

УДК: 575.162:57.024:591.185.1

### **Характеристика фенотипових змін та генетичний аналіз нейродегенеративної мутації 3.5.8 *Drosophila melanogaster***

О.В.Щербакова, Л.С.Боднар, С.М.Горбулінська, Я.І.Черник

*Львівський національний університет імені Івана Франка (Львів, Україна)*  
*oksana\_kysla@yahoo.com*

Досліджено рухову активність нейродегенеративних мутантів 3.5.8 методом відкритого поля. Виявлено значне зниження довжини пробігу мутантів різного віку, збільшення часу вмивання та періоду спокою при старінні. Показано, що дегенерація у мозку особин лінії 3.5.8 з'являється з 10 дня життя імаго у вигляді вакуолей у всіх ділянках мозку. Згідно отриманих результатів, зміни рухової поведінки мутантів проявляються ще до появи дегенеративних змін у мозку і прогресують з віком. Мутацію 3.5.8 картовано в ділянці 63F1–64A4 третьої хромосоми. Проаналізовано гени, що містяться у даному районі та відібрано кандидати для проведення подальшого комплементацийного аналізу.

**Ключові слова:** *нейродегенерація, поведінка, дрозофіла.*

### **Характеристика фенотипических изменений и генетический анализ нейродегенеративной мутации 3.5.8 *Drosophila melanogaster***

О.В.Щербакова, Л.С.Боднар, С.М.Горбулинская, Я.И.Черник

Исследована двигательная активность нейродегенеративных мутантов 3.5.8 методом открытого поля. Выявлено значительное снижение длины пробега мутантов разного возраста, увеличение времени умывания и периода покоя при старении. Показано, что дегенерация в мозге особей линии 3.5.8 появляется с 10 дня жизни имаго в виде вакуолей во всех участках мозга. Согласно полученным результатам, изменения двигательного поведения мутантов проявляются еще до появления дегенеративных изменений в мозге и прогрессируют с возрастом. Мутация 3.5.8 картирована в области 63F1–64A4 третьей хромосомы. Проанализированы гены, содержащиеся в данном районе, и отобраны кандидаты для проведения дальнейшего комплементационного анализа.

**Ключевые слова:** *нейродегенерація, поведінка, дрозофіла.*

### **Characteristics of phenotypic changes and genetic analysis of *Drosophila melanogaster* neurodegenerative mutation 3.5.8**

O.V.Shcherbakova, L.S.Bodnar, S.M.Gorbulinska, Ya.I.Chernyk

The locomotor activity of neurodegenerative mutants 3.5.8 has been studied. We have shown a significant reduction of run-length in mutants of different age, increase of grooming time and rest period with age. The study of mutants' brain tissue revealed that neurodegenerative changes in these flies appeared in all parts of the brain on the 10th day after eclosion. According to the results, changes in mutants' locomotor behavior appeared before the degenerative changes emergence in the brain and progressed with age. Mutation 3.5.8 was mapped in the region 63F1–64A4 of the third chromosome. Genes, localized in this region were analyzed and the candidates for further tests were selected.

**Key words:** *neurodegeneration, behavior, drosophila.*

#### **Вступ**

Поряд із зростанням середньої тривалості життя людства і збільшенням кількості людей, старших за 60 років, підвищується частота появи нейродегенеративних захворювань у суспільстві. Дослідженнями механізмів нейродегенерацій займаються вже не одне десятиліття, проте ефективних способів терапії не винайдено досі (Mochizuki, Mizuno, 2003; O'Connor, Boulis, 2015; Roselli, Caron, 2015). Доцільність використання *D. melanogaster* як модельного об'єкту у вивченні патологічних процесів центральної нервової системи доведена багатьма дослідженнями (Chan, Bonini, 2000; Prussing et al., 2013). Мутанти дрозофіли, індуковані чи сконструйовані в лабораторії, стали важливим джерелом знань про структуру і функціонування нервової системи: поведінку, біологічні ритми,

пам'ять та механізми нейродегенеративних процесів. Метою даного дослідження було вивчення фенотипових змін в особин лінії 3.5.8 та встановлення локалізації мутації, що їх зумовлює.

