

**ВПЛИВ ТКАНИННО-СПЕЦИФІЧНОГО ФУНКЦІОНАЛЬНОГО
ІНГІБУВАННЯ ГЕНА *SWS* НА ФОРМУВАННЯ СТРУКТУРИ
СКЛАДНОГО ОКА *DROSOPHILA MELANOGASTER***

І. Могиляк*, Н. Матійців, Я. Черник

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

З'ясовано вплив функціонального інгібування гена *swiss cheese* на формування і функціонування оптичної частки мозку та ока *D. melanogaster*. Наявність білка SWS має важливе значення для функціонування ламінарної глії, а пригнічення його трансляції в оптичній частині мозку за допомогою *Gal4-UAS* системи призводить до тяжкої дегенерації ділянки ламіни з віком. Функціональне інгібування гена *sws* лише у тканинах ока мало трохи слабший ефект. У разі подальшого звуження ділянки, в якій пригнічується синтез SWS, до кінчних клітин ока і R7 та R8 фосфорорецепторів не вдалося виявити видимих фенотипових змін у дорослих особин. Змінений фенотип ока виникав, імовірно, внаслідок порушення функціонування глії, оскільки не було зафіксовано змін у структурі очних імагінальних дисків лялечки чи «кристалічній» структурі ока дорослих особин досліджуваних ліній.

Ключові слова: дрозофіла, нейродегенерація, *sws*, NTE, *Gal4-UAS* трансгенна експресія.

Гени, продукти яких є необхідними для підтримання цілісності ЦНС дрозофіли, були відкриті за допомогою трьох методичних підходів: скринінгу мутацій із втраченою функцією, підбору генів-кандидатів і дослідження випадкових мутацій, отриманих незалежно, які впливали на втрату цілісності мозкових структур [13]. Метод широкого пошуку, або скринінг, класично базується на відборі мутантів із поведінковими дефектами, котрі в подальшому підлягають гістологічній перевірці на наявність нейродегенерації. Альтернативним до нього є метод підбору генів-кандидатів, у якому ідентифікують і характеризують гени дрозофіли, ортологи мишачих або людських генів, причетних до виникнення нейродегенерації.

Нейродегенеративний мутант *swiss cheese (sws)* був отриманий під час скринінгових досліджень із використанням тесту на швидкий фототаксис [4]. Мухи *sws* характеризуються значно коротшою тривалістю життя порівняно з особинами дикого типу. У 5-денних молодих мух розпочинається вакуолізація нейропілю, що швидко прогресує з віком. Апоптичні зміни з'являються у мутантів у віці 3–4 днів, а до 20-го дня життя імаго майже весь кортекс підлягає апоптозу, що підтверджується електронно-мікроскопічними дослідженнями тканин мозку старих особин [12].

Дегенерація поширюється не лише на нейрони, але і на гліальні клітини; так, було показано, що навколо 10% нейронів мозкового кортексу утворюється багатошарове гіперогортання клітинами оточуючої глії [12]. У нормі видовжені гліальні клітини огортають нейрони одним, зрідка двома шарами. У випадку *sws* мутантів частота багатошарових структур у кортексі, а також у нейропілі значно зростає. Такі структури вперше з'являються на стадії пізньої лялечки задовго до формування вакуолей і збільшуються в розмірі з віком імаго. Це свідчить про те, що гіперогортання є наслідком порушень диференціації гліаль-

них клітин, а не відповіддю глії на дегенерацію нейронів. Цей дефект може мати негативний вплив на виживання нейронів і призводити до їхньої масової дегенерації у старих мутантних особин.

Ген *sws* є не лише гомологом, але й функціональним ортологом гена нейропатії індукуючої естерази (NTE) ссавців, і функціонування його білкового продукту має клітинно-автономний ефект [12, 17]. NTE ссавців є нейрональним, трансмембранним білком, який володіє серинестеразною активністю проти неорганічних субстратів [9, 11]. Мутації в гені *PNPLA6*, який кодує NTE у людей, призводять до розвитку спастичної параплегії – спадкового захворювання, яке характеризується дегенерацією мотонейронів. Більш того, NTE ссавців є молекулярною мішенню ортофосфатів, які викликають повільну нейропатію у хребетних, котра морфологічно характеризується дегенерацією довгих аксонів центральної та периферичної нервової системи і клінічно проявляється у паралічі нижніх кінцівок [15]. NTE ссавців здатна деградувати EP-асоційований фосфатидилхолін до гліцерофосфохоліну в клітинах дріжджів і культурах клітин ссавців. Мутанти *sws* характеризуються підвищеним рівнем фосфатидилхоліну, та SWS, як і NTE ссавців, бере участь у регуляції гомеостазу ліпідів у мозку [17, 22]. Саме відсутність відповідної кількості білка в мембранах гліальних клітин може спричинити значні uszkodження тканин унаслідок порушення гомеостазу ліпідів.

