

УДК 595.773.4:575'113'224.4:591.139

**ВПЛИВ ГЕНІВ-МОДИФІКАТОРІВ *DAD* І *TKV* НА ФЕНОТИПОВИЙ ПРОЯВ
МУТАЦІЙ ГЕНА ДИСТРОФІНУ У *DROSOPHILA MELANOGASTER***

В. Рішко, О. Побережник, М. Кучеренко, Н. Голуб, Д. Максимів, Я. Черник

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

Гени *Dad* та *tkv* належать до групи генів, задіяних у Dpp-сигнальному шляху. Для вивчення їх впливу на функціонування гена дистрофіну *Drosophila melanogaster* одержано особини, що в одному організмі містили досліджуваний ген-модифікатор і генетичну конструкцію для ін-активації гена дистрофіну. В результаті аналізу таких гібридів виявлено відновлення структури вен крила, порушення якої є характерною ознакою мутантів за геном дистрофіну. Пенетрантність прояву досліджуваних генів-модифікаторів становила 30,5–48,5% у потомків від схрещування лінії *Dad* з мутантами за геном дистрофіну та 2–8% у особин від схрещування лінії *tkv* з тими ж мутантами. Також показано, що гени *Dad* і *tkv* зумовлюють часткове відновлення структури м'язів тораксу. Ген *Dad* виявився більш активним супресором мутантного дистрофінового фенотипу порівняно з геном *tkv*.

Ключові слова: дрозофіла, дистрофін, гени-модифікатори, *Dad*, *tkv*.

З'ясування причин і механізмів виникнення м'язових дистрофій у людини є однією з найактуальніших проблем біології та медицини, оскільки такі захворювання належать до категорії невиліковних. В основі їхнього розвитку лежать порушення у структурі та функціонуванні дистрофін-глікопротеїнового комплексу (ДГК).

ДГК виявлений у різних типах клітин. Основною його функцією є передача сигналів із позаклітинного простору всередину клітини [9].

У людини описано кілька видів міопатій. Серед них найважчою є м'язова дистрофія Дюшена, яка спричинює поступову деградацію м'язів. Це захворювання трапляється з частотою 1:3500 і вражає, головно, чоловіків. В осіб, які страждають від цієї хвороби, деградація м'язів починається у віці від 6 років і прогресує до смерті, яка настає в молодому віці. Причиною розвитку цього захворювання найчастіше є делеції в гені дистрофіну, який міститься в X-хромосомі. Дистрофін є складовою частиною ДГК [8].

На жаль, на даний час мало відомо про молекулярні механізми, які спричинюють розвиток міопатій. М'язові дистрофії супроводжуються не лише деградацією м'язів, але часто і порушеннями у функціонуванні структур головного мозку. На сьогодні такі захворювання лікуються лише симптоматично. Для часткової корекції гена дистрофіну у людей із м'язовою дистрофією Дюшена (МДД) та Беккера (МДБ) застосовують генотерапевтичні підходи [8].

Метою роботи було дослідити здатність генів *Dad* і *tkv* *D. melanogaster* впливати на мутантний фенотип за геном дистрофіну у ліній *tg6* та *tg4*.

Матеріалом досліджень служили високоінбредні лабораторні лінії *Drosophila melanogaster*, отримані з університету Дж. Вашингтона (м. Сіетл, США): *tg4 (tg4tubGal4/TM6B,Tb)*, *tg6 (dsDys(tg6)tubGal4/TM6B,Tb)*. Дані лінії були сконструйовані з використанням антисенс-РНК до N- та до C-кінця мРНК дистрофіну [9]. Лінія *tg6* ха-

рактизується відсутністю синтезу усіх ізоформ дистрофіну на 70%, тоді як у лінії tg4 синтезуються лише короткі ізоформи. Також було використано лінії Dad (*Dad*[j1E4]/*TM6B, Tb*), *tkv* (*tkv*[16713]/*Cy0*) і лінія дикого типу Oregon.