#### Об'єкти та методи дослідження

В роботі використовували лінію 3.5.8, що містила мутацію в гені третьої хромосоми, та лінію дикого типу Oregon-R. Досліджувані лінії мух утримували в пробірках на стандартному цукрово-дріжджовому поживному середовищі (Ashburner, 1989) в термостаті при 23°C.

Для вивчення характеру нейродегенеративних змін виготовляли парафінові зрізи (Heisenberg, Bohl, 1979). Наявність та розміщення дегенерації у мозку аналізували за допомогою мікроскопу Laboval-3 Carl Zeiss Jena при збільшенні 15x40.

Рухова активність мух вивчалася за допомогою метода відкритого поля. Для цього мух досліджуваних ліній індивідуально поміщали в чашку Петрі, розграфлену на квадрати по 0,5 см, і за допомогою відеокамери фіксували поведінку кожної особини протягом 10 хв. Для кожного досліду використовували не менше 25 самців однієї лінії певного віку. Досліджувані особини не піддавались ефіризації щонайменше 1 добу. Дослід проводили в один і той самий час за однакових температурних умов та освітлення лампою денного світла. Отриманий відеоматеріал аналізували з визначенням таких показників: довжина пробігу, кількість стрибків, час, затрачений на вмивання, та час спокою. Довжина пробігу особин кожного генотипу вимірювалась в см, при цьому перетин одного квадрата рахувався пробігом довжиною 0,5 см.

Для локалізації мутації 3.5.8 проводили схрещування особин цієї лінії з маркерними лініями *R D Sb/TM6* і *Ly/TM6B*, а також з лініями, що несли делеції у відповідних ділянках третьої хромосоми: 6462 (район 64F–65C4), 6755 (район 62E8–63B6), 8059 (район 63C1–63F5), 8061 (район 64B9–64C13), 8973 (район 62D7–62E5), 24389 (район 62B7–62D3), 24392 (район 63F1–64A4), 24395 (район 64C1–64E1), 24409 (район 62D4–62E1), 25118 (район 64A10–64B7). Маркерні та делеційні лінії були отримані з Bloomington *Drosophila* Stock Center.

P1 ♀ *m/m* × ♂ *R D Sb/TM6*

P2 ♀ *R D Sb/m* × ♂ *Ly/TM6B*

P3 ♀ *R m/TM6B*  
*m D Sb/TM6B*  
*R/TM6B*  
*R D/TM6B* × ♂ *m/m*  
*m Sb/TM6B*  
*D Sb/TM6B*

F3 ♀ ♂ *R m/m*  
*m D Sb/m*  
*R/m*  
*R D/m*  
*m Sb/m*  
*D Sb/m*

**Рис. 1. Схеми схрещувань для картування нейродегенеративної мутації 3.5.8.** *R* – *Roughened*, неоднорідна поверхня очей; *D* – *Dichaete*, розчепірені крила; *Sb* – *Stubble*, зменшені щетинки; *Ly* – *Lyra*, крила з обрізаним внутрішнім краєм; *TM6* і *TM6B* – балансери за 3-ю хромосоמוю; *m* – рецесивна нейродегенеративна мутація 3.5.8

Для уникнення повторної рекомбінації усіх потомків F2 переводили на балансера *TM6B* і відбирали серед них тих, що не мали маркера *Ly*. Аналізували мух F3 індивідуально, вивчали старіння і виготовляли гістологічні препарати мозку. За умови розміщення мутації між генами *R* та *D* не буде виявлено нейродегенеративних мутантів з генотипом *R D/m* або ж вони будуть зустрічатися з дуже низькою частотою.

Статистична обробка даних була проведена за допомогою програмного забезпечення «Microsoft Excel». Достовірність отриманих результатів перевіряли за допомогою критеріїв Пірсона або Стьюдента. Позначали (\*\*) – достовірну різницю при рівні значущості  $p \leq 0,01$ ; (\*) –  $p \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

Особини лінії 3.5.8 характеризувалися зниженою тривалістю життя (Щербакова, 2009). Нейродегенеративний фенотип у мутантів виявлявся на 10-й день життя дорослої особини і з віком прогресував. Вакуолізація з'являлася у всіх ділянках мозку, як у кортексі, де розміщені тіла нейронів, так і в нейропілі, де знаходяться відростки нейронів та тіла глії (рис. 2).

