах наблюдали повышенную чувствительность к условиям оксидативного стресса. Вместе с тем, у этих особей не обнаружены изменения в структуре мозга. Результаты позволяют утверждать, что дисфункция супероксиддисмутазы в нейронах не является определяющей причиной формирования нейродегенерации в мозге мутантов по генам *Sods*.

Ключевые слова: гены *Sods*, *Drosophila melanogaster*, нейродегенерация, оксидативный стресс, *elav-Gal4*.