

МАТІЙЦІВ Н.П., **ТРУШ О.І.**, **ГУДИМА О.М.**, **ЧЕРНИК Я.І.**

Львівській національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: olena971@gmail.com, gudyta.oksana1993@gmail.com, yacher@mail.ru

✉ matiysiv@yahoo.com, (097) 199-32-93

РУХОВА АКТИВНІСТЬ ЛИЧИНОК *DROSOPHILA MELANOGASTER* ІЗ ЗМІНЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ ГЕНА *SWISS CHEESE*

Ген *swiss-cheese (sws)* *Drosophila melanogaster* є ортологом гена *NTE* (нейропатія індукуючої естерази) у людини; подібність амінокислотного складу продуктів цих генів складає 39 % [1]. *NTE* є консервативним білком від дріжджів до людини, найбільший консерватизм властивий його каталітичному домену, що визначає передбачувану естеразну активність цього білка [2]. Обидва білки (у людини і у дрозофіли) експресуються в нервовій системі, локалізовані в ендоплазматичному ретикулумі і, як припускається, володіють естеразною активністю [1, 3].

Мутації в гені *NTE* зумовлюють аутосомно-рецесивну форму спадкової спастичної паралегії – *SPG39 (spastic paraplegia-39)* [4]. Спастичні паралегії характеризуються прогресуючим легким паралічем нижніх кінцівок із підвищеним тонусом м'язів унаслідок дегенерації пірамідних трактів бокових стовпів спинного мозку [5]. Білок *NTE* вперше було виявлено у гомогенатах мозку людей, ферментативна активність його блокувалася органофосфатами, що призводило до відтермінованої нейротоксичності (*organophosphorus compound-induced delayed neuropathy, OPIDN*) [6]. І *SPG39*, і *OPIDN* характеризуються дистальною дегенерацією моторних і чутливих аксонів [7]. Попри інтенсивні дослідження, конкретна роль *sws* і *NTE* у розвитку і функціонуванні нервової системи залишається не з'ясованою.

При нейропатіях у людини поведінкові порушення є важливим симптомом, тому доцільне вивчення особливостей поведінки у модельних об'єктів за функціональної зміни генів-ортологів. Метою цього дослідження було виявити, як впливає зміна функції гена *sws* на рухову поведінку личинок дрозофіли.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були нейродегенеративні Х-зчеплені мутанти – лінія *sws⁷⁶⁻¹⁵*,

одержана в нашій лабораторії шляхом хімічного мутагенезу [8], та лінія *sws¹*, люб'язно надана Dr. Doris Kretzschmar [9]. Лінія дикого типу *Oregon R* слугувала контролем. Для створення керованої зміни експресії білка *SWS* використовували трансгенні лінії: *D42-Gal4* (Bloomington *Drosophila* Stock Center), *UAS-swS-RNAi* (Vienna *Drosophila* RNAi Center), *UAS-swS* (Dr. Doris Kretzschmar), *UAS-swS-NBD::HA* та *UAS-swS-ESTD::HA*, сконструйовані нами; лінію *w¹¹¹⁸* (Bloomington *Drosophila* Stock Center).

Аналізували поведінку личинок третього віку, самців. Кожну личинку поміщали на чашку Петрі, попередньо залиту розчином 5 % агарози, дно якої було розграфлене на квадрати площею 1 см. Час адаптації для личинки становив 2 хв, після чого протягом 1 хв спостерігали, скільки сантиметрів проповзає личинка. Досліджували по 20 особин кожного генотипу у трьох повторях. Усі поведінкові тести проводили у той самий час доби за однакових умов освітлення лампою денного світла та при кімнатній температурі (+22 – +24°C).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення «Excel». Достовірність отриманих результатів перевіряли за допомогою критеріїв Пірсона або Стьюдента. Позначали (***) – достовірну різницю при рівні значущості $p \leq 0,001$; (**) – $p \leq 0,01$; (*) – $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Дрозофілі характерний складний репертуар індивідуальних поведінкових реакцій як у імаго, так і на стадії личинки. Характеристики рухової поведінки змінюються тією чи іншою мірою у разі неродегенерацій різного типу. У людини одним із перших симптомів як індукованої відтермінованої нейропатії, так і спастичних паралегій є порушення рухливості внаслідок відмирання аксонів і мотонейронів [6, 7].