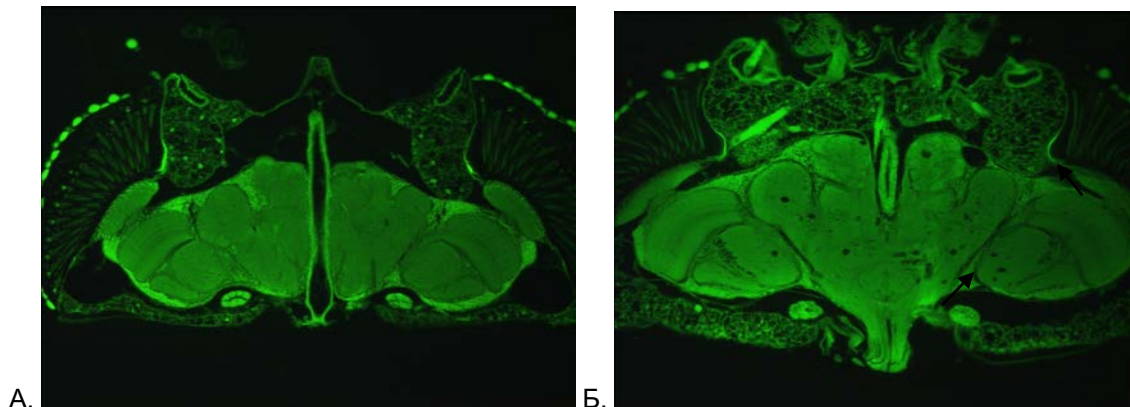
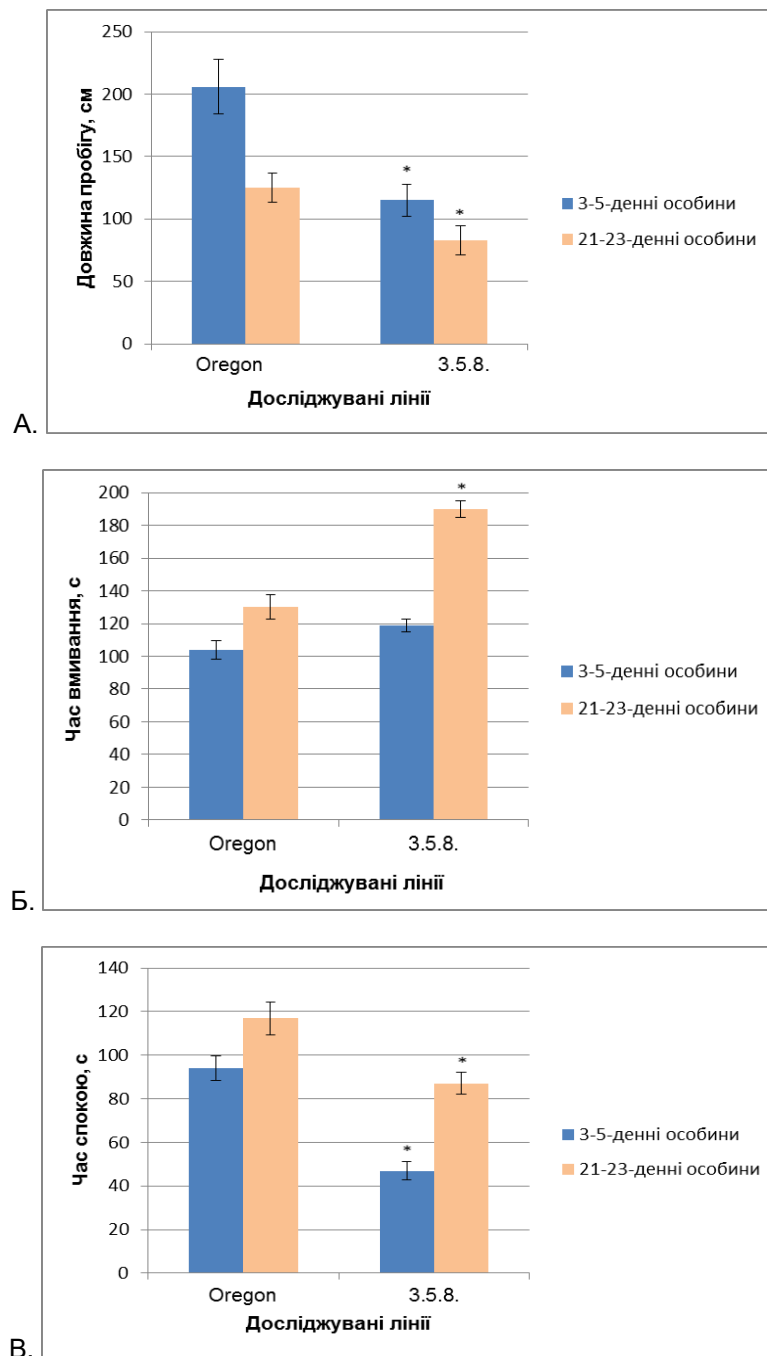


