

Генетика

УДК 595.773.4:575/113/224.4:591.139

***DROSOPHILA MELANOGASTER* ЯК МОДЕЛЬНА СИСТЕМА ДЛЯ ПОШУКУ
МОДИФІКАТОРІВ ДИСТРОФІН-ДИСТРОГЛІКАНОВОГО КОМПЛЕКСУ**

М. Кучеренко*, А. Яценко*, Х. Руохола-Бейкер, Д. Максимів*, Я. Черник***

*Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

**Вашингтонський університет

1705 NE Pacific St., Seattle WA 98195, USA

e-mail: kucherenkomari@gmail.com

Використовуючи *Drosophila melanogaster* як модельну систему для дослідження м'язової дистрофії, було проведено генетичний пошук мутацій у генах, продукти яких модифікують фенотип порушення полярності вен крила, викликаний мутацією в гені дистрофіну. Для отриманих мутантів було проведено хромосомну локалізацію мутацій з використанням делеційного картування. Імуногістохімічний аналіз із використанням антитіл 24B10, що специфічно експресується в аксонах фоторецепторних клітин, показав, що в одного із мутантів (Mod29) була порушена нормальна міграція аксонів. Подібний фенотип притаманний також і мутантам за дистрогліканом, що вказує на спільну роль продукту гена Mod29 та дистроглікану у забезпеченні полярності аксонів клітин фоторецепторів. Одержані результати свідчать про доцільність використання фенотипу по венах крил для широкого пошуку мутацій, які впливають на функціонування дистрофін-дистрогліканового комплексу в різних тканинах.

Ключові слова: дрозофіла, дистрофін, дистроглікан, генетичний скринінг.

М'язова дистрофія Дюшена є одним із найпоширеніших захворювань людини, яке розвивається в результаті мутацій, що виникають у дистрофіновому гені, та характеризується прогресивною дегенерацією м'язів [6]. Дистрофін – цитоплазматичний білок, що є частиною великого, асоційованого з мембраною дистрофін-дистрогліканового комплексу (ДДК). ДДК сполучає актиновий цитоскелет із зовнішньоклітинним матриксом за допомогою трансмембранного білка дистроглікану і стабілізує сарколему під час скорочення м'язів. Дистрофін містить актин-зв'язуючий домен на N-кінці та дистроглікан-зв'язуючі WW домени на C-кінці [1, 3]. *In vitro* експерименти показали [10], що фосфорилування тирозину у WW-зв'язуючих сайтах дистроглікану значно знижує рівень взаємодії дистрофіну з дистрогліканом, що свідчить про регуляцію у зв'язуванні цих білків, яка може здійснюватися за принципом фосфорилування тирозину. Зв'язки між компонентами ДДК є життєво необхідними і пошкодження будь-якого компонента або взаємодії між ними може зумовити м'язову дистрофію, порушення у функціонуванні мозку, серцеві вади у людей [4, 2]. *D. melanogaster* є хорошим модельним об'єктом для вивчення молекулярних механізмів розвитку багатьох людських захворювань, зокрема і м'язової дистрофії. Існує висока консервативність у взаємодії дистрофіну і дистроглікану у людини та дрозофіли [8]. Генетичні пошкодження дистрофіну та дистроглікану у дрозофіли спричиняють порушення полярності гермінативних клітин [5], а також призводять до розвитку фенотипів м'язової дистрофії, які проявляються у зниженні мобільності мутантів, залежній від віку дегенерації м'язів, а також у порушенні міграції фото-

