

УДК: 577.25:615.076.9

Нейродегенеративні зміни та рухова активність у *Drosophila melanogaster* у разі тканинно-специфічної експресії гена *Sod1* в гліоцитах**М.В.Вітушинська, Н.П.Матійців, Я.І.Черник***Львівський національний університет імені Івана Франка (Львів, Україна)
m.vitushynska@gmail.com*

Встановлено, що функціональна інактивація та надекспресія гена *Sod1* у гліоцитах спричиняє виникнення нейродегенеративних змін в оптичній частці головного мозку *D. melanogaster*. Умовна площа ділянок відмерлої тканини у старих (21-денних) імаго становила $141,521 \pm 12,369$ мм² і $149,178 \pm 36,564$ мм² у випадку нокауту та надекспресії гена відповідно. У дослідних особин також зменшувалася ширина першого зорового ганглію – ламіни: $23,689 \pm 1,080$ мм (у разі інгібування) та $17,969 \pm 1,266$ мм (у разі надекспресії); у контрольних мух тканина мозку залишалась інтактною, а ширина ламіни становила $30,012 \pm 1,560$ мм. У старих особин із функціональним нокаутом гена *Sod1* в гліоцитах спостерігалась надмірна рухова активність порівняно з контрольними особинами того ж віку.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, ген *Sod1*, тканинно-специфічна експресія, нейродегенерація, гліоцити, рухова активність.

Нейродегенеративные изменения и двигательная активность у *Drosophila melanogaster* при тканеспецифической экспрессии гена *Sod1* в глии**М.В.Витушинская, Н.П.Матийцев, Я.И.Черник**

Установлено, что функциональная инактивация и надэкспрессия гена *Sod1* в глии влечет за собой возникновение нейродегенеративных изменений в оптической доле головного мозга *D. melanogaster*. Условная площадь участков отмершей ткани у старых (21-дневных) имаго составляет $141,521 \pm 12,369$ мм² и $149,178 \pm 36,564$ мм² в случае нокаута и надэкспрессии соответственно. У исследованных особей уменьшалась ширина первого зрительного ганглия – ламини: $23,689 \pm 1,080$ мм и $17,969 \pm 1,266$ мм в случае ингибирования и надэкспрессии соответственно; у контрольных мух ткань мозга оставалась интактной, ширина ламини составляла $30,012 \pm 1,560$ мм. У старых особей с функциональным нокаутом гена *Sod1* в глии наблюдалась чрезмерная двигательная активность по сравнению с контрольными особями того же возраста.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, ген *Sod1*, тканеспецифическая экспрессия, нейродегенерація, глии, двигательная активность.

Neurodegenerative changes and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* at tissue-specific expression of *Sod1* gene in glial cells**M.Vitushynska, N.Matiytsiv, Ya.Chernyk**

It has been established that functional inactivation of *Sod1* gene and its overexpression in glial cell results in neurodegenerative changes in the optical lobe of *D. melanogaster* brain. Conventional area of dead tissue sectors in older (21-day) imagoes was from $141,521 \pm 12,369$ mm² to $149,178 \pm 36,564$ mm² in the cases of a knockout and overexpression respectively. In experimental animals there has been observed the decrease in the width of the first optic ganglion – lamin: $23,689 \pm 1,080$ mm and $17,969 \pm 1,266$ mm in the cases of inhibition and overexpression respectively; in control flies the brain tissue remained intact, lamin width was $30,012 \pm 1,560$ mm. In older individuals with functional knockout of the gene *Sod1* in glial cells excessive locomotor activity has been observed in comparison with the control individuals of the same age.

Key words: *Drosophila melanogaster*, gene *Sod1*, tissue-specific expression, neurodegeneration, glial cells, locomotor activity.

Вступ

Зміни на клітинному рівні, індуковані оксидативним стресом, можуть лежати в основі нейродегенеративних розладів, а також процесу старіння. Згідно вільнорадикальної теорії старіння, оксидативний стрес залучений у формування вікових патологій (Forman et al., 2004). Мозок і нервова система загалом є найбільш чутливими до такого патогенезу. На сьогодні існують докази залучення

