

ПОШУК ГЕНІВ-КАНДИДАТІВ, ЩО ЗУМОВЛЮЮТЬ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИЙ ФЕНОТИП У МУТАНТІВ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЗА X-ХРОМОСОМОЮ

Н. Матійців*, І. Могиляк, Я. Черник

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: m.n.p@mail.ru

Дегенеративні зміни в мозку часто зумовлені точковими мутаціями в одному гені. Виявлення цих генів, їхніх продуктів і особливостей морфологічних змін у мутантів дає можливість краще зрозуміти природу та механізми нейродегенеративного процесу. Серед семи отриманих нами нейродегенеративних мутантів *Drosophila melanogaster* за X-хромосою жоден не несе мутацію у гені *eggroll*, а мутації 2–14, 61–7, 72–7 та 76–15 були картовані в районі 7D1 X хромосоми і виявились новими алейними формами гена *swiss cheese*.

Ключові слова: дрозофіла, нейродегенерація, *eggroll*, *swiss cheese*.

Зниження надійності механізмів регулювання й адаптивних можливостей організму під час старіння створює умови для розвитку вікових патологій, таких як хвороба Альцгеймера, Паркінсона, Гентінгтона, амілотрофічний боковий склероз, атаксійні синдроми, пріонові захворювання та ін., які призводять до фізичних, розумових розладів і смерті пацієнта. Оскільки в основі зазначених патологічних станів лежать нейродегенеративні процеси, важливим є вивчення їхньої молекулярної та генетичної природи.

Дослідження впродовж останнього десятиліття доводять [12, 19, 24], що модельний об'єкт *Drosophila melanogaster* можна успішно використовувати для дослідження молекулярних основ нейродегенерації, генетичних аспектів вікових змін, формування та функціонування структур центральної нервової системи. Наразі описано [13] близько двадцяти нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*. Деякі з описаних генів дрозофіли, які задіяні у розвитку дегенеративних змін, є ортологами генів людини, а патологічні зміни в структурі мозку за морфологічними, біохімічними та функціональними характеристиками подібні до останніх у хворих пацієнтів.

Так, у мутанта дрозофіли *eggroll* спостерігаються щільні багаточарові утворення в мозку, які нагадують структури, що формуються при хворобах ліпідного накопичення, таких як хвороба Тея-Сакса [15]; для мутантів *sws* характерне надлишкове обгортання нейронів клітинами глії, що призводить до нейродегенерації так само, як і у випадку деяких спадкових нейропатій людини [18].

Матеріали та методи

Матеріалом досліджень слугувала *D. melanogaster*; мухи утримувались при температурі 25°C на стандартному середовищі [3]. Синхронізацію культури та відбір віргінних самок проводили згідно із загальноприйнятими методиками [4, 20]. Для комплементарного аналізу використовували нейродегенеративні лінії, отримані в ході індукованого етилметансульфонатом (ЕМС) мутагенезу [1], а саме 76–15, 722, 72–7, 61–7, 2–14, 60–15, 60–16. Комплементарний аналіз зводився до отримання транс-гетерозигот за рецесивними мутаціями, що визначають одну ознаку; проводили реципрокні схрещування

мутантних особин [3]. Для цитологічного картування використовували лінії: 949-Df[1] C128/FM6; 950-Df[1]RA1/FM7c1; та 1015-[*sws^{offE}*], отримані з Bloomington Drosophila Stock Center.

Фенотип структури мозку визначали у особин 20-денного віку на гістологічних препаратах, які виготовляли за стандартною методикою [10]. Препарати аналізували в ультрафіолетовому світлі на мікроскопі Laboval-3 Carl Zeiss Jena при збільшенні 15x40.

Результати і їхнє обговорення

Спадкові нейродегенеративні хвороби характеризуються пізнім проявом і постійним прогресуванням. Їхнє вивчення ускладнюється тим, що зразки тканин на різних стадіях, особливо на початку перебігу хвороби, отримати важко, ще складніше дослідити молекулярно-генетичну природу цих змін. Останнє десятиліття досліджень нейродегенерації у модельних об'єктах підтвердило важливу роль вивчення цих процесів у *D. melanogaster* [5, 8, 13]. Еволюційно високо організована нервова система, короткий період генерації, можливість протягом нетривалого часу провести пошук нових мутацій, наявність багатьох генів ортологів людини доводять доцільність пошуку та вивчення генетично зумовленої дегенерації мозку у *D. melanogaster*.