рецепторних нейронів [8]. У розвитку м'язових дистрофій задіяні багато інших генів, продукти яких взаємодіють з ДДК або є важливими для його функціонування [7]. Виявлення усіх компонентів дистрофін-дистрогліканового сигнального шляху дасть змогу краще зрозуміти регуляцію функціонування комплексу на молекулярному рівні, а також допоможе у пошуку медичних засобів для лікування м'язових дистрофій. Використання дрозофіли для пошуку компонентів, які задіяні у забезпеченні функціонування ДДК, має низку переваг: по-перше, 70% генів дрозофіли гомологічні з генами *Homo sapiens*, що дає змогу інтерпретації одержаних результатів на людину; по-друге, дрозофіла має короткий життєвий цикл (10–11 днів), зручний для проведення генетичного аналізу кількох поколінь за нетривалий період часу; по-третє, новітні методи досліджень дозволяють специфічно нокаутувати гени в окремих тканинах, що полегшує вивчення функціонування того чи іншого білка *in vivo*.

Дистрофіновий ген *D. melanogaster* кодує щонайменше шість ізоформ дистрофіну, мРНК яких транскрибуються із різних промоторів, але мають спільний С-кінець, що кодує послідовність, необхідну для зв'язування з дистрогліканом [9]. У наших дослідженнях ми використали мутанта (*UAS-dsDys/tubGal4*), у якого негативна регуляція утворення довгих ізоформ дистрофіну (DLP1, DLP2 і DLP3) відбувається за допомогою формування дволанцюгового РНК-РНК гібриду, формування якого веде до зупинки трансляції.

З метою надекспресії трансгена *UAS-dsDys* було використано UAS-Gal4 систему. Для активації використали лінію, в якій Gal4 перебував під контролем тубулінового промотора, що конститутивно експресується у більшості клітин дрозофіли. Даний мутант (*UAS-dsDys/tubGal4*) характеризувався зниженими показниками тривалості життя, порушеннями мобільності особин, дегенерацією м'язів, яка починалася з 12-го дня життя імаго і прогресувала з віком, а також порушеннями полярності овоцита і фоторецепторних нейронів [8].

Також наші дослідження показали, що редукція дистрофіну, а також дистроглікану приводить до порушень у формуванні задньої поперечної вени крила (рис. 2). Так, якщо у мух дикого типу *OregonR* під час розвитку крила формуються п'ять поздовжніх вен (L1-L5) і дві поперечні (передня – ACV, що з'єднує L3 з L4, і задня – PCV сполучає L4 і L5 поздовжні вени), то у мутантів з негативною регуляцією дистрофіну *UAS-dsDys/tubGal4* розвиток задньої поперечної вени відбувається з порушеннями і призводить до формування вени, яка не торкається поздовжніх вен і (або) галузиться.

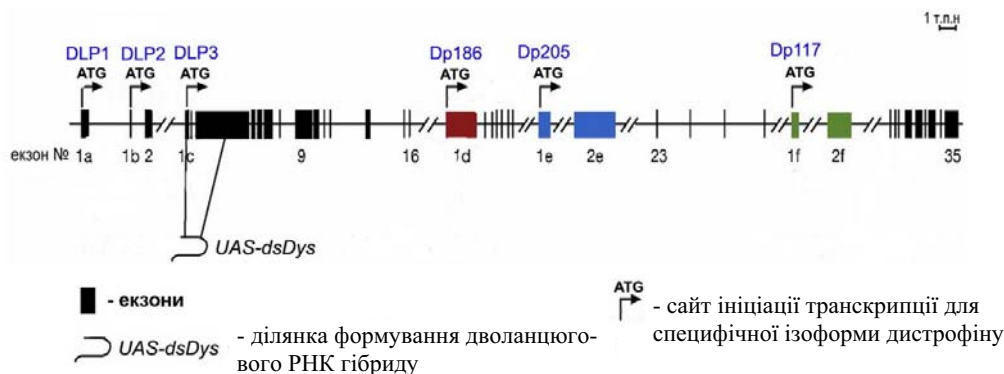


Рис. 1. Схематичне зображення гена дистрофіну *D. melanogaster* [8] з ділянкою утворення дволанцюгового РНК-РНК гібриду під час негативної регуляції гена.