оксидативного стресу у розвиток багатьох нейродегенеративних захворювань людини, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, бічний аміотрофічний латеральний склероз (БАС) та ін. (Владимиров и др., 1991; Andersen, 2004). Лише для БАС відомий безпосередній зв'язок між геном *SOD1* та сімейними формами захворювання із домінуючим успадкуванням. БАС є летальним нейродегенеративним захворюванням, зумовленим селективною дегенерацією верхніх і нижніх мотонейронів, що призводить до м'язової денервації і паралічу (Forman et al., 2004). Ефективної терапії для БАС немає, тому розуміння патогенезу захворювання може допомогти в розробці ефективних методів лікування. Відомо більше 160 мутацій у гені *SOD1*, що зумовлюють токсичну активність ферменту (Andersen, 2004). Нейродегенеративні захворювання часто супроводжуються порушенням параметрів поведінки, зокрема: тремором, порушенням координації рухів, м'язовою ригідністю, гіпокінезією та гіперкінезією (Chad et al., 2014). На даний час для вивчення нейродегенеративних розладів широко використовують модельні об'єкти. *Drosophila melanogaster* має низку переваг: висока гомологія генів людини і дрозофіли, консервативність клітинних механізмів і сигнальних шляхів, складно організована нервова система та можливість проводити стандартизовану оцінку поведінкових реакцій (Crapo et al., 1992).

Попередньо нами було з'ясовано, що функціональна інактивація та надекспресія гена *Sod1* у нейронах (з використанням драйвера *elav-Gal4*) *D. melanogaster* зумовлювала зниження тривалості життя дослідних комах, проте специфічного нейродегенеративного фенотипу в структурі мозку не спостерігалося (Вітушинська та ін., 2015). Це дає змогу припустити, що всупереч очікуванням, дисфункція ферменту Cu/Zn супероксиддисмутази у нейронах не є визначальною причиною формування нейродегенеративного фенотипу у мутантів дрозофіли. Ймовірно, первинна дегенерація виникає в інших клітинах мозку або відростках нейронів, а масштабне відмирання тканини, що захоплює власне нейрони, відбувається вторинно (Dirrena et al., 2015). Нещодавні дослідження вказують на участь у патогенезі нейродегенеративних захворювань автономного механізму, в якому беруть участь суміжні і функціонально споріднені клітини, такі як олігодендроцити, астроцити та мікроглія (Tafari et al., 2015).

Метою роботи було дослідити вплив тканинно-специфічної експресії *Sod1* у гліальній тканині на розвиток нейродегенеративних змін та рухову активність *D. melanogaster*.

Об'єкти та методи дослідження

Матеріалом досліджень були трансгенні лінії *D. melanogaster*, одержані з Bloomington Drosophila Stock Center:

w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}$ – експресує dsRNA для RNA інтерференції гена *Sod1*, під контролем UAS промотора;

w^{1118} ; $P\{UAS-Sod1\}$ – експресує додаткову копію гена *Sod1*, під контролем UAS промотора; драйверна лінія *Repo-Gal4/TM3, Ser* (люб'язно надана проф. К.-Ф.Фішбахом) – специфічно експресує Gal4 у всій гліальній тканині мозку дрозофіли.

Тканинно-специфічну експресію генів здійснювали за допомогою бінарної UAS-Gal4 системи (Jones, 2009).

Відомо, що драйверні лінії можуть мати власний неспецифічний фенотип (Jones, 2009), тому для виключення даного ефекту позитивним контролем слугували особини першого покоління від схрещування драйверної лінії з диким типом (*Repo-Gal4/Oregon-R*); негативним контролем була лінія дикого типу *Oregon-R*.

Культури утримували на стандартному середовищі за температури 25°C (Ashburner, 1989).

Дегенеративні зміни в тканині виявляли на гістологічних зрізах мозку дрозофіли, виготовлених за стандартною методикою (Heisenberg, Bohl, 1979). Аналізували препарати на мікроскопі LobaVal-3 Corl 2 Zeiss-Jena в ультрафіолетовому світлі при збільшенні 15×40. Площу відмерлих ділянок у тканині мозку трансгенних особин обчислювали, аналізуючи мікрофотографії у графічному редакторі Komras 13 portable mini. Підраховували загальну кількість пікселів виділеної ділянки на фотографії з подальшим автоматичним переведенням даного показника в мм², враховуючи роздільну здатність опрацьованого зображення. Результати представлені у вигляді $M \pm m$ (M – середнє арифметичне, m – похибка середнього арифметичного). Аналізували не менше 10 особин кожного генотипу (Chad et al., 2014).