Згідно з останніми дослідженнями проекту modENCODE [16], ген *sws* активно експресується практично в усьому тілі дрозофіли. Під час онтогенезу рівень експресії гена є найвищим на стадіях раннього ембріона та пізньої лялечки, а також у дорослих особин. Субклітинно SWS дрозофіли локалізується в мембранах ендоплазматичного ретикулу, що збігається з локалізацією NTE в COS клітинах і в культурі мишачих нейронів гіпокампусу [14, 1]. Під час ультраструктурного дослідження нейронів *sws1* мутантів було виявлено чіткі порушення мембранних структур ендоплазматичного ретикулу, що прогресують з віком. Водночас мітохондрії та інші органели клітини залишаються інтактними як у молодих, так і у старих особин. Це є свідченням того, що білок SWS має вирішальне значення для функціонування саме ендоплазматичного ретикулу [17].

Дослідники [12, 17], опираючись на дані *in situ* гібридизації кріозрізів мозку дрозофіли, вважали, що ген *sws* не експресується в оці дрозофіли, а відтак, не є важливим для його формування та функціонування. Проте в ході проекту modENCODE [16] була виявлена експресія гена *sws* в оці.

Метою роботи було дослідити вплив тканинно-специфічного функціонального інгібування гена *sws* на формування оптичної частки мозку та складного фасеткового ока *Drosophila melanogaster*.

Матеріали та методи

Матеріалом досліджень слугували лабораторні лінії *D. melanogaster* – Oregon-R (контрольна лінія дикого типу), *sws1* – мутант за геном *sws* (з колекції проф. Д. Кретчмар, США) і драйверні лінії Gal4 з різними тканинно-специфічними промоторами в ділянці енансерної послідовності дріжджового транскрипційного фактора *Gal4* (рис. 1). *1369-Gal4* експресує транскрипційний фактор у оптичній системі личинки і лялечки, та в оці, глії, ламіні й частині медули дорослих особин; *GMR-Gal4* – в клітинах ретини на стадії 3L личинки; *sev-Gal4* – в конічних клітинах і фосфорорецепторах R7 і R8 ока (з колекції проф. К.-Ф. Фішбаха, Німеччина); *5469-UAS-sws-RNAi* (з колекції Блумінгтонського центру, США) і *2212R-1-UAS-sws-RNAi* (з колекції Кіотського центру, Японія) містять після UAS ділянки сенс- і антисенс-кодуючу послідовність гена *sws*, а *UAS-sws* (з колекції проф. Д. Кретчмар, США) після ділянки UAS містить кодуючу послідовність гена *sws*. Усі лінії утримувались

на стандартному середовищі при 25°C [2]. Синхронізацію культури та відбір віргінних самок проводили згідно із загальноприйнятими методиками [3, 18].

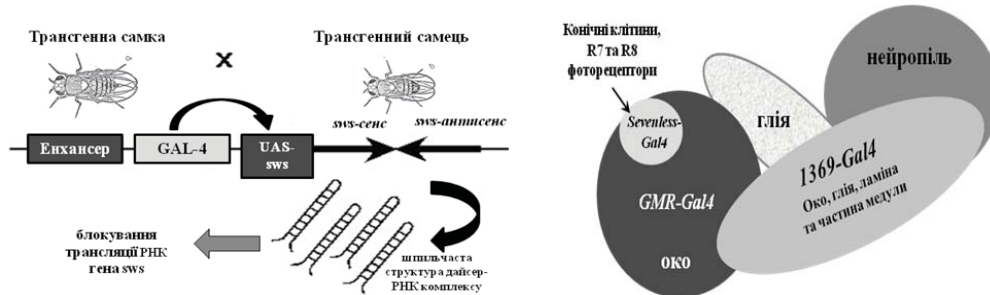


Рис. 1. А – схема функціонування GAL4-UAS бінарної системи контрольованої трансгенної експресії; Б – схематичне зображення патернів експресії використаних GAL-4 драйверних ліній.