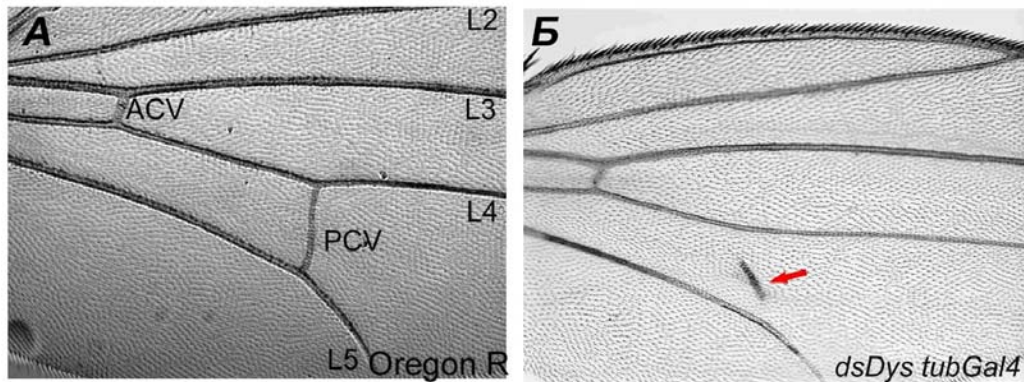


Рис. 2. Вени крила *D. melanogaster* (x 150, світлова мікроскопія): А – лінія дикого типу *Oregon R* (ACV – артеріальна поперечна вена, PCV – постеріальна поперечна вена, L2-5 – повздовжні вени крила); Б – лінія *dsDys/tubGal4* з негативною регуляцією дистрофіну (стрілка показує порушення у поперечній вені крила).

З метою отримання мутацій, що впливають на функціонування ДДК, ми проводили хімічний мутагенез, згодовуючи 3-денним самцям лінії *tubGal4/TM3* 27мМ розчин етил-метансульфату (ЕМС) впродовж 8 годин після чотиригодинного голодування в порожніх пробірках. Затравлених самців схрещували зі самками лінії *UAS-dsDys/UAS-dsDys*. Мух, отриманих у першому поколінні F1 (*UAS-dsDys/tubGal4*), аналізували на наявність змін у фенотипі вен крил. Далі особин із модифікованими венами крил повторно схрещували з *tubGal4/TM3* лінією, яка несла *CyO* балансер на 2-й хромосомі, стежачи, щоби співвідношення потомків із мутантними і відмінним від мутантного фенотипу за венами крила у другому поколінні (F2) було 1:1. Серед модифікованих особин відбирали самців і самок з балансерною *CyO* хромосомою і схрещували їх між собою для виведення чистої лінії (рис. 3). Умовами мутагенезу було отримання домінантних мута-

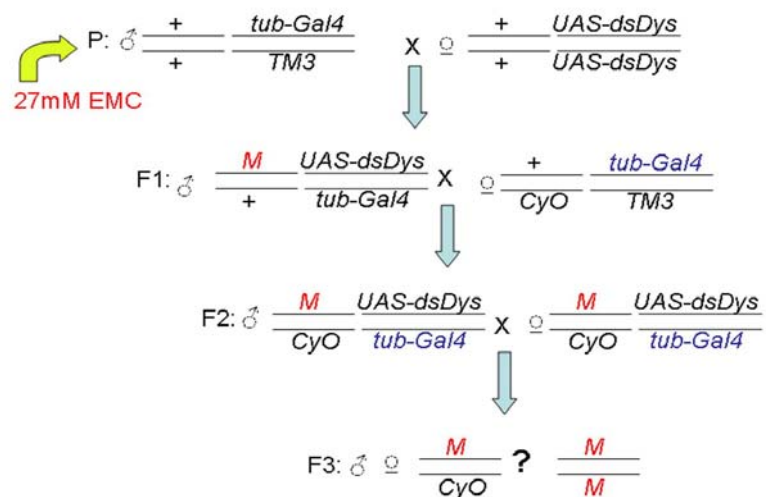


Рис. 3. Схема схрещувань, використана під час пошуку модифікаторів дистрофінового фенотипу по венах крил (M – мутація, отримана в результаті мутагенезу).