Для дослідження тривалості життя мух дикого типу та досліджуваних мутантних ліній проводився тест на виживання з подальшою побудовою і аналізом кривих виживання. Для цього самців віком одна-дві доби розсаджували у дрозозильні стаканчики по 10 імаго в кожному. Кожен із варіантів експерименту включав по 10 повторів (стаканчиків), у яких в сукупності налічувалося по 100 комах. Підрахунок живих мух і пересадку на свіже поживне середовище проводили раз у 3 дні без ефіризації. Після закінчення експерименту визначали показники середньої тривалості життя (СТЖ) і максимальної тривалості життя (МТЖ). Показники середньої тривалості життя визначали за такими параметрами: S_{75} – термін (у добах), на котрий залишаються живими 75% мух; S_{50} – 50% мух; S_{25} – 25% мух. Виготовлення гістологічних препаратів м'язів тораксу *D. melanogaster* проводили згідно з методикою Хейзенберга і Боля [5]. Фарбування препаратів зрізів тораксу гематоксилін-еозином здійснювали згідно з методикою Майєра [1]. Отримані препарати аналізували у видимому світлі з використанням об'єктива 20– і 40-кратного збільшення на мікроскопі Loboval 3 Carl Zeiss – Jena. Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням функцій і пакету аналізу даних програми Microsoft Excel.

Хорошим модельним об'єктом для дослідження молекулярно-генетичних основ виникнення міопатій є *D. melanogaster*. Попередні дослідження виявили, що у дрозозіли наявні гомологи всіх компонентів, які входять до складу дистрофін-глікопротеїнового комплексу; при цьому вони проявляють високий ступінь подібності до відповідних структур людини [1, 3, 9]. У той же час було визначено 37 генів, які можуть виступати модифікаторами функціонування ДГК [6]. Це гени, задіяні у функціонуванні м'язів і цитоскелета (*Cam*, *nAcRa-30D*); міграції нейронів і визначенні клітинної полярності (*sema*, *sli*, *robo*); залучені у Notch(*notch*); Dpp(*Dad*, *tkv*, *dpp*); EGFR (*kek*, *argos*) сигнальних шляхах, а також гени *posh*, *kis*, *gam*, *vimar* [6].

Гени *Dad* і *tkv* Dpp-сигнального шляху задіяні в морфологічних процесах. Dpp-сигнальний шлях контролює формування імагінальних дисків дрозозіли. Градієнт білка Dpp відповідає за індукцію дорзо-вентральної полярності тіла дрозозіли, а також бере участь у морфогенезі крила [2]. У клітинах, які несуть рецептори до білка Decapentaplegic (Dpp), залежно від його концентрації, відбувається експресія генів, що відповідають за правильне утворення імагінальних дисків і подальше формування пластинки крила дрозозіли. Одним із таких рецепторів для морфогену Dpp є продукт гена *tkv* (*Thickveins*), який є посередником у трансдукції Dpp-сигналів у клітину. Мутації в гені *tkv* мають такий самий ефект, як і мутації у гені *dpp*, що свідчить про неможливість Dpp-сигналювання за відсутності рецепторів до білка Dpp. Продукт гена *Dad* є негативним регулятором Dpp-сигнального шляху. При високій концентрації білка Dpp у позаклітинному просторі цей сигнальний шлях здатен самоінгібуватися за рахунок синтезу білка *Dad*. Крім того, Dpp – сигнальний шлях, задіяний у каскадному процесі формування вен крила, а саме у визначенні місця, де можуть сформуватися вени [2].

У *Drosophila* під час розвитку крила формуються п'ять поздовжніх вен L1, L2, L3, L4, L5 та дві поперечні – передня (ACV) і задня (PCV) (рис. 1, А). Для лінії дикого типу Oregon характерною є завершеність поперечних жилок: ACV з'єднує L3 та L4, PCV – L4 та L5. У мутантів tg4 та tg6 розвиток PCV відбувається з порушенням і спри-

чиняє формування вени, яка не торкається поздовжніх вен і може галузитися, крім того, можуть утворюватися додаткові жилки над L2 (рис. 1, Б, В) [6]. Цей фенотип спостерігали з частотою $0,961 \pm 0,015$ у особин лінії *tg4* та з частотою $0,89 \pm 0,027$ у мутантів *tg6* (табл. 1).