Рис. 2. Зрізи тканини мозку особин лінії Oregon-R (А) та 3.5.8 (Б) 21-денного віку

При аналізі зрізів цих ділянок мозку мутантів 3.5.8 в електронному мікроскопі виявили гіперзакручування мембран глії навколо тіл нейронів і порушення їхньої форми (Щербакова та ін., 2009). В процесі метаморфозу дрософіли глія огортає тіло нейрональної клітини та її відростки (Kretzschmar, Pflugfelder, 2002). Відомі мутації дрософіли, що зумовлюють розвиток нейродегенерації внаслідок порушення розвитку глії та її неправильного обгортання нейронів (Buchanan, Benzer, 1993). У мутантів дрософіли *drop-dead* виявлено віково-залежну нейродегенерацію та відмирання нейронів, які пов'язані з затримкою розвитку глії і неповним обгортанням нейронів, спричинені порушенням взаємодій між нейронами і глією. Іншим прикладом ролі глії стали дослідження мутантів *gero*. У 2-тижневих мутантів *gero* відмирають майже всі клітинні тіла ламіни (Xiong et al., 1994). Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що ще на стадії лялечки мутантів *gero* половині нейронів ламіни властиві перші ознаки апоптозу. Дисфункція глії веде спочатку до загибелі нейронів, і лише потім відмирають самі гліальні клітини. Відомо (Buchanan, Benzer, 1993), що в хребетних нормальна кількість гліальних клітин регулюється взаємодією нейронів і глії; проліферація гліальних попередників і виживання новоутворених клітин глії залежить від кількості і довжини аксонів рухових нейронів. Можливо, мутація 3.5.8 веде до пошкодження гену, продукт якого задіяний у механізмах взаємодії між нейронами і клітинами глії.

Нейродегенеративні захворювання людини супроводжуються різноманітними порушеннями поведінки. В пацієнтів з хворобою Паркінсона спостерігають порушення координації рухів, в пацієнтів з хореею Гантінгтона – появу мимовільних рухів (Prussing et al., 2003). Попередньо, в мутантів 3.5.8 нами була показана змінена статевая та загальна рухова активність (Матийцив и др., 2009), а також фототаксична поведінка (Щербакова, 2009). Під час досліджень рухової поведінки в особин лінії 3.5.8 довжина пробігу була зменшеною вже в 3–5-денних мух, порівняно з контролем і продовжувала знижуватися з віком (рис. 3 А).

При порівнянні величини пробігу і часу, затраченого на нього, було показано, що швидкість руху контрольних особин зменшувалася при старінні (0,48 см/с і 0,36 см/с відповідно). У 3–5-денних нейродегенеративних мутантів швидкість руху була в 1,7 разів нижчою порівняно з контролем і становила 0,27 см/с, з віком цей показник незначно змінювався і становив 0,23 см/с.



