

## ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕНОТИПОВИХ ЗМІН НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОГО МУТАНТА 4.14.10 ЗА ГЕНОМ *SNF4Agamma* В УМОВАХ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ

О. Щербакова

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

Досліджено морфологічні та функціональні зміни у тканині мозку мутантів *D. melanogaster* лінії 4.14.10. Мутація 4.14.10 локалізована у гені *SNF4Agamma*, який кодує  $\gamma$ -субодиницю протеїнкінази, що активується АМФ (АМРК). У даних мутантів в умовах оксидативного стресу та за наявності неактивної АМРК клітини мозку гинуть неапоптичним шляхом, що виявляється у нейродегенерації, значних порушеннях будови тканини ока, а також у відхиленнях фототаксичної реакції.

*Ключові слова:* *Drosophila melanogaster*, нейродегенерація, старіння, поведінкові реакції.

Нейродегенеративні мутанти дрозофіли є джерелом знань про функцію генів і їх продуктів, фундаментальні механізми виживання нейронів та є потенційними моделями для визначення нових шляхів терапії захворювань людини. На даний час ідентифіковано більше 30 нейродегенеративних мутацій у дрозофіли. Їхня характеристика показала, що багато з них виявляють фенотипи, близькі з характерними ознаками нейродегенеративних захворювань людини.

### Матеріали та методи

У роботі була використана лінія нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*, контролем слугувала лінія дикого типу *Oregon*. Гістологічні препарати зрізів головного мозку для світлової та електронної мікроскопії готували за стандартною методикою [2]. Фарбування тканини мозку антитілами проводили згідно з протоколами [14]. Фототаксичні реакції досліджували за методикою Бензера [3].

### Результати і їхнє обговорення

Нейродегенеративні мутанти *D. melanogaster* були отримані внаслідок хімічного мутагенезу при дії етилметансульфонату. Було показано, що патологічні зміни у досліджуваної лінії були зумовлені рецесивною мутацією в гені третьої хромосоми і характеризувалися розвитком вакуолей у різних відділах мозку. Мутація 4.14.10 була картована в ділянці делеції 93B6-93D4. У цій ділянці розміщений ген відомої нейродегенеративної мутації *loechrig (loe)* [15]. Ми провели комплементарний аналіз із мутантом *loe* і показали алейність цих мутацій, відповідно вони обидві розміщені у гені *SNF4Agamma*. Мутанти 4.14.10 і *loe* мають подібний фенотип дегенерації (рис.1), розвиток якого починається в центральній частині мозку і з віком поширюється на оптичні долі, проте нейродегенеративні зміни в *loe* проявляються на 7-й день життя дорослої особини, а в 4.14.10 – на 20-й.

Продуктом гена *SNF4Agamma* [15] є  $\gamma$ -субодиниця протеїнкінази, що активується АМФ (АМРК). АМРК є ключовим ферментом у регуляції гомеостазу клітинної енергії [8]. У всіх еукаріотичних організмів АМРК існує у вигляді гетеротримера, що складається з каталітичної  $\alpha$ -субодиниці та регуляторних  $\beta$ - і  $\gamma$ -субодиниць [12]. Усі три субодиниці є

необхідними для утворення стабільного активного комплексу. Структура і функції кожної субодиниці є консервативними поміж еукаріотами. У ссавців є по 2–3 гени, що кодують кожну субодиницю, а у *Drosophila* – лише по одному. Відповідно мутація в цих генах одразу впливає на структуру ферменту, і це робить дрозофілу зручною моделлю для вивчення його функцій. І хоча проведено багато досліджень із вивчення каталітичних властивостей АМРК, про регуляторну роль  $\beta$ - і  $\gamma$ -субодиниць відомо небагато.  $\beta$ -субодиниця взаємодіє з глікогеном, а  $\gamma$ - з АМФ, який, зв'язуючись із ферментом, веде до його конформаційної зміни і активування  $\alpha$ -субодиниці [8]. АМРК активується у відповідь на зменшення кількості АТФ у клітині під час фізичних навантажень, голодування, гіпоксії, зміни клітинного рН. Також АМРК може активуватися гормонами, ліками та клітинними стресорами, які не впливають на співвідношення АМФ:АТФ [11]. Активація АМРК пригнічує біосинтетичні процеси та запускає процеси, внаслідок яких генерується АТФ (окиснення жирних кислот, гліколіз). Цей фермент діє як на клітинному рівні, так і на рівні цілого організму, оскільки він регулює споживання їжі та використання енергії [11]. Вивчення нейродегенеративних процесів у мутантів *D. melanogaster* із новою алельною формою гена  $\gamma$ -субодиниці АМРК дає змогу детальніше дослідити роль цього фермента у функціонуванні нервової системи.