© МАТІЙЦІВ Н.П., ТРУШ О.І., ГУДИМА О.М., ЧЕРНИК Я.І.

Ми використали у дослідженні два мутанти за геном *sws* – *sws*⁷⁶⁻¹⁵ та *sws*¹, особини зазначених ліній несуть різні точкові мутації у гені. В результаті аналізу рухової активності личинок мутантних ліній виявлено значне зниження активності порівняно з особинами дикого типу

(рис. 1). Подолана личинками дикого типу відстань складала 3,98 (±0,21) см. Личинки *sws*⁷⁶⁻¹⁵ за той самий час проповзали 3,02 (±0,15)***, а *sws*¹ – 2,57 (±0,10)*** см, це менше від контролю на 24,1 % та 35,4 % відповідно.

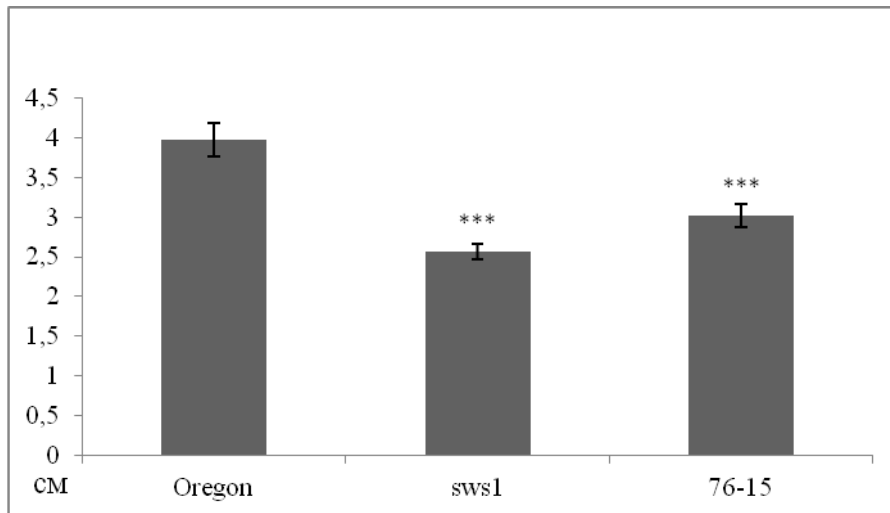


Рис. 1. Рухова активність личинок лінії дикого типу *Oregon R* та мутантів *sws*¹ і *sws*⁷⁶⁻¹⁵.

У мутантів за геном *sws* описано як дегенеративні зміни нейронів, так і глії, а для гена відома диференційна активність у різних типах клітин нервової системи [1, 10]. Саме тому застосування методу керованої експресії може допомогти з'ясувати роль досліджуваного білка в окремій групі клітин. Ми використали драйверну лінію *D42-Gal4*, що дозволяє активувати експресію послідовностей, які містяться під UAS промотором, лише у мотонейронах личинок. Так, у особин *UAS-sws/D42-Gal4* здійснено надекспресію всієї послідовності білка SWS, у *UAS-sws-NBD/D42-Gal4* – надекспресію послідовності лише нуклеотидзв'язуючих доменів, у *UAS-sws-ESTD/D42-Gal4* – надекспресію послідовності лише естеразного домену, а у *UAS-sws-RNAi /D42-Gal4* – функціональну інактивацію білка SWS. Оскільки всі трансгенні лінії сконструйовані на основі лінії *w*¹¹¹⁸, а драйверна лінія може спричиняти неспецифічний фенотип, контролем слугували самці *w/D42-Gal4*.