**Рис. 3.** Рухова активність особин досліджуваних ліній різного віку

В 3–5-денних особин лінії 3.5.8 зафіксований збільшений час, що затрачувався на вмивання, та зменшений час відносного спокою, порівняно з контролем (рис. 3 Б, В). Вмивання мух має не лише гігієнічне значення, цей аспект поведінки порівнюють з повторювальною поведінкою людей з неврологічними захворюваннями (Prussing et al., 2003). Наприклад, мухи з мутацією в гені *FMR1* (гомолог людського гену, який пов'язують з розвитком аутизму) мають порушену статеву поведінку і замість того, щоб залицятися до самок, затрачують великий проміжок часу на власне вмивання. Повторювальні рухи спостерігаються і у людей з аутизмом, в яких виявлено мутацію у цьому гені.

Ще одним показником, за яким проводили аналіз, була кількість стрибків. Їх розглядають як спроби мух злетіти. В молодих особин лінії 3.5.8 цей показник був достовірно вищим порівняно з контрольними мухами, а з віком різко зменшувався (рис. 4).

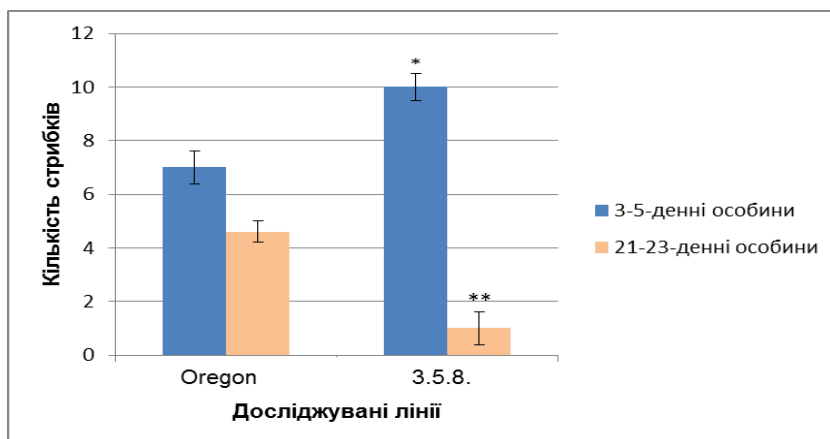


Рис. 4. Кількість стрибків, що здійснювали особини досліджуваних ліній різного віку

Згідно отриманих результатів, особини лінії 3.5.8 характеризуються значними змінами рухової поведінки, що проявляються ще до появи дегенеративних змін у мозку і прогресують з віком.

Під час картування мутації 3.5.8 було проаналізовано більше 500 особин F3. Найвища частота появи нейродегенеративного фенотипу виявлена у особин з генотипами *R m/m* і *m Sb/m*. Серед нащадків з генотипом *m D Sb/m* також зустрічалися особини з нейродегенеративним фенотипом, проте такого фенотипу не виявили серед особин з генотипом *R D/m*. Таким чином, мутація 3.5.8 була локалізована між генами *R (Roughened)*, що розташований в ділянці 62B7, і *D (Dichaete)*, який міститься в ділянці 70D3. Наступний етап картування полягав у схрещуванні мутанта 3.5.8 із серією делеційних ліній, кожна з яких містила делецію на проміжку 62B7–70D3. В результаті нейродегенеративний фенотип 3.5.8 отримано при схрещуванні з делеційним мутантом 24392, що означає, що мутація знаходиться у ділянці 63F1–64A4 третьої хромосоми. В цій ділянці виявлено близько 40 білкових генів, з них – 8 (табл. 1) відомі своєю участю у процесах, що задіяні у формуванні чи функціонуванні нервової системи ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)). Проте для жодного з них не описано мутації з нейродегенеративним фенотипом.

Таблиця 1.

Гени-кандидати для локалізації мутації 3.5.8

Ген	Розміщення у хромосомі	Продукт	Процеси, в яких задіяний продукт
<i>Scsalpha</i>	63F1	α-субодиниця сукцинат-КоА лігази	розвиток центральної та периферійної нервової системи
<i>Awh</i>	63F4	транскрипційний фактор	правильна будова фоторецепторних клітин ока
<i>Ida</i>	63F6	невідомий	нейрогенез, розвиток імагінальних дисків
<i>Eip63F-1</i>	63F6-64A1	Ca <sup>2+</sup> -зв'язуючий білок	автофагія, захист від оксидативного стресу
<i>Gr63a</i>	63F5	7TM хеморецептор	сприйняття смаку, захист від оксидативного стресу
<i>Ccz1</i>	63F5	невідомий	автофагія, сприйняття больових сигналів; в мутантів знижена тривалість життя
<i>scrt</i>	64A2-64A3	транскрипційний фактор	розвиток нервової системи, фоторецепторних клітин; мутанти виявляють поведінкові порушення
<i>fd64A</i>	64A4	транскрипційний фактор	диференціація нейронів, ріст аксонів