Для аналізу модифікуючого впливу генів *Dad* і *tkv* Dpp-сигнального шляху на мутантний фенотип за геном дистрофіну було проведено схрещування ліній *Dad* та *tkv*, що містили додаткові копії генів-модифікаторів, з мутантами за геном дистрофіну. Як контроль використано вихідні лінії та лінію дикого типу Oregon. Серед потомків першого покоління отримано кілька генотипових класів. Із них відбирали особин з потрібним генотипом, тобто таких, які в одному організмі містили конструкцію, що блокує трансляцію дистрофіну, і одночасно ген-модифікатор. Аналізували таких потомків за фенотипом жилкування вен крила (рис. 2, табл. 1).

Так, від схрещування ліній *Dad*×*tg4* у першому поколінні було отримано 154 особини з потрібним генотипом, із них у 47 особин спостерігалось відновлення задньої поперечної вени крила (табл. 1, рис. 2, А). Частота таких потомків становила $0,305 \pm 0,037$. Серед потомків від схрещування ліній *Dad*×*tg6* було відібрано 132 особини з потрібним генотипом, 64 особини з яких мали відновлені вени крил (частота появи $0,485 \pm 0,043$) (рис. 2, Б). Серед 100 потомків від схрещування *tkv*×*tg4* було отримано 8 особин з відновленими венами крил (частота появи $0,08 \pm 0,027$). Від схрещування ліній *tkv*×*tg6* у першому поколінні отримали 100 гібридів з потрібним генотипом, із яких лише 2 характеризувалися відновленим фенотипом (частота появи $0,02 \pm 0,014$).

Отже, гени *Dad* та *tkv* певним чином супресують мутантний фенотип за геном дистрофіну. Досліджувані гени-модифікатори проявляють неповну пенетрантність. Так, пенетрантність гена *Dad* становила 30,5–48,5%, пенетрантність гена *tkv* у потомків від схрещувань ліній *tkv*×*tg4* – 8%. Було виявлено, що ген *tkv* у особин від схрещування ліній *tkv*×*tg6* не має супресорної сили і навіть спричиняє появу особин із відновленим фенотипом з нижчою (2%) частотою, ніж у вихідній лінії (11%). Отже, отримані дані свідчать про те, що значно активнішим супресором мутантного фенотипу за геном дистрофіну за венами крил є ген *Dad*. Крім того, у частини мутантів першого покоління від схрещування ліній *Dad* із лініями *tg4* та *tg6* виявлено появу додаткових жилок (у 45 особин серед 154 потомків від схрещування ліній *tg4*×*Dad* і у 12 особин зі 132 від схрещування *tg6*×*Dad*), що свідчить про підсилення мутантного фенотипу (рис. 3, А, Б). Тобто гени *Dad* і *tkv* модифікують прояв жилкування крил шляхом як посилення мутантного, так і відновлення нормального фенотипу.