цій по 2-й хромосомі, що змінюють фенотип у венах крил, викликаний негативною регуляцією дистрофіну. Отримані мутації – летальні або в гомозиготному стані з проявом власного фенотипу – були використані під час картування.

У результаті проведеного генетичного пошуку було затравлено 7000 самців і проаналізовано 16000 потомків F1. Серед проаналізованих мух виявили 67 особин з модифікаціями у задній поперечній вені крил. Вимогам другого схрещування відповідали 13 мутантів, а в результаті третього вдалося отримати два летальні мутанти по 2-й хромосомі (Mod4, Mod33) і одного напівлетального мутанта по 2-й хромосомі (Mod29). У гомозиготному стані Mod29 характеризувався короткою тривалістю життя – не більше 5-ти днів (при нормі 70 днів у лінії дикого типу *OregonR*) та наявністю мутантного фенотипу по задніх поперечних венах крил (рис. 4). Отримані мутанти ставилися на баланс-рні хромосоми з подальшим їх виведенням у чисті лінії.

Для локалізації виявлених у ході скринінгу мутацій Mod4, Mod29 та Mod33 проводили генетичне картування, схрещуючи мутантні лінії з колекцією делеційних мутантів по 2-й хромосомі (делеційні мутанти отримані з колекції ліній Блумінгтонського музею). Після схрещування кожного з отриманих мутантів зі сімдесятьма делеційними лініями було локалізовано ділянки розміщення точкових мутацій на цитологічній карті хромосоми. Більш точну локалізацію ділянки вдалося провести, використовуючи делеції, менші за розмірами або такі, що перекривають попередні. У випадку Mod4 і Mod33 взаємодію виявляли за летальністю; Mod29 був напівлетальним і змінював фенотип у венах крил. Делеційне картування дозволило локалізувати Mod4 у ділянці 42A1-42A10 (рис. 5, А), яка містила 22 картовані та секвеновані гени. Мутацію Mod33 було локалізовано у двох ділянках цитологічної карти 32D2-32D5 і 36C10-36D1 (рис. 5, В), які містять 28 і 21 секвеновані гени відповідно. Локалізацію двох районів можна пояснити наявністю іншої летальної мутації, яка індукована під час хімічного мутагенезу і не має зв'язку із взаємодією з ДДК. Mod29 вдалося локалізувати у районі 27D1-27D4 (рис. 5, В), яка містила 6 генів.

Подальше картування проводили, використовуючи летальних мутантів із локалізованих районів, які теж було одержано з колекції Блумінгтонського музею дрозофіли.