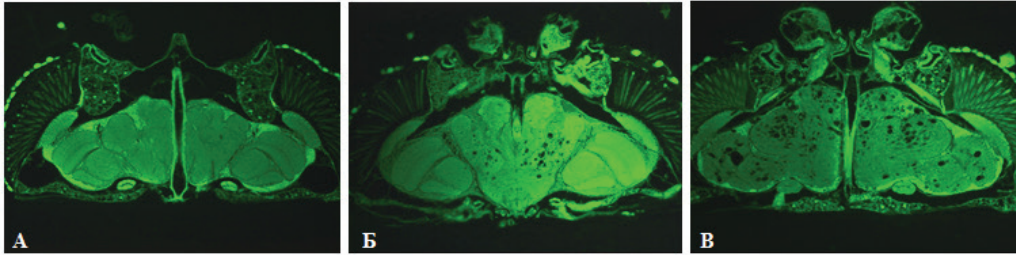


Рис. 1. Фенотип тканини мозку особин дикого типу *Oregon* 20-денного віку (А) та мутантів 4.14.10 20-денного віку (Б) і *loechrig* 7-денного віку (В).

При дослідженні впливу підвищених концентрацій кисню на розвиток нейрогенеративних змін у особин лінії 4.14.10 було виявлено специфічний фенотип, не характерний для інших ліній мутантів (рис. 1, Б). У контрольній лінії око і мозок прилягають одне до одного, а у мутантів 4.14.10 ретина ока відшарована від мозку і простір між ними заповнений дегенеруючою тканиною. Дослідженнями на мишах [5] і дрозофілі [4] показано, що підвищені концентрації кисню в атмосферному повітрі ведуть до утворення активних форм кисню в організмі до оксидативного стресу, що, у свою чергу, зумовлює апоптоз клітин мозку. У літературі описано суперечливі дані щодо впливу АМРК на апоптоз клітин [11, 12]. Є докази того, що АМРК має нейропротекторну роль, оскільки вона активується у відповідь на метаболічні порушення в мозку і зумовлює виживання нейронів гіпокампа [11]. Вважають [12], що при помірному зниженні рівня АТФ у клітині АМРК запобігає апоптозу, а при значному і різкому зменшенні кількості АТФ енергії у клітині недостатньо для відновлення співвідношення АМФ:АТФ, тому активація АМРК веде до апоптозу.

Для дослідження природи тканини між оком і мозком зрізи фарбували речовиною DAPI (4', 6-діамідино-2-феніліндол), що є інтеркалюючим агентом і виявляє ядра клітин (рис. 2).

Це фарбування засвідчило відсутність ядер у досліджуваній ділянці, що вказує на відсутність цілих інтактних клітин. За допомогою антитіл до білка Elav (embryonic lethal, abnormal vision), який експресується лише в нейрональних клітинах нервової системи, показано зменшення кількості нейронів у кортексі ламіни після дії високих концентрацій кисню (рис. 3), що свідчить про їх відмирання.

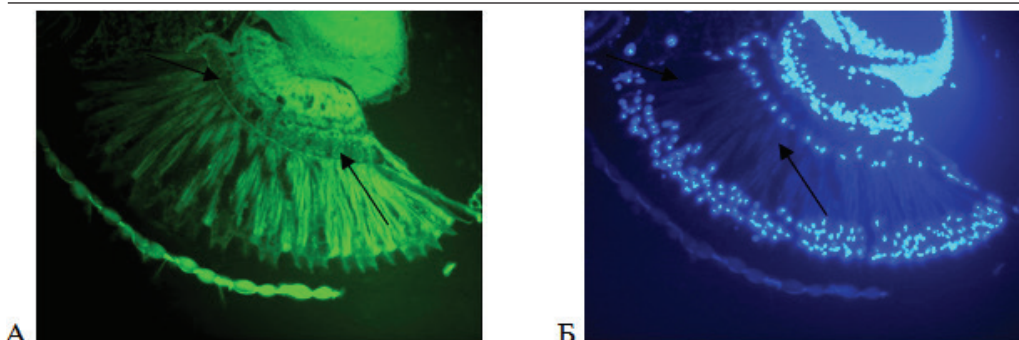


Рис. 2. Зрізи мозку особин лінії 4.14.10 після 6-денної гіпероксії з використанням DAPI: А – ультрафіолетове світло; Б – синій фільтр. Збільшення 15x40. Стрілками позначено дегенеруючу ділянку.