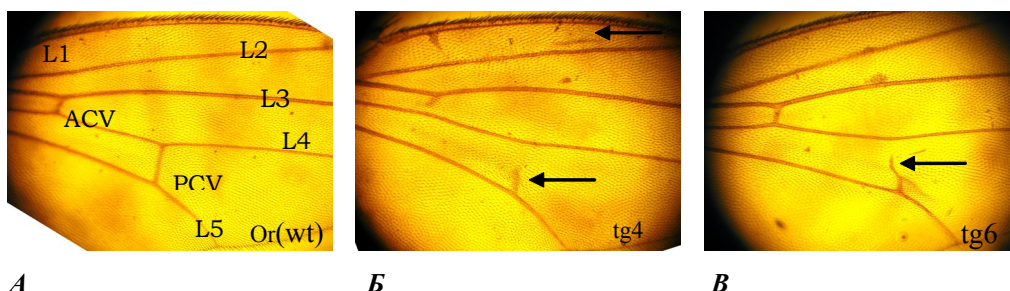


Рис. 1. Вени крила лінії дикого типу Oregon (А) і мутантів за геном дистрофіну – *tg4* (Б) та *tg6* (В). А – L1, L2, L3, L4, L5 – поздовжні вени, ACV та PCV – передня та задня поперечні вени, відповідно. Б, В – Стрілками позначено дефекти задньої поперечної вени крила (PCV) та додатково утворену вену над L2.

Таблиця 1

Аналіз потомків першого покоління за фенотипом вен крила

F1	К-сть проаналізованих потомків	К-сть особин з мутацією і геном модифікатором	К-сть особин з нормальним фенотипом	Частота особин з мутантним фенотипом	Частота особин з нормальним фенотипом
Контроль tg4	154	154	6	0,961±0,015	0,039±0,015
Dad×tg4	550	154	47	0,695±0,037	0,305±0,037***
tkv×tg4	352	100	8	0,92±0,027	0,08±0,027*
Контроль tg6	132	132	15	0,89±0,027	0,11±0,027
Dad×tg6	438	132	64	0,515±0,043	0,485±0,043***
tkv×tg6	360	100	2	0,98±0,014	0,02±0,014***

Примітка. * – Вірогідність $p \geq 0,95$, низька наявність ефекту (відновлення вен) порівняно з відповідним контролем. *** – Вірогідність $p \geq 0,999$, статистично достовірна наявність ефекту (у особин від схрещування ліній tkv×tg6 відсутність ефекту) порівняно з відповідним контролем.

Відомо, що мутації в гені дистрофіну спричиняють у дрозофіли не тільки зміни полярності вен крила, але й скорочення тривалості життя та порушення структури м'язів [6]. Тому ми надалі дослідили виживання та параметри тривалості життя, а також структуру м'язів у мух зі супресією мутантного фенотипу.

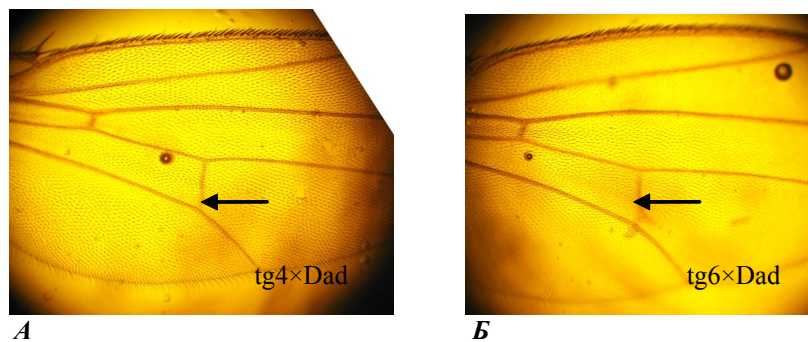


Рис. 2. Відновлення задньої поперечної вени PCV у особин першого покоління від схрещування: А – ліній tg4×Dad. Б – ліній tg6×Dad. Стрілками позначено відновлені задні поперечні вени крила (PCV).