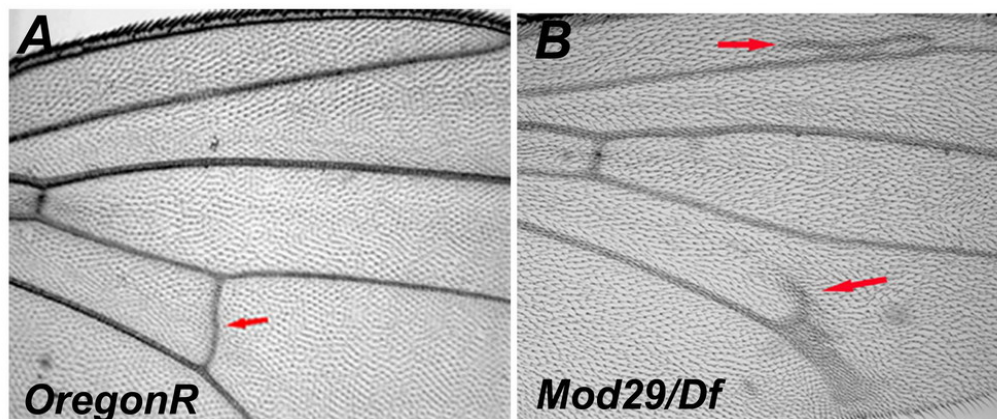


Рис. 4. Вени крила *D. melanogaster* (x 150, світлова мікроскопія): А – крило лінії дикого типу *OregonR*; В – крило гомозиготного мутанта Mod29 (стрілками вказані місця з дефектними венами).

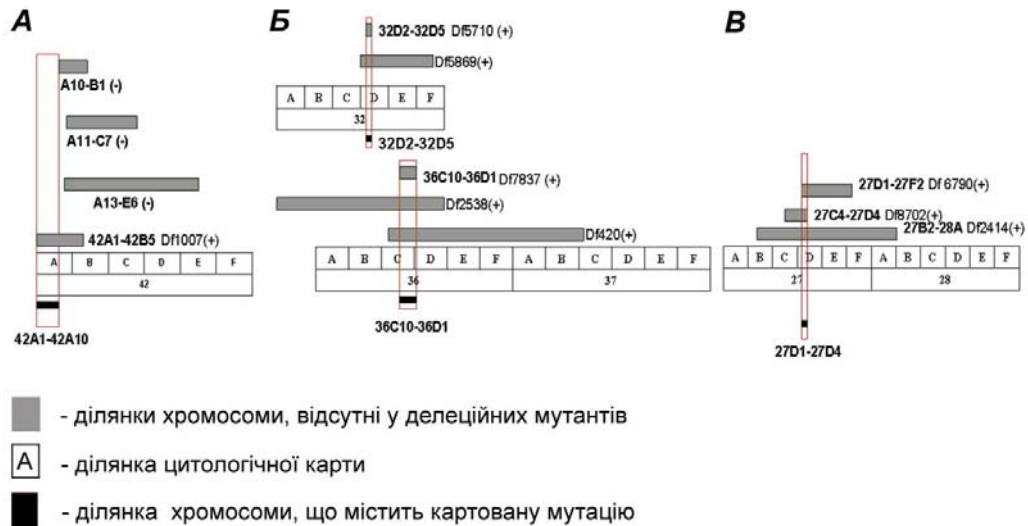


Рис. 5. Схеми локалізації мутацій, індукованих EMC, на цитологічній карті хромосоми 2: *A* – цитологічна локалізація Mod4; *Б* – цитологічна локалізація Mod33; *В* – цитологічна локалізація Mod29; (+) – означає взаємодію із використаною делеційною лінією.

У результаті проведених експериментів було виявлено, що Mod4 є мутантом за геном *CG7845*, продукт якого містить WD40 домен. Функція *CG7845* гена на сьогодні залишається невідомою, однак загальновідомою є властивість WD40 доменів координувати функціонування мультибілкових комплексів, де WD повтори (чергування триптофану й аспарагінової кислоти) слугують скелетом для взаємодії молекул. Mod29 додатково схрестили з п'ятьма наявними мутантами (*snRNP70K*, *CG13776*, *ade3*, *Pcp*, *CG31908*) із шести можливих, мутації в яких містяться у цитологічному районі 27D1-27D4. Із жодним з проаналізованих генів не було виявлено взаємодії. Методом виключення ми припустили, що мутація міститься в гені *SP1070*. На даний час алелі за даним геном не описані, тому точне картування мутації генетичним методом є ускладнене. Базуючись на амінокислотній послідовності білка *SP1070* (*polyEGF*), провели біоінформативний аналіз послідовності Blast методом (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) та визначили ймовірні функціональні домени, які можуть вказувати на роль цього білка. Так, у продукту гена *SP1070* було виявлено ряд таких доменів, як: LectinC (домен, що зв'язується з вуглеводневими групами по кальційзалежному типу), Cub (домен позаклітинного простору виявлений у білків еукаріотичних організмів і необхідний для нормального розвитку клітин), Nup (домен з гіаліновими повторами з невідомою функцією по структурі, що нагадує домени білків імуноглобулінів), EGF (домен присутній у широкого спектру білків, які є факторами епідермального росту клітин), LamininG (домен білків позаклітинного простору, що часто слугує сигнальним трансдуктором для передачі сигналів у клітину через такі трансмембранні білки, як інтегрин і дистроглікан). Порівняння з білками, що мають подібні домени, дає нам змогу припускати, що цей білок може бути задіяний у клітинній проліферації, сигнальній трансдукції, клітинній адгезії, розвитку ектодерми та нервової системи [11].