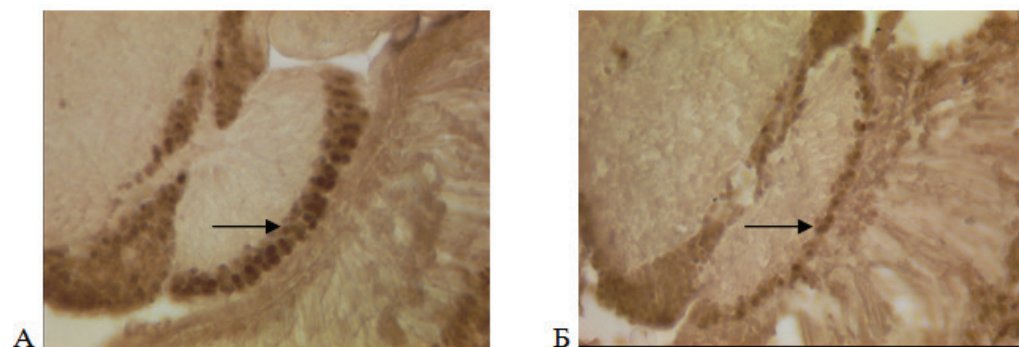


Рис. 3. Фенотип мозку особин лінії дикого типу *Oregon* (А) і мутантів 4.14.10 (Б) після 6-денної гіпероксії при фарбуванні заморожених зрізів антитілами *elav*. Збільшення 15x60. Стрілками показано нейрональні клітини.

З використанням методів електронної мікроскопії у мозку мутантів 4.14.10 після дії високих концентрацій кисню було виявлено порушення цілісності базальної мембрани ока (рис. 4, Б, В) та вивільнення ретинальних пігментів у порожнину між оком і мозком. У тканині мозку виявлено дегенеративні зміни в будові гліальних клітин і порушення цілісності монополярних нейронів у кортексі ламіни (рис. 4, Г). Ці дані підтверджують результати фарбування тканини мозку антитілами до *Elav* про зменшення кількості нейронів у даній ділянці мозку. Ознак апоптозу, який характеризується зменшенням об'єму клітини (іноді втрачається більше 1/3 нормального об'єму), конденсацією хроматину, фрагментацією ДНК без руйнування клітинної мембрани [14], не було виявлено серед відмираючих нейронів. Це вказувало на інший шлях їх загибелі. Відомо [11], що при пошкодженні АМРК, яка в нормі відповідальна за відновлення необхідного для клітини рівня АТФ, клітина страждає від браку енергії. За цих умов апоптоз зазвичай не відбувається, оскільки він потребує значних витрат енергії. Відомо, що у мутантів *loe* відмирання нейронів відбувається внаслідок некрозу [11, 12]. Імовірно, такі ж процеси відбуваються й у мутанта 4.14.10.

Зовні морфологія ока мутантів 4.14.10 виглядала нормальною, проте аналіз зрізів ока мух після дії високих концентрацій кисню виявив значну вакуолізацію ретини. Око дрософіли складається з близько 800 простих компонентів, що називаються оматидіями [10]. Кожен оматидій, що вважається простим оком, містить 20 клітин, включно з 8-ма фоторецепторними клітинами. Шість фоторецепторних клітин R1-R6 видовжуються вздовж

ретини (~85 мкм), тоді як R7 і R8 обмежені верхньою чи нижньою частиною кожного ома-тидія відповідно. Кожна фоторецепторна клітина містить спеціалізовану мікроборсинчасту ділянку, яка необхідна для вловлювання світла та фототрансдукції, і називається рабдо-мером. Фоторецепторні клітини є чутливими до дії одиничних фотонів світла, і сигнальний шлях може вмикатись і вимикатись із мілісекундною швидкістю.