Гістологічні зрізи головного мозку проводили за допомогою двох методик. Парафінові 7 мкм зрізи виготовляли за стандартною методикою [10], 1 мкм пластикові зрізи виготовляли за методикою Генделя і Млодзика [8]. Фенотип структури мозку визначали у самців 20-денного віку. Парафінові зрізи аналізували на конфокальному скануючому мікроскопі Nikon LSM A1 Clem Comfocal Microscope, напівтонкі зрізи фарбували толуїдиновим синім і аналізували на мікроскопі Laboval-3 Carl Zeiss Jena.

Western-Blot аналіз. Гомогенати виготовляли зі самців 3-денного та 20-денного віку і розділяли в 10 та 15% поліакриламідному гелі й переносили на PVDF мембрану (Millipore Corporation, Milford, MA, USA). Для блокування неспецифічного зв'язування блот інкубували в 3% розчині молока в PBS протягом 1 год. Для виявлення SWS використовували rabbit anti-SWS (1:500) (отримані від д-р Д. Кретчмар) та вторинні антитіла anti-rabbit HRP (1:1000) (Cell Signaling). Для виявлення α -тубуліну використовували mouse anti- α tub (1:1000) і вторинні mouse anti-HRP (1:10000) антитіла (Cell Signaling). Інкубацію з первинними антитілами проводили протягом ночі при 4°C, з вторинними – протягом двох годин при кімнатній температурі. Детекцію хемілюмінесценції здійснювали за допомогою ECL системи (GE Healthcare).

Фарбування очних імагінальних дисків мозку лялечки проводили на стадії p25 (25 год стадії розвитку лялечки) та p45 (45 год). Десекцію імагінальних дисків здійснювали методом тотального препарату. Як первинні антитіла використовували mouse anti-Armadillo (1:200), вторинні – anti-mouse Alexa568 (1:200). Препарати аналізували на конфокальному скануючому мікроскопі Nikon LSM A1 Clem Comfocal Microscope, за допомогою програми NIS Elements.

Ультраструктурний аналіз зовнішнього вигляду фасеткових очей проводили за допомогою скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) згідно зі стандартною методикою [20].

Результати і їхнє обговорення

Для визначення необхідності білка SWS для формування та функціонування ока дрозофіли нами була застосована бінарна система тканинно-специфічної експресії *Gal4-UAS*. *GAL4* – транскрипційний фактор дріжджів, що з високою ефективністю зв'язується з енхансерною послідовністю *UAS* (upstream activation sequence), запускаючи конститутивну експресію гена, розміщеного за напрямком транскрипції (downstream). Для ефективної експресії в певних тканинах необхідно внести в один генотип трансгенний конструкт із послідовністю кДНК гена під контролем *UAS* послідовності, та послідовність *GAL4*, що перебуває під контролем тканинно-специфічного промотора [5] (рис. 1, А). Також дана

методика дає змогу створювати ефективне функціональне інгібування трансляції, за умови внесення в активний конструкт антисенс-сенс кодуючої послідовності гена. Після запуску транскрипції такої комбінації з *UAS* промотора внаслідок гібридизації комплементарних послідовностей формується дуже стійкий дайсер-комплекс іРНК, що утворює шпильчасті структури. *Gal-4* запускає високу конститутивну експресію трансгенів, тому цей комплекс молекул РНК утворюється у великій кількості і блокує процеси трансляції даного білка.

Складне око дрозофіли складається приблизно з 800 омаїдів, кожен із яких містить вісім фоторецепторних нейронів, пігментні та конічні клітини. Кожен аксон фоторецепторів термінується у трьох різних шарах оптичної частки, залежно від їх спектральної чутливості. Фоторецептори R1-R6 термінують свої аксони в ламіні, проходячи сортування в дистальній частині ламіни для того, щоб зійтися в одному картриджі разом із іншими R1-R6 аксонами, котрі сигналюють з тієї ж точки візуального простору, згідно з принципом нейрональної суперпозиції [6]. Термінуючи свій ріст, фоторецептори R1-R6 звільняють нейротрансмітер гістамін і тим самим утворюють сигнал для монополярних нейронів ламіни L1-L3 й амакринових клітин. Для оптимізації просторової роздільної здатності картриджі є електрично та хімічно ізольованими через високо розвинену систему гліального бар'єру, що оточує кожен картридж. Клітини, що формують омаїди, розвиваються з клітин очних імагінальних дисків личинки в ході періоду метаморфозу [21]. Ця високоорганізована система є чутливою до порушень, а отже, є зручною тест-системою для з'ясування необхідності продуктів різних генів.