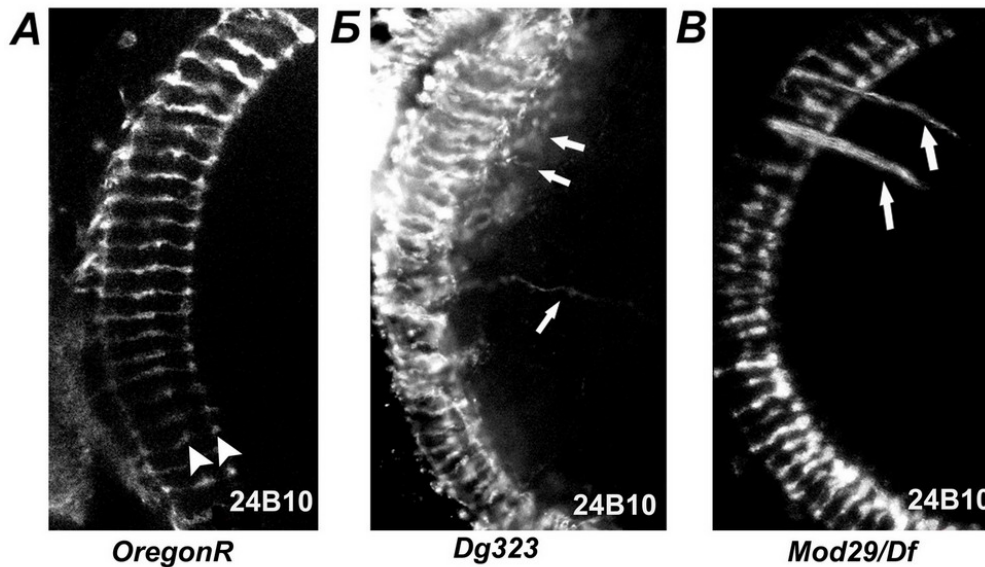


Рис. 6. Ділянка медули головного мозку *D. melanogaster* (x600, конфокальна мікроскопія, фарбування антитілами 24B10): *A* – лінія дикого типу *OregonR*. Сайти термінації R7 та R8 аксонів позначені білими вказівниками; *B* – мутант за геном дистроглікану з порушеною термінацією аксонів фоторецепторів (білими стрілками позначені аксони, що не зупиняють свій ріст та продовжують його у глибші шари мозку); *C* – мутант *Mod29*. Аксони з порушеною термінацією росту (білі стрілки).

Детальніший аналіз одержаного мутанта *Mod29* був проведений з використанням імуногістохімічного фарбування антитілами до білка 24B10, які маркують аксони фоторецепторів. У клітинах дикого типу термінація аксонів фоторецепторів у ділянці медули чітко розділена на два шари (R7 та R8 ділянки, рис. 6, *A* білі вказівники). Імуногістохімічний аналіз фоторецепторних нейронів антитілами 24B10 дав змогу виявити, що як у гомозиготного *Mod29*, так і в одного з мутантних алелей за геном дистроглікану (*Dg³²³* [5]), відбувалося порушення термінації аксонів фоторецепторів. Аксони у досліджуваних мутантів, мігруючи під час розвитку, не зупиняли росту в зоні медули R7 та R8, як у лінії дикого типу *OregonR*, натомість продовжували мігрувати у глибину головного мозку (рис. 6, *B*, *C*). Із отриманих результатів можна припустити ймовірну спільну роль дистроглікану і продукту гена *Mod29* у процесі формування полярності фоторецепторних аксонів.