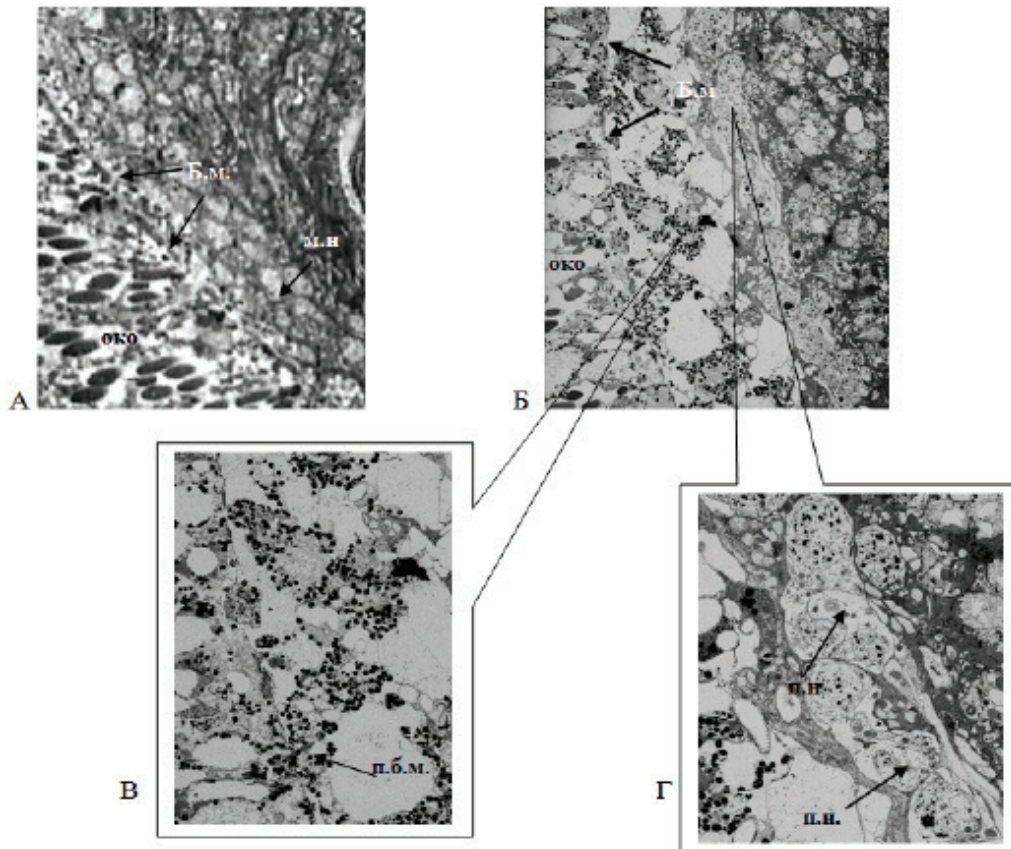


Рис. 4. Електронно-мікроскопічні фотографії мозку особин лінії дикого типу (А) та мутантів 4.14.10 (Б) після 6 днів дії високих концентрацій кисню (x1600). В – Ділянка базальної мембрани ока (x2400); Г – Ділянка кортексу ламіни (x2400). Б.м. – базальна мембрана ока, п.б.м. – пошкоджена цілісність базальної мембрани; м.н. – монополярні нейрони; п.н. – пошкоджені монополярні нейрони.

Для аналізу будови ока мух лінії 4.14.10 після дії високих концентрацій кисню виготовляли вертикальні напівтонкі зрізи (рис. 5). У контрольній лінії *Oregon* омагидії мали правильну шестикутну форму, і в них можна розрізнити 7 фоторецепторних клітин R1-R7 (рис. 5, А). У мух лінії 4.14.10 виявлено дегенерацію фоторецепторних клітин, яка проявлялась у розвитку вакуолей в окремих фоторецепторних клітинах і зменшенні кількості фоторецепторних клітин у межах омагидію після 6-денної гіпероксії (рис. 5, Г). Також зменшувався шар пігментних клітин, які є важливими для фізичного відокремлення окремих омагидіїв і виконують трофічну функцію щодо фоторецепторів. Інтенсивна вакуолізація ретини виявлена [13] за наявності мутації в гені  $\beta$ -субодиниці АМРК за нормальних умов. Автори вважають, що АМРК не впливає на розвиток фоторецепторів, але веде до дегене-



рації ретини через їх надмірне збудження. Для формування стабільного каталітично-активного комплексу АМПК важливими є всі три субодиниці, а мутації у будь-якій із них ведуть до втрати функцій ферменту [13].