Для отримання нових мутацій, які би приводили до появи змін у тканині мозку, був використаний алкілюючий агент ЕМС, який із високою частотою спричиняє точкові мутації в геномі *D. melanogaster* [3, 9]. Для одержання нейродегенеративних мутантів можливо було використати і Р-інсерційний мутагенез, оскільки цей метод більш зручний для подальшого картування нових мутацій, однак відомо, що він дає змогу охопити не більше 25% геному дрозофіли [21]. Крім того, у більшості випадків мутагенний ефект зумовлений не стільки інсерцією Р елемента, скільки перебудовами, які він спричиняє, вбудовуючись переважно поблизу сайтів ініціації транскрипції [11], тоді як мутагенна дія ЕМС полягає в індукуванні транзицій, трансверсій і зрідка делецій невеликого розміру та дає змогу отримати широкий спектр мутацій у будь-якій ділянці геному дрозофіли.

Отримані мутації були локалізовані в Х-хромосомі та розділені на 4 групи комплементарності [1]. У даній роботі ми використали лінії, що належали до 1 та 2 груп і мали фенотип тканини мозку, подібний до описаної мутації *swiss cheese (sws)* (рис. 1). Показано [12], що у мутантів *sws* мозкові дефекти виявлялись у формуванні вакуолей у всіх мозкових структурах і в розвитку гіперобгортання нейронів гліальними клітинами. Продукт цього гена – трансмембранний білок ендоплазматичного ретикулуму, що володіє естеразною активністю, задіяний у регулюванні метаболізму фосфатидилхоліну та у мієлінізації нейронів [17].

Локалізацію точкових нейродегенеративних мутацій починали з виявлення ділянки хромосоми, яка несе досліджувану мутацію. Таку локалізацію здійснювали за допомогою тестерних делеційних ліній, у яких точно встановлені розмір і цитологічне розміщення делеції [22]. Подібний підхід допомагає окреслити гени-кандидати для подальшого вивчення. Проводили схрещування самців нейродегенеративних мутантів зі самками лінії, що несла делецію у певному районі Х-хромосоми. Фенотиповий аналіз тканини мозку здійснювали у гетерозиготних самок 20-денного віку, аналізували не менше 10 особин.

Лінія 950 Df(1)RA2/FM7c, яка містила делецію ділянки 7D10, була використана дослідниками Міном і Бензером [14] для картування рецесивної мутації *eggroll*. Мутантні особини *eggroll* характеризувались дегенерацією клітин мозку, яка до 4–5-денного віку імаго широко розповсюджувалась, вражаючи кортекс, ламіну, медулу, лобулу та центральну частину мозку. У процесі старіння у мух *eggroll* в районі нейропілу з'являлися різного

роду багаточарові включення, що нагадували аналогічні структури у мозку людей, хворих на певні нейродегенеративні захворювання [6]. Одержані нами результати схрещувань, а саме поява нормального фенотипу у гетерозигот першого покоління від усіх схрещувань з лінією 950, свідчать про те, що проаналізовані мутанти не несуть мутації в гені *eggroll* (див. таблицю).