Нами були використані різні драйверні *Gal-4* лінії, патерн експресії яких в оптичній частині частково перекривався і звужувався до окремих популяцій гліальних та нейрональних клітин ока (рис. 1, Б). Так, лінія *1369-Gal4* мала найширше поле експресії, що включало тканини ока, кортексної глії, ламіни та частково медули, *GMR-Gal4* експресувалась у всіх клітинах ока, а *sev-Gal4* – у конічних клітинах та R7 і R8 фоторецепторах. У ході даного дослідження також використовувались дві лінії з антисенс послідовностями гена *sws*: *5469-UAS-sws-RNAi* та *2212R1-UAS-sws-RNAi* (проілюстровано лише для лінії *5469-UAS-sws-RNAi*). Використання різних ліній в експериментах з експресією трансгенних конструктів дає змогу мінімізувати, або і зовсім виключити вплив ефекту положення інсерції трансгенної послідовності.

Для отримання активного конструкту проводили схрещування *Gal-4* та *UAS-sws-RNAi* ліній з подальшим аналізом самців першого покоління. Функціональність *Gal4-UAS* системи було підтверджено за допомогою Western-Blot аналізу білка SWS. Так, білок із молекулярною масою у 160кДа можна чітко побачити у лінії дикого типу, як і у гомозиготних батьківських ліній (рис. 2, А – 1, 2, 3, 5), надекспресія гена *sws* в активному конструкті *1369-Gal4/UAS-sws* відображається значно більшим рівнем сигналу (рис. 2, А – 4), а функціональний нокаут підтверджується фоновим рівнем сигналу, що відображає білок SWS (рис. 2, А – 6).

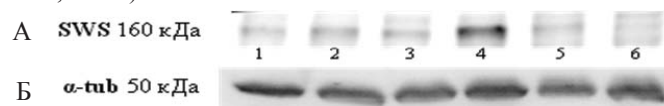


Рис. 2. А – Western-Blot аналіз білка SWS, 6% ПААГ, Б – Western-Blot гібридизація α -тубуліну; 1 – *Oregon-R*, 2 – *XY; +/+; 1369-Gal4/1369-Gal4*, 3 – *XY; +/+; UAS-sws/UAS-sws*, 4 – *XY; +/+; 1369-Gal4/UAS-sws*, 5 – *XY; +/+; UAS-sws-RNAi/UAS-sws-RNAi*, 6 – *XY; +/+; 1369-Gal4/UAS-sws-RNAi*.

Для аналізу стану тканини мозку досліджуваних особин використовували дві методики, які проводили паралельно. Парафінові та пластикові напівтонкі зрізи

виготовляли з тканини мозку 20-денних особин кожного генотипу. В контрольній лінії *Oregon-R* нейропілль і глія мають регулярну інтактну структуру, як і в гетерозиготних особин батьківських ліній, схрещених з диким типом. Негативним контролем для порівняння стану нейропіллю слугувала мутантна лінія *sws1* (рис. 3).

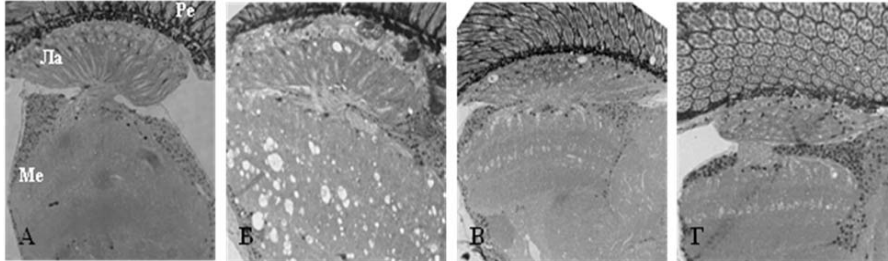


Рис. 3. Напівтонкі пластикові зрізи тканини мозку 20-денних самців *Drosophila melanogaster*: А – самці лінії *Oregon-R*; Б – дегенеративний фенотип аморфних гомозиготних мутантів *sws1*; В – гомозиготні особини *UAS-sws-RNAi*; Г – гетерозиготні особини *UAS-sws-RNAi/Oregon*; Ре – ретина, Ла – ламіна, Ме – медула.