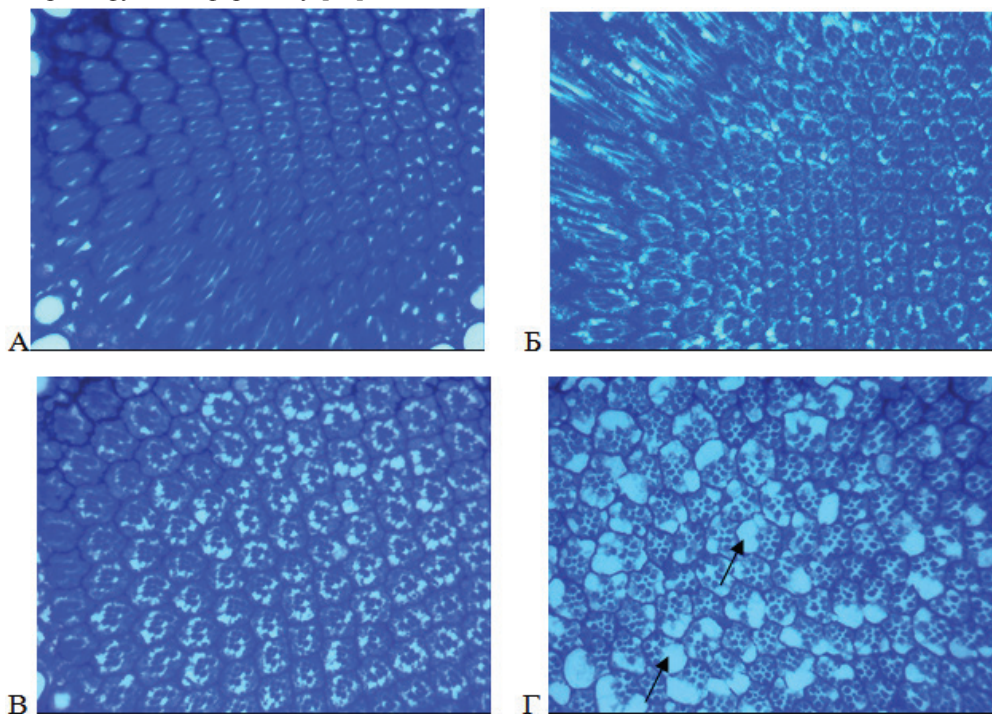


Рис. 5. Фенотип омаїдій ока: А – *Oregon* за умов нормоксії; Б – 4.14.10 за умов нормоксії; В – *Oregon* після 6 діб дії високих концентрацій кисню; Г – 4.14.10 після 6 діб дії високих концентрацій кисню, стрілками показані омаїдії зі зменшеним числом фоторецепторів. Збільшення 15x60.

Аксони фоторецепторних клітин R1-R6 формують синапси в першому оптичному ганглії, ламіні, а аксони R7 і R8 клітин проходять через ламіну і утворюють закінчення в медулі. За допомогою антитіл до специфічного білка фоторецепторів, хаоптину (антитіла 24B10, DSHB) ми показали дегенерацію та дезорганізацію R7/R8 аксонів фоторецепторних клітин у мутантів 4.14.10 унаслідок дії гіпероксії (рис. 6, А).

Порушення функціонування нервової системи та розвиток нейродегенерації зумовлюють відхилення у поведінці. У мутантів *alicorn* [13] та *bubblegum* [9] порушені фототаксичні реакції, у мутантів *dare* – нюхові властивості при навчанні [6]. Мутації *sniffer* [4] та *parkin* [7] зумовлюють зниження рухової активності, що прогресує з віком. Оскільки було виявлено дегенерацію аксонів фоторецепторних клітин і вакуолізацію ретини у мутантів 4.14.10 після умов гіпероксії, то це могло впливати на їхню зорову поведінку. Є дані [13] про те, що мутація в гені  $\beta$ -субодиниці АМПК (мутація *alicorn*) веде до ексайтотоксичності фоторецепторів, вакуолізації ретини та ламіни вже з перших днів життя дорослих мух. У мутантів *alicorn* після перетворення лялечки в дорослу муху світлові сигнали, що потрапляють на її фоторецептори, ведуть до їх збудження [13]. Ці процеси є енергозалежними і на зниження вмісту АТФ мала би реагувати АМПК, проте вона неактивна внаслідок мутації. За таких умов енергії в клітинах не вистачає і збудження фоторецепторних нейронів переростає у ексайтотоксичність.