Контрольні особини долали відстань у 1,58 (±0,09) см, тоді як личинки із надекспресією всього білка мали достовірно вищу активність – 2,27 (±0,12)*** см, що перевищує контроль на 43,7 %. За функціонального нокауту рухливість личинок знижувалася на 16,5 % порівняно із контролем і становила 1,32 (±0,08)**

см. Надекспресія послідовностей нуклеотидзв'язуючих та естеразного доменів білка SWS не викликала змін рухової активності – 1,51 (±0,1) та 1,59 (±0,1) см відповідно (рис. 2).

Слід відзначити кореляцію між зниженням рухової активності мутантних личинок та личинок із нокадауном гена *sws* у мотонейронах. Ці результати свідчать про важливість білка SWS для забезпечення рухової поведінки на стадії личинки дрозофіли. Підвищення рухової активності за додаткової експресії SWS може також бути негативним проявом у поведінці. Для точної інтерпретації цих даних необхідні додаткові морфологічні дослідження.

Відсутність змін у рухливості личинок при додатковій експресії окремих доменів білка SWS може мати два пояснення. Можливо, білки, представлені окремими доменами, не здатні бути функціональними, і хоча для доменів припускають різні функції [3], лише перебування в одній структурі надає їм відповідних властивостей. Також імовірним є те, що значну відмінність у прояві окремих доменів неможливо виявити саме у мотонейронах личинок, оскільки в різних типах клітин та на різних стадіях онтогенезу білок проявляє себе по-різному. Така диференційна активність може виявлятися через взаємодію із специфічними для кожного типу

клітин білками-партнерами SWS. Необхідно здійснити аналіз впливу надекспресії окремих доменів білка SWS із використанням низки

драйверних ліній, які забезпечать активацію конструктів на різних стадіях онтогенезу в нейронах та гліальних клітинах мозку дрозофіли.

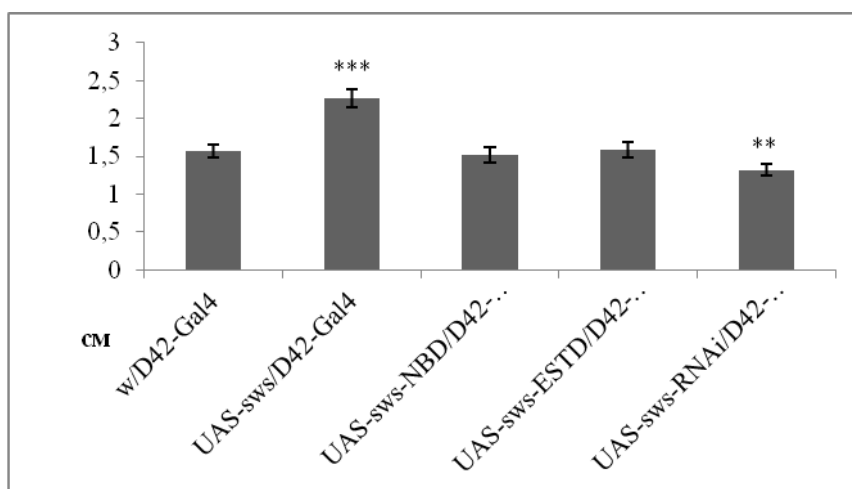


Рис. 2. Рухова активність личинок із зміненою експресією білка SWS у мотонейронах.

Висновки

Уперше показано визначальну роль гена *sws* у контролі рухової поведінки личинок *D. melanogaster*. Точкові мутанти за геном *sws* (*sws*⁷⁶⁻¹⁵ та *sws*¹) характеризувалися значним зниженням рухової активності на личинковій стадії порівняно із диким типом. Функціональне інгібування *sws* у мотонейронах призводило до

зниження, а його надекспресія – до підвищення рухової активності личинок порівняно з контролем. Надекспресія послідовностей окремих доменів білка SWS не впливала на показники руху личинок.

Робота виконана за підтримки Rotary Yonnyata Memorial Foundation (О. Труш).