У разі дослідження стану тканин оптичної частки у самців *1369-Gal4/UAS-sws-RNAi* ми побачили несподіваний результат. Ламіна в даних особин була зруйнована, структура ока дуже порушена і нерегулярна. Верхівкова мембрана, яка складається з гліальних клітин і відділяє око від мозку, була витіснена в бік ока, а рабдомери проростали вглиб, захоплюючи територію ламіни. Разом з тим, тканина нейропіллю медули і центрального мозку залишалась інтактною, незважаючи на те, що *1369-Gal4* активно експресується в цих районах, тоді як у контрольних гомо- і гетерозиготних особин не спостерігалось відхилень від норми (рис. 4, А–В). Подібний фенотип, названий «фенотипом глибоких рабдомерів», виявлено при порушеннях експресії білка клітинної адгезії *Rst-ct* [7]. При звуженні ділянки експресії лише до ока, використовуючи лінію *GMR-Gal4*, ми спостерігали подібний результат, проте він був дещо слабшим (рис. 4, Г–Є).

Отже, постало питання, для якої саме тканини експресія *SWS* є настільки принциповою, що відсутність даного білка викликає такі тяжкі наслідки? Нами була використана третя лінія із ще вузкою ділянкою експресії – *sev-Gal4*, що є активною лише в конічних клітинах ока та в фоторецепторах R7 та R8. Як видно з рис. 4, Є–З, інгібування гена *sws* лише в цих клітинах не зумовлює сильного фенотипового прояву.

Для підтвердження отриманого фенотипу нами було проведено більш тонке дослідження структури тканин оптичної частки за допомогою методики напівтонких зрізів. На рис. 5 зображено вигляд ламіни і ретини самців *1369-Gal4/UAS-sws-RNAi* та *GMR-Gal4/UAS-sws-RNAi*. На цих препаратах можна чітко простежити вrostання рабдомерів за лінію ізолюючої мембрани (рис. 5, В–Д), а також у випадку лінії *1369-Gal4* – сильну дегенерацію ламіни та ретини.

Цікавим залишається той факт, що нейропілль медули, де експресується *1369-Gal4*, залишався неушкодженим, поряд зі значною дегенерацією в ділянці ламіни. Відсутність нейронального фенотипу під час нокауту гена *sws* також підтверджується іншими нашими дослідженнями із застосуванням панневрального *elav-Gal4* та *ap-Gal4*, що експресується в L4 нейронах ламіни, в медулі та в комплексі лобули. Більше того, дегенерації в зоні ламіни збігаються з розміщенням субпопуляцій ламінарної глії (верхівкової, глії псевдокартриджу, дистальної та проксимальної сателітної, епітеліальної й маргінальної) (рис. 5, А). Отже можна припустити, що наявність білка *SWS* є визначальною передовсім для глії, а не для нейронів чи клітин ока.