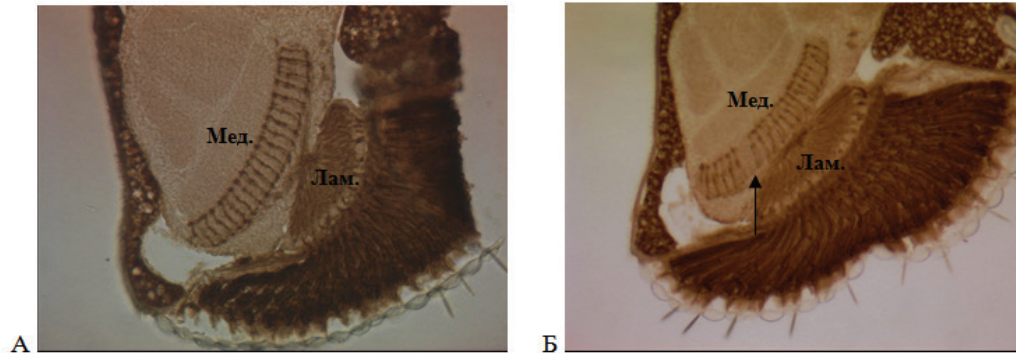


Рис. 6. Фенотип R7/R8 аксонів фоторецепторних клітин у мутантів 4.14.10 (А) та мух дикого типу (Б) після 6-денного впливу високих концентрацій кисню. Стрілками показано ділянки дегенерації аксонів. Мед. – медула, Лам. – ламіна. Збільшення 15x40.

Для виявлення відхилень у зорових реакціях ми досліджували позитивний (рух особин до світла) і негативний фототаксис (рух особин від світла) за нормальних умов. У особин лінії *Oregon* позитивний фототаксис перевищував негативний (рис. 7), тобто переважаюча більшість цих мух рухалася у напрямку джерела світла. Особини лінії *sine oculis* характеризуються відсутністю очей і, відповідно, реакція позитивного й негативного фототаксису в них не відрізнялася. Мухи лінії 4.14.10 значно охочіше уникали світла, про що свідчив підвищений негативний фототаксис і знижений позитивний, а також показник індекса фототаксису (рис. 7).

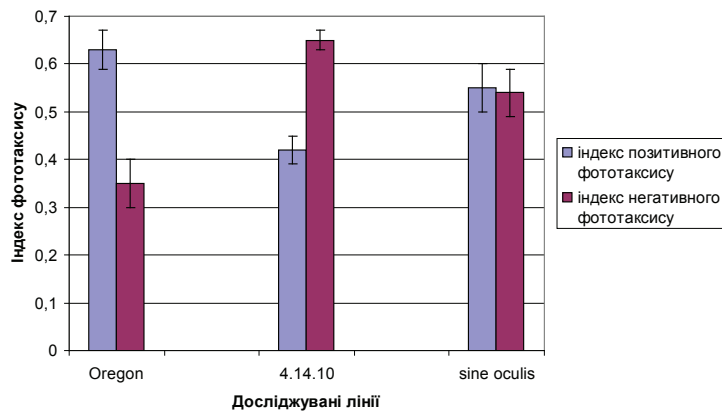


Рис. 7. Індекс фототаксису в досліджуваних мух за нормальних умов.

Відомо, що АМПК відіграє центральну роль у метаболізмі холестеролу та його ефірів [8, 15]. Знижена концентрація ліпідів може бути причиною порушень функцій мембран клітини і робити мембрану більш чутливими до дії вільних кисневих радикалів, які зумовлюють значну дегенерацію мозку і ретини особин 4.14.10 за умов гіпероксії. За відсутності активної АМПК та зниженого вмісту ліпідів клітини будуть гинути неапоптичним шляхом, як і у мутанта *loe*.