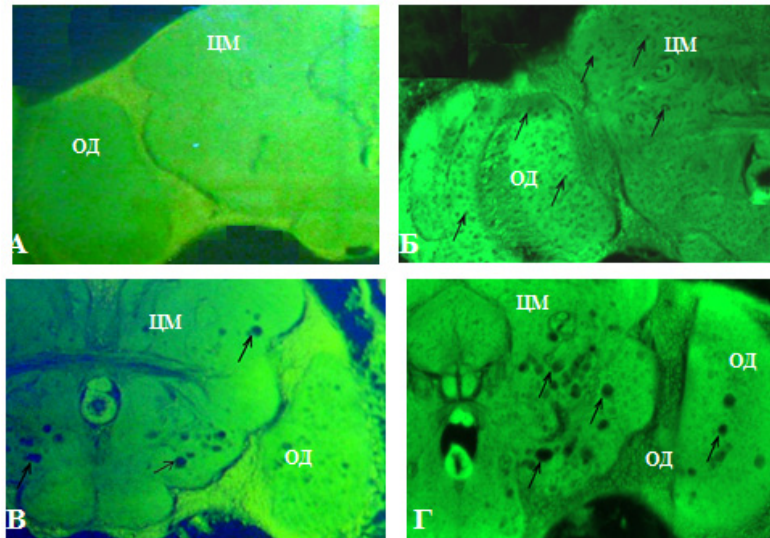


Рис. 1. Фенотип тканини мозку *D. melanogaster*: А – 20-денних особин лінії *Oregon-R*; Б – мутанта 76–15; В – *sws*-подібний фенотип 20-денних особин лінії 72–7; Г – 20-денних особин лінії 72–7: ЦМ – центральний мозок, ОД – оптична доля, стрілки – вакуолізація тканини внаслідок проходження апоптозу нейронів. Парафінові гістологічні 7 мкм зрізи в ультрафіолетовому світлі.

Виявлено, що гетерозиготні особини від схрещування чотирьох ліній зі структурними змінами тканини мозку, а саме 2–14, 61–7, 72–7 та 76–15 з тестерною лінією 949 проявляли мутантний фенотип, як і лінія *sws^{olf}*.

Ми припустили, що вказані чотири лінії, одержані в нашій лабораторії, містять мутацію в одній із делеційних ділянок, які несе тестерна лінія – а саме – 7D1 та 7D5 Х-хромосоми (рис. 2). Згідно з інформацією, представленою у базі даних FlyBase [7], за допомогою делеції Df(1)C128, яку несе лінія 949, можна локалізувати 7 мутацій: *female sterile (1) homoeotic (fs(1)h)*, *singed (sn)*, *myospheroid (mys)*, *Tyramine β hydroxylase (Tbh)*, *sws*, *lethal (1) 7Da (l(1)7Da)*, *taxi-like (txl)*. Дані гени було картовано у таких районах Х-хромосоми: *sws* – 7D1, *Tbh* – 7D2, *sn* – 7D1 – 2, *fs(1)h* – 7D3 – 05, *mys* – 7D5, *l(1)7Da* – 7D5, *txl* – 7D1 – 05. Функції всіх зазначених генів і їхніх продуктів добре вивчені й описані [16, 20, 25], лише гени *l(1)7Da* та *txl* не секвеновані [7].

Результати схрещувань нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster* з делеційними лініями (n=2)

Лінії	2–14	60–15	60–16	61–7	72–2	72–7	76–15	<i>sws^{olf}</i>
949	М	Н	Н	М	Н	М	М	М
950	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н

Н – нормальний фенотип; М – мутантний фенотип.