У ході роботи з використанням індукованого мутагенезу на основі скринінгу за фенотипом крил отримані мутанти з порушенням функціонування ДДК у різних тканинах дрозофіли. Отримані нами результати демонструють доцільність використання *D. melanogaster* як зручного модельного об'єкта для пошуку нових компонентів-білків, що можуть взаємодіяти з ДДК.

1. Barresi R., Campbell K. P. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease // *J. Cell Sci.* 2006. N 119. P. 199–207.
2. Cohn R. D. Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond // *Neuromuscular Disorders.* 2005. N 80. P 207–217.

3. Cohn R. D., Campbell K. P. Molecular basis of muscular dystrophies // *Muscle Nerve*. 2000. N 23. P. 1456–1461.
4. Davies K. E., Nowak K. J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. N 7(10). P. 762–773.
5. Deng W. M., Schneider M., Frock R. et al. Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila* // *Development*. 2003. N 130. P. 173–184.
6. Koenig M., Hoffman E. P., Bertelson C. J. et al. Complete cloning of the duchene muscular dystrophy cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals // *Cell*. 1987. N 50. P. 509–517.
7. Muntoni F., Brockington M. Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies // *Curr. Opin. of Neurology*. 2004. N 17(2). P. 205–209.
8. Shcherbata H. R., Yatsenko A. S., Petterson L. et al. Dissecting musculature and neuronal disorders in *Drosophila* model of muscular dystrophy // *EMBO J.* 2007. N 26. P.481–493.
9. van der Plas M. C., Pilgram G. S., Plomp J. J. et al. Dystrophin is required for appropriate retrograde control of neurotransmitter release at the *Drosophila* neuromuscular Junction // *J. Neuroscience*. 2006. N 26. P. 333–344.
10. Yatsenko A. S., Gray E., Shcherbata H. R. et al. A putative Src homology 3 domain binding motif but not the C-terminal dystrophin WW domain binding motif is required for dystroglycan function in cellular polarity in *Drosophila* // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. N 20. P. 15159–15169.
11. <http://flybase.bio.indiana.edu/>

DROSOPHILA MELANOGASTER AS A MODEL SYSTEM FOR SEARCHING OF THE DYSTROPHIN-DYSTROGLYCAN COMPLEX MODIFIERS

M. Kucherenko*, A. Yatsenko*, H. Ruohola-Baker, D. Maksymiv*, Ya. Chernyk***

**Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine*

***University of Washington
1705 NE Pacific St., Seattle WA 98195, USA
e-mail: kucherenkomari@gmail.com*

We have done genetic screening of Dystrophin mutants for modifiers of wing vein phenotypes in *Drosophila melanogaster* as a model organisms of muscular dystrophy in humans. Found modifiers were mapped in cytological regions on the 2nd chromosome, using deficiency kit. With help of immunohistochemical methods we have analyzed adult brain of mutant Mod29 and have found strong defects if photoreceptor neuron migration. The similar phenotype is present then mutation in Dystroglycan gene occurs. Obtained results shows grate advantage of using Dystrophin and Dystroglycan wing vein phenotype in large scale screenings for modifiers of Dystrophin-Glycoprotein Complex functioning in different tissues.

Key words: Drosophila, Dystrophin, Dystroglycan, genetic screening.

Стаття надійшла до редколегії 17.01.08

Прийнята до друку 20.02.08