Виявлення нової алельної форми гена *SNF4Agamma*, що кодує протеїнкіназу, яка активується АМФ і є негативним регулятором синтезу холестеролу, може бути використане для подальшого з'ясування ролі метаболізму ліпідів для нормального функціонування нервової системи та розвитку нейродегенеративних захворювань.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Матийцив Н. П., Магоривская И. Б., Щербакова О. В. и др. Генетический анализ нейродегенеративных мутантов *Drosophila melanogaster* по 3-й хромосоме, индуцированных этилметансульфонатом // Генетика. 2009. Т. 45. № 2. С. 196–202.
2. Ashburner M. *Drosophila: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. P. 179–189.
3. Benzer S. Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution // Proc. Natl. Acad. Sci. 1967. Vol. 58. P. 1112–1119.
4. Botella J. A., Ulschmid J. K., Gruenewald C. The *Drosophila* carbonil reductase sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration // Current Biol. 2004. Vol. 14. P. 782–786.
5. Dean J. B., Mulkey D. K., Henderson R. A. Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyper-ventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons // J. Applied Physiol. 2004. Vol. 96. P. 784–791.
6. Freeman M. R., Dobritsa A., Gaines P. The *dare* gene: steroid hormone production, olfactory behavior, and neural degeneration in *Drosophila* // Development. 1999. Vol. 126. P. 4591–4602.
7. Greene J. C., Whitworth A. J., Kuo I. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 4078–4083.
8. Kemp B. E., Mitchell K. I., Stapleton D. Dealing with energy demand: the AMPK-activated protein kinase // Trends Biochem. Sci. 1999. Vol. 24. P. 22–25.
9. Min K.-T., Benzer S. Preventing neurodegeneration in the *Drosophila* mutant *bubblegum* // Sci. 1999. Vol. 284. P. 1985–1988.
10. Pak W. *Drosophila* in vision research // Ophthalmology and visual science. 1995. Vol. 36. N 12. P. 2350–2358.
11. Ronett G. V., Ramamurthy S., Kleman A. M. AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection // J. Neurochem. 2009. Vol. 109. P. 17–23.
12. Spasic M. R., Callaerts P., Norga K. AMP-activated protein kinase (AMPK) molecular cross-road for metabolic control and survival of neurons // Neuroscientist. 2009. Vol. 15. P. 309–316.
13. Spasic M. R., Callaerts P., Norga K. *Drosophila alicorn* is a neuronal maintenance factor protecting against activity-induced retinal degeneration // J. Neurosci. 2008. Vol. 28. N 25. P. 6419–6429.
14. Sullivan W., Ashburner M., Hawley R. S. *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000. 697 p.
15. Tschaepe J.-A., Hammershmid C., Muehlig-Versen M. et al. The neurodegeneration mutant *loechrig* interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing // EMBO J. 2002. Vol. 23. P. 6367–6376.

Стаття: надійшла до редакції 12.03.14

доопрацьована 03.04.14

прийнята до друку 20.06.14

**CHARACTERISTICS OF PHENOTYPICAL CHANGES  
OF NEURODEGENERATIVE MUTANT 4.14.10 ON THE GENE  
*SNF4Agamma* DURING OXIDATIVE STRESS**

**O. Shcherbakova**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: oksana\_kysla@yahoo.com*

Morphological and functional changes in brain tissue of *D. melanogaster* mutants 4.14.10 were detected. Mutation 4.14.10 was localized in the gene *SNF4Agamma*. The *SNF4Agamma* protein is one of the regulatory subunits of the AMP-activated protein kinase (AMPK) complex in *Drosophila*. During oxidative stress these mutants showed non-apoptotic cell death that resulted in neurodegeneration, derangement of eye tissue and phototactic reaction.

*Keywords: Drosophila melanogaster, neurodegeneration, aging, behavior.*

**ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ  
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОГО МУТАНТА 4.14.10 ПО ГЕНУ  
*SNF4Agamma* В УСЛОВИЯХ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА**

**О. Щербакова**

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

Исследованы морфологические и функциональные изменения в ткани мозга мутантов *D. melanogaster* линии 4.14.10. Мутация 4.14.10 локализована в гене *SNF4Agamma*, который кодирует  $\gamma$ -субъединицу протеинкиназы, активирующейся АМФ (АМРК). У данных мутантов в условиях оксидативного стресса и при неактивной АМРК клетки мозга отмирают неапоптотическим путем, что проявляется в развитии нейродегенерации, значительных нарушениях строения ткани глаза, а также в отклонениях фототаксической реакции.

*Ключевые слова: Drosophila melanogaster, нейродегенерация, старение, поведенческие реакции.*