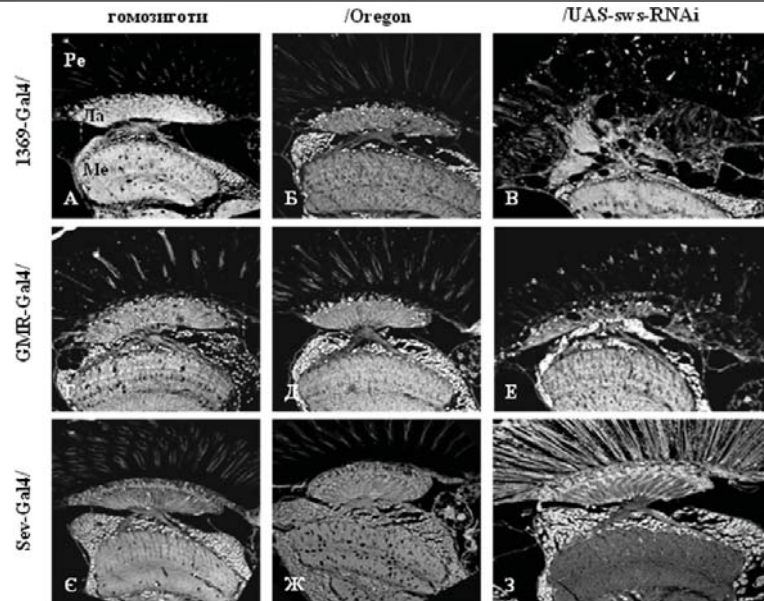


Рис. 4. Гістологічні парафінові зрізи тканини мозку старих самців *Drosophila melanogaster*. А, Г, Є – гомозиготні самці драйверних ліній; Б, Д, Ж – гетерозиготні контрольні самці від схрещування *Gal4* драйверних ліній із диким типом; В, Е, З – експериментальні самці з функціональним нокаутом гену *sws* від схрещування драйверних ліній з *UAS-sws-RNAi* лінією. Ре – ретина, Ла – ламіна.

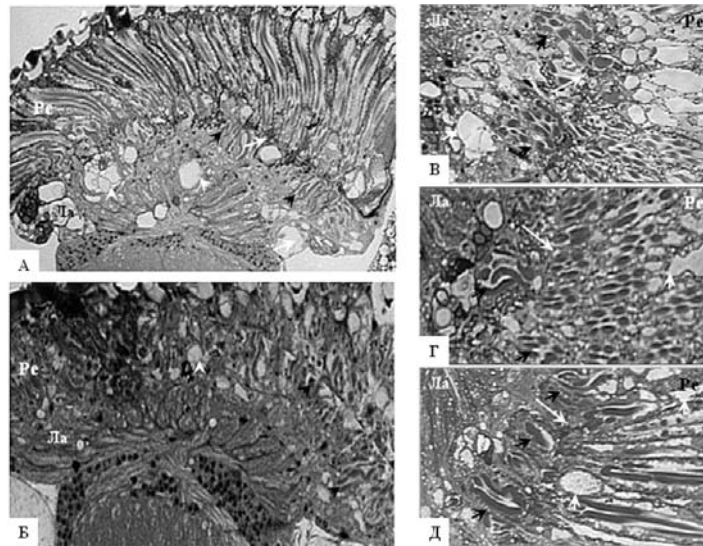


Рис. 5. Гістологічні 1 мкм пластикові зрізи тканин мозку старих самців *D. melanogaster* з функціональним нокаутом гену *sws*, що демонструють фенотип «глибоких рабдомерів». А – *1369-Gal4/UAS-sws-RNAi*, Б – *GMR-Gal4/UAS-sws-RNAi*. В, Г, Д – збільшений вигляд аномально врослих рабдомерів у самців *1369-Gal4/UAS-sws-RNAi*. Ре – ретина, Ла – ламіна. Білими стрілками позначена межа верхівкової мембрани (fenestrated membrane), білими короткими стрілками позначені вакуолі, що утворилися внаслідок дегенерації, чорними короткими стрілками показані рабдомери, що проросли за межі верхівкової мембрани в зону мозку.

При аналізі фенотипу, отриманого від гетерологічної експресії генів за допомогою *UAS-Gal4* системи, слід також зважати на час експресивної активності різних *Gal4* конструктів. *1369-Gal4*, крім тканин дорослих особин, також експресується в оптичній системі личинки і лялечки. *GMR-Gal4* експресується в ретині на стадії 3L личинки, а *sev-Gal4* – на стадіях личинки і лялечки. Використані нами конструкти мають високий рівень експресії впродовж метаморфозу, коли формується складна структура ока. Дослідження очних імагінальних дисків на стадіях активного формування і порівняння їх зі структурою ока дорослих особин може дати відповідь, чи білок SWS є необхідним саме для формування ока дрозофіли, чи дегенеративний фенотип, досліджений нами, є наслідком порушень у нейронах і глії. Очні імагінальні диски досліджували на стадіях p25 та p45 лялечки, детекцію проводили антитілами до структурного білка Armadillo (рис. 6, В, Є, Ї).

Вивчення структури омаїдіїв під час їх формування у контрольних ліній, а також у ліній із функціональним нокаутом гена *sws*, не показало дефектів розвитку – омаїдії формувалися правильно, згідно з нормою досліджуваних стадій, не втрачаючи регулярної структури «біокристал». Більше того, при вивченні структури омаїдіїв дорослих особин також не було виявлено значних змін, зберігалися регулярна структура ока і порядок розташування очних щетинок (рис. 6), фоторецептори в окремих омаїдіях мали нормальний порядок розташування (рис. 6, Г, Ж, К).