Література

- Mühlig-Versen M., da Cruz A.B., Tschäpe J.A., Moser M., Büttner R., Athenstaedt K., Glynn P., Kretschmar D. Loss of Swiss cheese/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult *Drosophila* // *J Neurosci.* – 2005. – V. 25. – P. 2865–2873.
- Moser M., Stempf T., Li Y., Glynn P., Büttner R., Kretschmar D. Cloning and expression of the murine *sws/NTE* gene // *Mech Dev.* – 2000. – V. 90. – P. 279–282.
- Akassoglou K., Malester B., Xu J., Tessarollo L., Rosenbluth J., Chao M.V. Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – V. 101. – P. 5075–5080.
- Rainier S., Bui M., Mark E., Thomas D., Tokarz D., Ming L., Delaney C., Richardson R.J., Albers J.W., Matsunami N., Stevens J., Coon H., Leppert M., Fink J.K. Neuropathy Target Esterase Gene Mutations Cause Motor Neuron Disease // *The American Journal of Human Genetics.* – 2008. – V. 82. – P. 780–785.
- Fink J.K. Hereditary spastic paraplegia // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* – 2006. – V. 6. – P. 65–76.
- Johnson M. The delayed neurotoxic action of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase // *Biochem. J.* – 1969. – V. 114. – P. 711–717.
- Glynn P. Mechanism for organophosphate-induced delayed neuropathy // *Toxicology Letters.* – 2006. – V. 162. – P. 94–97.
- Shcherbata G.R., Matiytsiv, N.P., Chernik, Ya.I., Jatsenko A.S., Radysh V.V., Kucherenko M.M., Maksimiv D.V. Genetic analysis of X-chromosome *Drosophila melanogaster* neurodegenerative mutants induced by ethylmethanesulphonate and nitroethyleurea // *Genetika.* – 2004. – V. 40. – P. 1286–1292.
- Kretschmar D., Hasan S., Sharma S., Heisenberg M., Benzer S. The *swiss cheese* mutant cause glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* // *J. Neurosci.* – 1997. – V. 17. – P. 7425–7432.
- Могіляк І., Матійців Н., Черник Я. Вплив тканинно-специфічного функціонального інгібування гена *sws* на формування структури складного ока *Drosophila melanogaster* // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2013. – Вип. 62. – С. 117–122.

MATIYTSIV N.P., TRUSH O.I., GUDYMA O.M., CHERNYK Ya.I.

Ivan Franko National University of Lviv,

Ukraine, 79005, Lviv, Hrushevsky str., 4, e-mail: matiysiv@yahoo.com

LOCOMOTOR ACTIVITY OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* LARVAE WITH ALTERED FUNCTION OF GENE SWISS CHEESE

Aim. Gene *swiss cheese* (*sws*) in *Drosophila melanogaster* is ortholog of human gene Neuropathy Target Esterase (*NTE*). Point mutation in these gene lead to many neurodegenerative disorders, such as Spastic Paraplegia. The aim of this study was to determine whether the change of gene *sws* function influence in *Drosophila* larvae motor behavior.

Methods. We used two mutant lines: *sws¹* and *sws⁷⁶⁻¹⁵*; transgenic lines for UAS-Gal4 controlled expression of SWS in motoneurons. Locomotor assay was performed in third-instar larvae. **Results.** We have found that larvae *sws⁷⁶⁻¹⁵* and *sws¹* showed significant decrease of motor behavior in comparison with wild type: *sws¹* has 35.4 %, and *sws⁷⁶⁻¹⁵* 24.1 % difference with *Oregon R*. Functional knockout of *sws* in motoneuron showed decrease of motor activity as well – 16.5 % less than control. Overexpression sequences of complete SWS protein in motoneurons causes significant increment in motor activity about 43.7 %. Esterase domen and three nucleotidbinding domains overexpression in larvae motoneurons had no differences compared to control. **Conclusions.** For the first time was shown a critical role of gene *sws* for larvae motor activity in *D. melanogaster*. Flies with altered *sws* function are good model of spastic paraplegia study.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, *sws/NTE*, neuropathy, locomotor behavior.