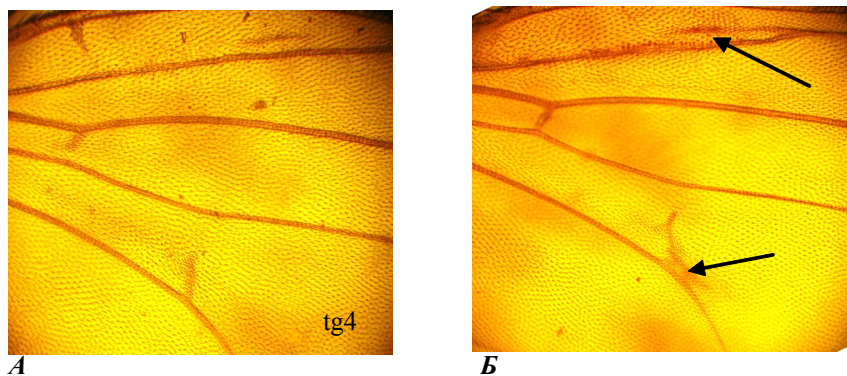


Рис. 3. Вени крила у особин першого покоління від схрещування Dad×tg4 (Б) порівняно з вихідною лінією tg4 (А). Стрілками позначено додаткові вени крила.

Було очевидним припустити, що оскільки ген *Dad* є значно активнішим супресором одного з фенотипових проявів мутацій гена дистрофіну (порушення вен крил), ніж ген *tkv*, то цей ген міг би позитивно впливати і на інший фенотиповий прояв – відновлювати порушену структуру м'язів. Було проведено аналіз гістологічних зрізів тораксу особин першого покоління від схрещування ліній *tg6* і *tg4* з мухами лінії *Dad*, які характеризуються відновленим фенотипом вен крила. Зрізи виготовляли на 12-й день після вильоту імаго. Відомо, що помітна дегенерація м'язів у мух з пошкодженим геном дистрофіну розвивається саме на 12-й день життя дорослих особин *D. melanogaster* [9]. У особин ліній *tg4* і *tg6* спостерігаються дефекти у структурі м'язів (рис. 4, Б, В). Як видно з рис. 4, у м'язах мутантів за геном дистрофіну відбувається локальна втрата щільності м'язових волокон і вакуолізація, що не характерно для особин дикого типу лінії Oregon цього ж віку (рис. 4, А). Ці лінії служили контролем у дослідженні впливу генів *Dad* і *tkv* на структуру м'язів у мутантів за геном дистрофіну.

Як видно з рис. 5, у м'язах тораксу особин першого покоління від схрещування ліній *Dad*×*tg4* та ліній *Dad*×*tg6* з відновленими венами крил спостерігалася часткове

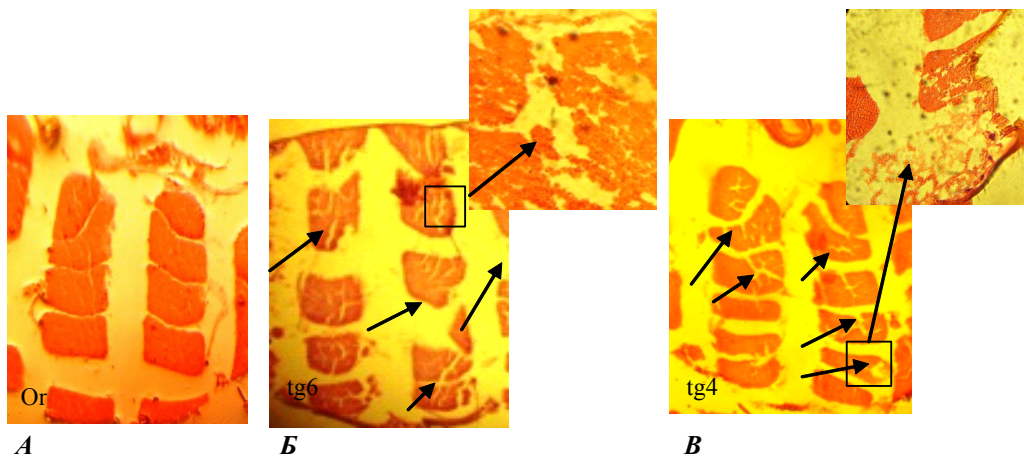


Рис. 4. Гістологічні зрізи непрямих літальних м'язів *D. melanogaster* ($\times 200$, $\times 400$). А – м'язи мух лінії дикого типу Oregon, Б і В – м'язи мутантів за геном дистрофіну – *tg6* та *tg4*, відповідно. Стрілками позначено дефекти у структурі м'язів - втрата щільності, вакуолізація.