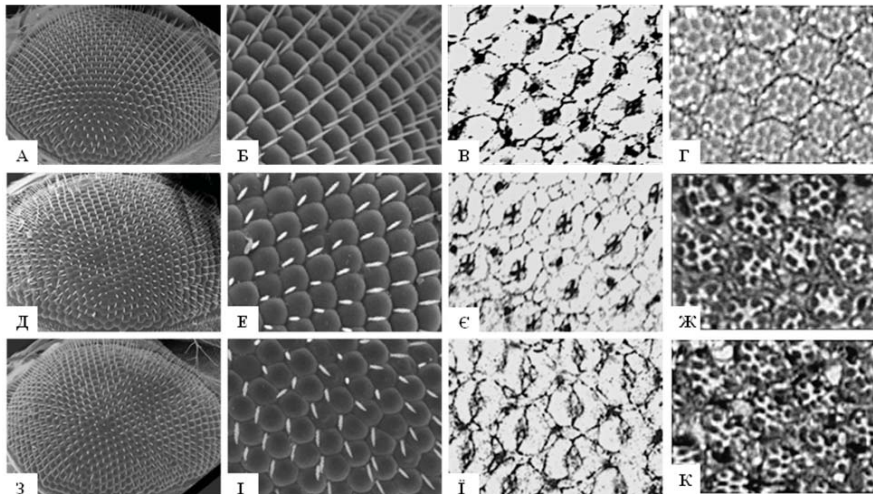


Рис. 6. Формування структури складного ока дрозофіли в нормі та за інгібування експресії гена *sws*. А, Д, З – вигляд фасеткового ока дорослої особини дрозофіли з рядами щетинок; Б, Е, І – збільшений вигляд фасеток (трансмійна електронна мікроскопія); В, Є, Ї – фарбування очних імагінальних дисків лялечки дрозофіли на стадії p25 антитілами mouse anti-Armadillo (1:200), Г, Ж, К – напівтонкі пластикові зрізи ока, фарбовані толуїдиновим синім. А – Г – дикий тип *Oregon-R*; Д – Ж – *1369-Gal4/UAS-sws-RNAi*, З – К – *GMR-Gal4/UAS-sws-RNAi*.

Таким чином, на зрізах оптичних часток, а також очей дорослих досліджуваних особин виявлено ділянки дегенерації в ретині одночасно зі збільшенням помилок у розташуванні щетинок омаїдіїв ока, порівняно з контролем. Імовірно, ці зміни виникають унаслідок ушкодження ламінарної глії, порушення формування бар'єрного шару мозку і коректної термінації росту фоторецепторів, а також дегенеративних процесів у ламіні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Akassoglou K., Malester B., Xu J. et al. Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. P. 5075–5080.
2. Auluck P. K., Chan N. Y., Trojanovski J. Q. et al. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease // Scie. 2002. Vol. 295. P. 865–868.
3. Ausubel F. M. Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, 1990. Vol. 2. 534 p.
4. Benzer S. Behavioral mutants *Drosophila melanogaster* isolated by counteroccurrent distribution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1967. Vol. 8. P. 1112–1119.
5. Brand A., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Development. 1993. Vol. 118(2). P. 401–415.
6. Breitenberg V. Patterns of projection in the visual system of the fly // Exp. Brain. Res. 1967. Vol. 3(3). P. 271–298.
7. Fischbach K. A molecular link between programmed cell death and axonal projection defects // from Research Report 1992 of the Fischbach lab. 1992. <http://filab.biologie.uni-freiburg.de/Atlas/Fischbach/reportFiRees.html>. 11
8. Gaengel K., Mlodzik M. Microscopic Analysis of the adult *Drosophila* retina using semithin plastic sections // *Drosophila: Met. and Protoc. Series: Met. In Mol. Biology*. 2007. Vol. 420. P. 277–287.
9. Glynn P., Holton J., Nolan C. et al. Neuropathy target esterase: immunolocalization to neuronal cell bodies and axons // Neurosci. 1998. Vol. 83. P. 295–302.
10. Jager R., Fischbach K. Mass histology of adult heads. In: *Drosophila: a laboratory manual* // Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor. 1989. P. 254–259.
11. Johnson M. The target site for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications // Rev. Biochem. Toxicol. 1982. Vol. 4. P. 141–212.
12. Kretzschmar D., Hasan G., Sharma S. et al. The swiss cheese mutant causes glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* // J. Neurosci. 1997. Vol. 17. P. 7425–7432.
13. Lessing D., Bonini N. Maintaining the brain: Insight into human neurodegeneration from *Drosophila* mutants // Nature Rev. Genet. 2009. Vol. 10. P. 359–370.
14. Li Y., Dinsdale D., Glynn P. Protein domains, catalytic activity and subcellular distribution of neuropathy target esterase in mammalian cells // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 8820–8825.
15. Lotti M. The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy // Crit. Rev. Toxicol. 1992. Vol. 21. P. 465–487.
16. Muehlig-Versen M., da Cruz A., Tscha.pe J. et al. Loss of Swiss cheese/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult *Drosophila* // J. Neurosci. 2005. Vol. 25. P. 2865–2873.
17. Nunomura A., Moreira P. I., Lee H. G. Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases // CNS Neuronal Disorder Drug Targets. 2007. Vol. 6. P. 411–423.
18. modEncode project of The National Human Genome Research Institute and Model Organism ENCYClopedia Of DNA Elements – <http://flybase.org/reports/FBgn0003656.html>
19. Tscha.pe J., Hammerschmied C., Muhlig-Versen M. et al. The neurodegeneration mutant lochrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing // EMBO J. 2002. Vol. 21. P. 6367–6376.
20. Wolff T. Preparation of *Drosophila* eye specimens for scanning electron microscopy // Cold Spring Harb. Protoc. 2011. Vol. 11. P. 1383–1385.