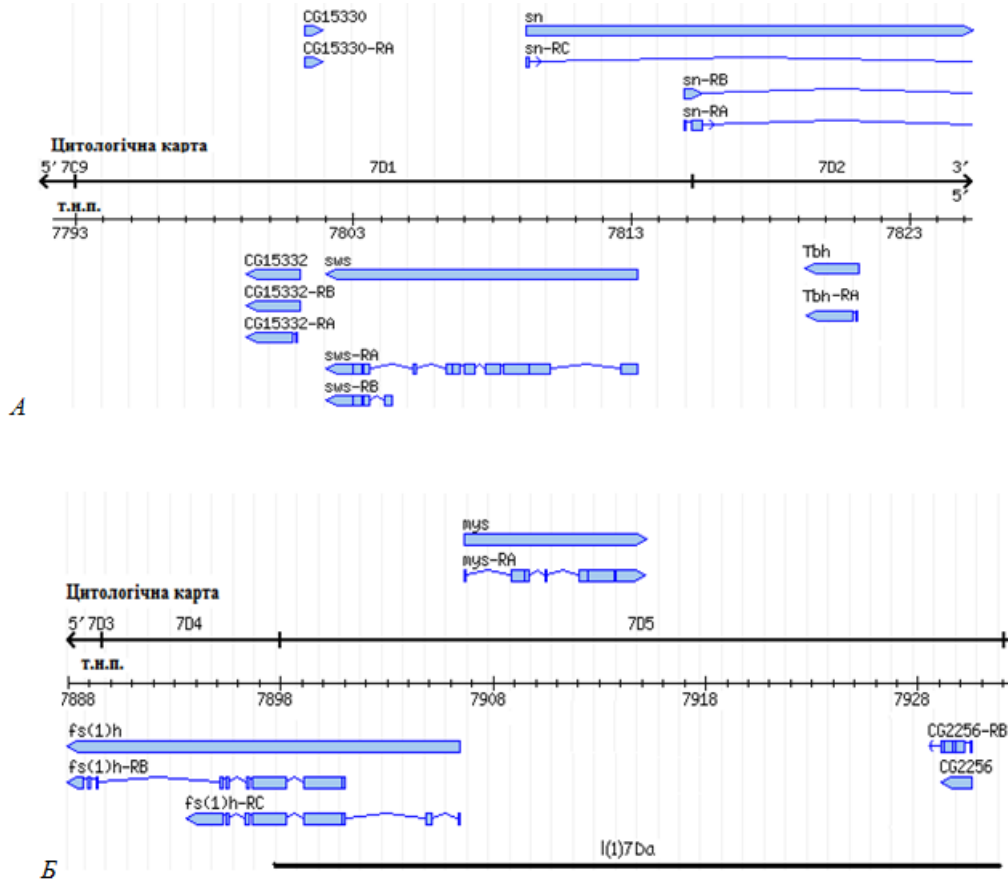


Рис. 2. Райони цитологічної карти Х-хромосоми *D. melanogaster*: А – 7D1; Б – 7D5.

Більшість цих генів не пов'язані з функціонуванням нервової системи. Однак відомо, що мутація в гені *sws* зумовлює структурні зміни у тканині мозку дрозофіли, а продукт гена *mys* необхідний для нормального функціонування рецепторів, і мутація в цьому гені зумовлює поведінкові зміни, зокрема зміни рухової активності [23]. Результати картування та комплементарного аналізу ліній 2–14, 61–7, 72–7 та 76–15 [2] корелюють між собою та дають підстави припустити, що ці мутації представлені алельними формами гена *sws*.

Таким чином, шляхом делеційного картування було виявлено ділянки Х-хромосоми, в яких слід картувати окремі мутації нашої колекції. Використання інформації з бази даних FlyBase про локалізацію, функціональні та фенотипові характеристики окремих мутацій дрозофіли дає змогу окреслити гени-кандидати для подальшого більш детального вивчення окремих ліній.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Матійців Н., Максимів Д. Генетичний аналіз нейродегенеративних Х-зчеплених мутантів *Drosophila melanogaster* групи *sws* // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. праць. К.: Логос, 2007. Т. 1. С. 276–280.
2. Щербата Г. Р., Матійців Н. П., Черник Я. И. и др. Генетический анализ нейродегенеративных мутантов *Drosophila melanogaster* по Х-хромосоме, индуцированных