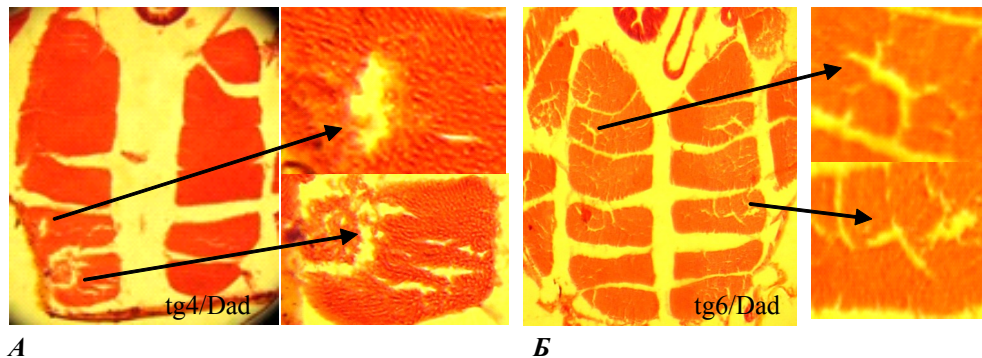


Рис. 5. Гістологічні зрізи непрямих літальних м'язів особин першого покоління від схрещувань ($\times 200$, $\times 400$): А – *tg4*×*Dad*, Б – *tg6*×*Dad*. Стрілками позначено дефекти у структурі м'язів - втрата щільності, вакуолізація.

відновлення структури м'язів. Отже, продукт гена *Dad* може супресувати фенотиповий прояв мутацій дистрофіну за венами крил і частково відновлювати структуру м'язів.

Побудовано криві виживання та проаналізовано параметри тривалості життя (рис. 6) (табл. 2) особин першого покоління від схрещувань *tg4*×*Dad*, *tg6*×*Dad*, *tg4*×*tkv*, *tg6*×*tkv* з метою перевірки здатності продуктів генів *Dad* і *tkv* впливати на тривалість життя особин, мутантних за геном дистрофіну. Як контроль використано лінію дикого типу Oregon та вихідні лінії. При аналізі кривих виживання особлива увага приділяється плато на кривій, наявність якого вважається характерною ознакою нормального старіння, а закінчення плато і перегин кривої свідчать про інтенсивне відмирання особин [7]. Особливо важливими є показники середньої тривалості життя (СТЖ), високі значення яких свідчать про підтримання періоду активної життєздатності.

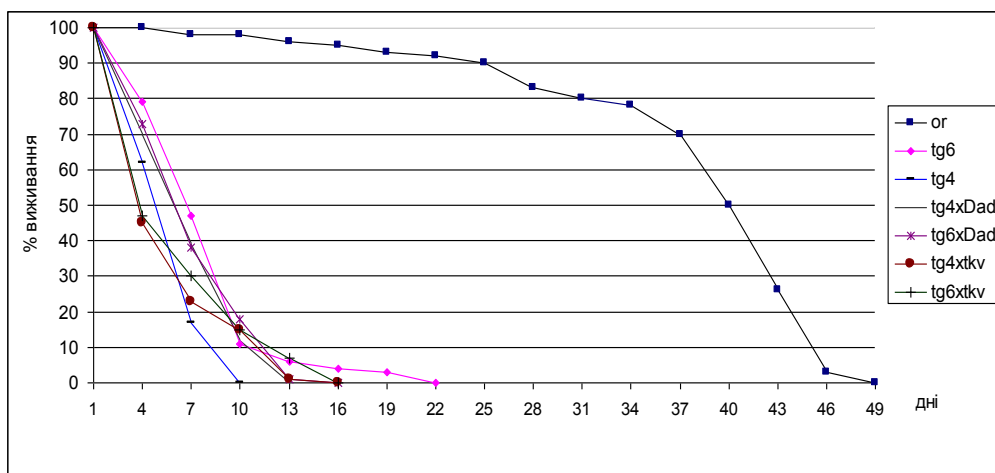


Рис. 6. Криві виживання особин першого покоління від схрещувань *tg4*×*Dad*, *tg6*×*Dad*, *tg4*×*tkv*, *tg6*×*tkv*, порівняно з вихідними лініями та лінією дикого типу Oregon.