21. Wolff T., Ready D. The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave // *Development*. 1991. Vol. 113(3). P. 841–850.
22. Zaccheo O., Dinsdale D., Meacock P., Glynn P. Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 24024–24033.

THE INFLUENCE OF TISSUE SPECIFIC INHIBITION OF SWS GENE EXPRESSION ON *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMPOUND EYE FORMATION

I. Mohylyak*, N. Matiytsiv, Ya. Chernyk

Ivan Franko National University of Lviv

4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: irynamohyliak@yahoo.com

We have determined the influence of tissue specific inhibition of *swiss cheese* gene on formation and functioning of *drosophila melanogaster* compound eye. The presence of functional SWS protein is essential for glia of lamina, and inhibition of SWS translation in optic lobe leads to the strong degeneration phenotype appearance. Comparing to optic lobe, knock out of *sws* only in eye is less deleterious. Further narrowing areas of *sws* inhibition to cone cells of the eye and R7 and R8 photoreceptors, has no visible effect on adult eye and neuropile structure, suggesting that the SWS role in eye is not highly important. This suggestion is also proved by the regular structure of p25 and p45 eye imaginal discs, and intact “biocrystalline” structure of adult flies eyes, with functional inhibition of *sws* gene.

Keywords: Drosophila, neurodegeneration, sws, NTE, Gal4-UAS transgenic expression.

ВЛИЯНИЕ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ ГЕНА SWS НА ФОРМИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ СЛОЖНОГО ГЛАЗА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

И. Могиляк*, Н. Матийців, Я. Черник

Львовский национальный университет имени Ивана Франко

ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

e-mail: irynamohyliak@yahoo.com

Выяснено влияние функционального ингибирования гена *swiss cheese* на формирование и функционирование оптической доли мозга и глаз *D. melanogaster*. Наличие белка SWS имеет важное значение для функционирования ламинарной глии и подавление его трансляции в оптической доли мозга, с помощью Gal4-UAS системы, приводит к тяжелой дегенерации участка ламины с возрастом. Функциональное ингибирование гена *sws* только в тканях глаз имело слабый эффект. При дальнейшем сужении участка подавления трансляции SWS к коническим клеткам глаз и R7 и R8 фосфорорецепторов не удалось обнаружить видимых фенотипических изменений у взрослых особей. Скорее всего, фенотип в глазах был следствием нарушения функционирования глии, поскольку не было зафиксировано изменений в структуре глазных имагинальных дисков куколки или в «кристаллической» структуре глаза взрослых особей исследуемых линий.

Ключевые слова: дрозофила, нейродегенерация, *sws*, NTE, *Gal4-UAS* трансгенная экспрессия.