Для підтвердження локалізації мутації необхідно провести комплементацийний аналіз з мутантами за генами-кандидатами, проте вже зараз можна стверджувати, що дана мутація є новою, не описаною раніше, а дані мутанти є зручною моделлю у дослідженні механізмів нейродегенеративних процесів та порушень поведінки.

#### Список літератури

- Матійців Н.П., Магоривська І.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. /Matiytsiv N.P., Magorivska I.B., Shcherbakova O.V., Chernik Ya.I., Maksymiv D.V. Geneticheskiy analiz neyrodegenerativnykh mutantov *Drosophila melanogaster* po 3-y khromosome, indutsirovannykh etilmetansul'fonatom // Genetika. – 2009. – Т.45, №2. – С. 196–202./
- Щербакова О.В. Генетичний аналіз та поведінкові реакції мутантів *Drosophila melanogaster* із дегенеративними змінами в тканині мозку. Автореф. дис. ... канд. біол. наук / 03.00.15 – генетика. – Львів, 2009. – 20с. /Shcherbakova O.V. Genetychnyy analiz ta povedinkovi reaktsiyi mutantiv *Drosophila melanogaster* iz degeneratyvnyu zminamy v tkanyni mozku. Avtoref. dys. ... kand. biol. nauk / 03.00.15 – genetyka. – L'viv, 2009. – 20s./
- Щербакова О.В., Матійців Н.П., Максимів Д.В. Виявлення механізмів клітинної смерті у нейродегенеративних мутантів *Drosophila melanogaster* // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. – К.: Логос, 2009. – Т.7. – С. 435–438. /Shcherbakova O.V., Matiytsiv N.P., Maksymiv D.V. Vyyavlennya mekhanizmv klitinnoyi smerti u neyrodegeneratyvnykh mutantiv *Drosophila melanogaster* // Faktory eksperymental'noi evolyutsiyi organizmv: Zb. nauk. pr. – K.: Logos, 2009. – Т.7. – С. 435–438./
- Ashburner M. *Drosophila: a laboratory manual*. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – P. 179–189.
- Buchanan R.L., Benzer S. Defective glia in the *Drosophila* brain degeneration mutant drop-dead // Neuron. – 1993. – Vol.10. – P. 839–850.
- Chan H., Bonini N.M. *Drosophila* models of human neurodegenerative disease // Cell Death and Differentiation. – 2000. – Vol.7. – P. 1075–1080.
- O'Connor D.M., Boulis N.M. Gene therapy for neurodegenerative diseases // Trends in Mol. Med. – 2015. – Vol.21, is.8. – P. 504–512.
- Heisenberg M., Bohl K. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means // Naturforschung. – 1979. – Vol.34. – P. 143–147.
- Kretzschmar D., Pflugfelder G.O. Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain // Brain Research Bulletin. – 2002. – Vol.57. – P. 121–131.
- Mochizuki H., Mizuno Y. Gene therapy for Parkinson's disease // Adv. in Research on Neurodegen. – 2003. – Vol.10. – P. 205–215.
- Prussing K., Voigt A., Schulz J. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease // Mol. Neurodegeneration. – 2013. – Vol.8. – P. 35–46.
- Roselli F., Caron P. From intrinsic firing properties to selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases // Neuron. – 2015. – Vol.85, is.5. – P. 901–910.
- Xiong W.C., Okano H., Patel N.H. *Repo* encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system // Genes and Development. – 1994. – Vol.8. – P. 981–994.

Представлено: О.М.Вайсерман / Presented by: A.M.Vaiserman

Рецензент: Н.Є.Волкова / Reviewer: N.Ye.Volkova

Подано до редакції / Received: 20.03.2016