Як видно з рис. 6, у лінії дикого типу Oregon є чітке плато на кривій виживання, спад кривої спостерігається після 23-го дня життя імаго. Показники СТЖ становлять відповідно: $S_{75} - 35,2 \pm 0,4$ доби, $S_{50} - 40,3 \pm 0,2$ доби, $S_{25} - 44,0 \pm 0,3$ доби (табл. 2). Максимальна тривалість життя (МТЖ) дорівнювала $45 \pm 0,4$ діб. Мутантні лінії *tg4* і *tg6* характеризувалися значно нижчими параметрами тривалості життя. Так, у них не спостерігалось плато на кривих виживання, особини масово відмирили вже на 2–4 день, а показники СТЖ становили: $S_{75} - 3-4$ доби, $S_{50} - 5-7$ діб та $S_{25} - 6-8$ діб, МТЖ у даних ліній досягала 10–22 діб. Такі ж низькі параметри тривалості життя і відсутність плато на кривих виживання були у потомків першого покоління від схрещувань *Dad*×*tg4*, *Dad*×*tg6* ($S_{75} - 3-4$ доби, $S_{50} - 6$ діб, та $S_{25} - 8-9$ діб, МТЖ – 13–16 діб). Трохи нижчі параметри тривалості життя були у особин від схрещувань *tkv*×*tg4*, *tkv*×*tg6* ($S_{75} - 2$ доби, $S_{50} - 3$ доби, та $S_{25} - 7-8$ доби, МТЖ – 13–16 діб).

Отже, мутанти за геном дистрофіну характеризувалися швидким відмиранням особин та значно зниженими показниками як СТЖ, так і МТЖ порівняно з лінією дикого типу Oregon. Додаткова копія генів *Dad* та *tkv* не виявила позитивного впливу на тривалість життя мух, мутантних за геном дистрофіну, оскільки виживання особин не збільшувалося і показники ТЖ не зростали.

Таблиця 2

Параметри тривалості життя особин першого покоління від схрещувань мутантів за геном дистрофіну з лініями, що містять ген-модифікатор

Лінії	СТЖ, доби			МТЖ (доби), М±m
	S ₇₅ , М±m	S ₅₀ , М±m	S ₂₅ , М±m	
Oregon	35,2±0,4	40,3±0,2	44±0,3	45±0,4
tg6	4,4±0,2	7,1±0,2	8,1±0,3	21,8±0,4
tg4	3,3±0,6	5,1±0,5	6,3±0,6	10,0±0,7
Dad×tg4	3,2±0,4	6,3±0,3	8,0±0,4	13,3±0,5
Dad×tg6	3,9±0,3	6±0,2	9,2±0,3	16,1±0,4
tkv×tg4	2,0±0,7	3,3±0,8	7,2±0,7	16,0±0,9
tkv×tg6	2,1±0,5	3,4±0,7	8,0±0,6	16,0±0,7

Отже, гени *Dad* і *tkv* модифікують фенотип за геном дистрофіну за венами крил (пенетрантність генів становить 30,5–48,5% і 2–8% відповідно) та за структурою м'язів тораксу. Ген *Dad* виявився більш активним супресором порівняно з геном *tkv*.