- этилметансульфонатом и нитрозоэтилмочевиной // Генетика. 2004. Т. 40. № 9. С. 1286–1292.
3. 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 // Sci. 2002. Vol. 295. P. 865–868.
 4. Ausubel F. M. Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, 1990. Vol. 2. 534 p.
 5. Cha G-H., Kim S., Park J., Lee E. et al. Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of *Drosophila* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. N 29. P. 10345–10350.
 6. Driscoll M., Gerstbrein B. Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration // Nature Reviews. 2003. Vol. 4. P. 181–193.
 7. Fly Base – The *Drosophila* Database. Available from the flybase. bio.indiana.edu network server and Gopher site and at URL <http://flybase.bio.indiana.edu> // Nucleic Acids Res. 2010.
 8. Glynn P. Axonal degeneration and neuropathy target esterase // Arh. Hig. Rada. Toksikol. 2007. Vol. 58. P. 355–358.
 9. Grishin N. V., Phillips M. A. The subunit interfaces of oligomeric enzymes are conserved to a similar extent to the overall protein sequences // Protein Sci. 1994. Vol. 3. P. 2455–2458.
 10. Henderson K. D., Andrew D. J. Identification of a novel *Drosophila* SMAD on the X-chromosome // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. Vol. 252. N 1. P. 195–201.
 11. Kitada T., Asakawa S., Hattori N. et al. **Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism** // Nature. 1998. Vol. 392. P. 605–608.
 12. Kretzschmar D. Neurodegenerative mutants in *Drosophila*: a means to identify genes and mechanisms involved in human disease? // Invert. Neurosci. 2005. Vol. 3. P. 97–109.
 13. Kretzschmar D., Hasan G., Sharma S., Heisenberg M. The *swiss cheese* mutant cause glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* // J. Neurosci. 1997. Vol. 17. N 19. P. 7425–7432.
 14. Min K. T., Benzer S. Spongecake and eggroll: the hereditary disease in *Drosophila* resemble pathern of human brain degeneration // Curr. Biol. 1997. Vol. 7. P. 885–888.
 15. Mintseris J., Weng Z. **Structure, function, and evolution of transient and obligate protein–protein interactions** // PNAS. 2005. Vol. 102. N 3. P. 10930–10935.
 16. Monastirioti M., Limn C. E., White K. Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamin // J. Neurosci. 1996. Vol. 16. N 12. P. 3900–3911.
 17. Mühlig-Versen M., da Cruz A.B., Tschäpe 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.
 18. Muñoz-Soriano V., Paricio N. Overexpression of Septin 4, the *Drosophila* homologue of human CDCrel-1, is toxic for dopaminergic neurons // Eur. J. Neurosci. 2007. Vol. 26. P. 3150–3158.
 19. Nassel D. R., Elekes K. Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship whith putative histaminergic neurons // Cell Tissue Res. 1992. Vol. 267. P. 147–167.
 20. 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.
 21. Squier T. C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging // Exp. Gerontol. 2001. Vol. 36. P. 1539–1550.
 22. Trudy F., Macay C. Quantitative trait loci in *Drosophila* // Genetics. 2001. Vol. 2. P. 11–21.

23. Walsh E. P., Brown N. H. A screen to identify *Drosophila* genes required to integrin-mediated adhesion // *Genetics*. 1998. Vol. 150. N 2. P. 791–805.
24. Wright M. M., Howe A. G., Zarembek V. Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues // *Biochem. Cell Biol.* 2004. Vol. 82. P. 18–26.
25. Zheng X., Wang J., Haerry T. E., Wu A. Y. TGF-beta signaling activates steroid hormone receptor expression during neuronal remodeling in the *Drosophila* brain // *Cell*. 2003. Vol. 112. P. 303–315.

Стаття: надійшла до редакції 30.06.11

прийнята до друку 20.09.11

SCREENING FOR GENES THAT CAUSE NEURODEGENERATIVE PHENOTYPE IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* MUTANTS BY X-CHROMOSOME

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

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: m.n.p@mail.ru*

Degenerative changes in the brain often are caused by the point mutations in single genes. Determination of these genes, their products and features of the morphological changes in mutants gives an opportunity for better understanding of nature and mechanisms of neurodegenerative processes. We have obtained seven lines of *Drosophila melanogaster* neurodegenerative mutants by X-chromosome. There was no *eggroll* mutant among those lines, and mutations 2-14, 61-7, 72-7 and 76-15 were mapped in 7D1 region of X chromosome, and they seems to be a new allelic forms of *swiss cheese* gene.

Key words: drosophila, neurodegeneration, *eggroll*, *swiss cheese*.

ПОИСК ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ, КОТОРЫЕ ПРИВОДЯТ К НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОМУ ФЕНОТИПУ У МУТАНТОВ *DROSOPHILA* *MELANOGASTER* ПО X-ХРОМОСОМЕ

Н. Матийців*, И. Могиляк, Я. Черник

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: m.n.p@mail.ru*

Дегенерационные изменения в мозге часто являются последствием точечных мутаций в одном гене. Выявление этих генов, их продуктов и особенностей морфологических изменений у мутантов дает возможность лучше понимать природу и механизмы нейродегенерационного процесса. Среди семи полученных нами нейродегенерационных мутантов *Drosophila melanogaster* по X-хромосоме ни один не несет мутации в гене *eggroll*, а мутации 2-14, 61-7, 72-7 и 76-15 были картированы в районе 7D1 X-хромосомы и являлись новыми аллельными формами гена *swiss cheese*.

Ключевые слова: дрозофила, нейродегенерация, *eggroll*, *swiss cheese*.