1. Волкова О. В., Елецький Ю. К. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина, 1971. 272 с.
2. Affolter M., Marty T., Vigano M. A., Jaszwinska A. Nuclear interpretation of Dpp signaling in *Drosophila* // EMBO J. 2001. Vol. 20. P. 3298–3305.
3. Davies K. E., Nowak K. J. Molecular mechanisms of dystrophies: old and new players // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006. Vol. 7. P. 762–774.
4. Greener M. J., Roberts R. G. Conservation of components of dystrophin complex in *Drosophila* // FEBS Lett. 2000. Vol. 482. N 1–2. P. 13–18.
5. Heisenberg M., Bohl K. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means // Z. Naturforsch [C]. 1979. Vol. 34. P. 143–147.
6. Kucherenko M. M., Pantoja M., Yatsenko A. S. et al. Genetic modifier screens reveal new components that interact with the *Drosophila* Dystroglycan-Dystrophin Complex // PLoS ONE. 2008. Vol. 3. P. e2418.
7. Lints F. A., Stoll J., Gruwez G., Lints C. V. An attempt to select for increased longevity in *Drosophila melanogaster* // Gerontology. 1979. Vol. 25. P. 192–204.
8. Nowak K. J., Davies K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin pathogenesis and opportunities for treatment // EMBO Rep. 2004. Vol. 5. N 9. P. 872–876.
9. Shcherbata H. R., Yatsenko A. S., Patterson L. et al. Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy // EMBO J. 2007. Vol. 26. P. 481–493.
10. van der Plas M. C., Pilgram G. S., de Jong et al. *Drosophila* Dystrophin is required for integrity of the musculature // Mech. of Develop. 2007. Vol. 10. P. 1016–1030.

THE INFLUENCE OF *DAD* AND *TKV* GENES ON DYSTROPHIN-DEFICIENT PHENOTYPE IN *DROSOPHILA MELANOGASTER***V. Rishko, O. Poberezhnyk, M. Kucherenko, N. Holub, D. Maksymiv, Ya. Chernyk**

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

Dad and *tkv* genes are involved in Dpp-signaling. To investigate these genes influence on dystrophin gene functioning in *Drosophila melanogaster* flies contained modifier gene and dystrophin gene inactivation construct in one organism were obtained. As a result of these hybrids screen it was shown resumption of wing vein structure, defects of which is the characteristic phenotype of dystrophin mutants. The penetrance of modifier genes was 30,5–48,5% in the offspring of *Dad* and mutant lines crossing and 2–8% in individuals from *tkv* and mutant lines crossing. In addition it was shown partial restore of thoracic muscle structure in hybrid flies. It could be concluded that *Dad* gene manifested to be more active dystrophin-deficiency phenotype suppressor than *tkv* gene.

Key words: Drosophila, Dystrophin, gene-modifier.

ВЛИЯНИЕ ГЕНОВ-МОДИФИКАТОРОВ *DAD* И *TKV* НА ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА ДИСТРОФИНА У *DROSOPHILA MELANOGASTER***В. Ришко, О. Побережнук, М. Кучеренко, Н. Голуб, Д. Максимив, Я. Чернык**

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

Гены *Dad* и *tkv* относятся к группе генов, задействованных в Dpp-сигнальном пути. Для изучения их влияния на функционирование гена дистрофина *Drosophila melanogaster* получено особи, которые в одном организме содержали исследуемый ген-модификатор и генетическую конструкцию для инактивации гена дистрофина. В результате анализа таких гибридов выявлено восстановление структуры вен крыла, нарушение которой является характерным признаком мутантов по гену дистрофина. Пенетрантность проявления исследованных генов-модификаторов составляла 30,5–48,5% у потомков от скрещивания линии *Dad* с мутантами по гену дистрофина и 2–8% у особей от скрещивания линии *tkv* с этими мутантами. Также установлено, что гены *Dad* и *tkv* обуславливают частичное восстановление структуры мышц торакса. Ген *Dad* оказался более активным супрессором мутантного дистрофинового фенотипа по сравнению с геном *tkv*.

Ключевые слова: дрозофила, дистрофин, гены-модификаторы, *Dad*, *tkv*.

Стаття надійшла до редколегії 19.05.09
Надійшла після доопрацювання 11.06.09
Прийнята до друку 15.06.09