Для оцінки рухової активності методом «відкритого поля» використовували установку, яка складалась із скляної чашки Петрі діаметром 7 см, дно якої розграфлене на квадрати зі стороною 0,5

см. Чашку накривали плоскою скляною накривкою із такого ж скла. Протягом експерименту проводили 10-хвилинний відеозапис після 2-хвилинної адаптації мух. Відзнятий матеріал аналізували на комп'ютері, оцінювали довжину пробігу в сантиметрах, при цьому перетин одного квадрата рахували пробігом 0,5 см. В кожному досліді аналізували молодих (3–4-денних) та старих (19–21-денних) самців індивідуально, не менше 10 особин кожного генотипу та вікової категорії (Матійців та ін., 2013).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel 03. Достовірність отриманих результатів перевіряли за допомогою двофакторного Т-тесту з різними дисперсіями та критерію Пірсона. Двома зірочками позначено (**) достовірну різницю при рівні значущості $p \leq 0,01$, однією (*) – $p \leq 0,05$.

Результати і обговорення

Для визначення ролі білка Sod1 у формуванні та функціонуванні гліальної тканини мозку дрозофіли нами було застосовано тканинно-специфічний функціональний нокаут і надекспресію послідовності Sod1 із використанням бінарної системи UAS/Gal4 (Jones, 2009).

Особини необхідного генотипу (w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$ та w^{1118} ; $P\{UAS-Sod1\}/Repo-Gal4$) одержували в першому поколінні. Контролем у даному випадку були імаго $Repo-Gal4/Oregon-R$ та $Oregon-R$.

Унаслідок аналізу тканини мозку мух з генотипом w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$ із функціональним нокаутом гена Sod1 у глії було виявлено специфічний фенотип ($n=100$ особин кожного генотипу) (рис. 1). В ділянці, що відповідає переходу ламіни у ретину та медулу, де є найбільше скупчення гліоцитів, спостерігалися поодинокі ділянки відмерлої тканини мозку вже у молодому (3-денному) віці. При старінні комах нейродегенеративні зміни були більш широкими. У старих (21-денних) комах зони нейродегенерації були чітко сформованими. Аналогічний фенотип спостерігався і у разі надекспресії дослідного гена. У контрольних особи із генотипом $Repo-Gal4/Oregon-R$ структура тканини у цій ділянці мозку була суцільною в імаго двох вікових категорій (рис. 1).

Для кількісної оцінки нейродегенеративних змін ми обрахували площу зон відмерлої тканини, аналізуючи мікрофотографії за допомогою графічного редактора Kompas 13 portable mini. Встановлено, що середня площа відмерлих ділянок в оптичній частці мозку 3-денних особин складала $106,810 \pm 11,388$ мм² у випадку нокаута та $119,178 \pm 15,126$ мм² у разі надекспресії гена Sod1 в гліоцитах. У контрольних мух тканина мозку була неушкодженою (табл. 1). З віком (у 21-денних імаго) площа нейродегенерації збільшувалася і становила $141,521 \pm 12,369$ мм² та $149,178 \pm 36,564$ мм² у випадку нокаута та надекспресії гена Sod1 відповідно (табл. 1).

Таблиця 1.

Умовна площа зон дегенерації в оптичній частці мозку імаго *D. melanogaster* різного віку в контролі та у разі тканинно-специфічної експресії гена Sod1 у гліоцитах

Генотип ♂, n=10	Площа зон дегенерації, мм ² (M±m)	
	3-денні імаго	21-денні імаго
<i>Oregon R/Repo-Gal4</i>	0	0
w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$	$106,810 \pm 11,388$	$141,521 \pm 12,369^{**}$
w^{1118} ; $P\{UAS-Sod1\}/Repo-Gal4$	$119,178 \pm 15,126$	$149,178 \pm 36,564^*$

Примітка: рівні значущості $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,05$ (*) порівняно із контрольними особинами.

Аналізуючи оптичну частку мозку особин із тканинно-специфічною експресією гена Sod1 у гліоцитах, ми помітили ще одну морфологічну зміну – зменшення ширини ламіни, так званий фенотип «вузької ламіни». У дослідних комах такий фенотип спостерігався вже у молодому віці – ширина ламіни становила $24,909 \pm 1,456$ у випадку нокаута та $22,163 \pm 2,456$ у разі надекспресії, в той час як у контрольних комах – $29,047 \pm 2,031$. У 21-денних контрольних імаго ширина ламіни становила $30,012 \pm 1,560$ мм, у той час як у дослідних комах з віком спостерігалось статистично достовірне зниження даного показника до $23,689 \pm 1,080$ мм у випадку нокаута та до $17,969 \pm 1,266$ мм у разі надекспресії гена Sod1 (табл. 2, рис. 1).

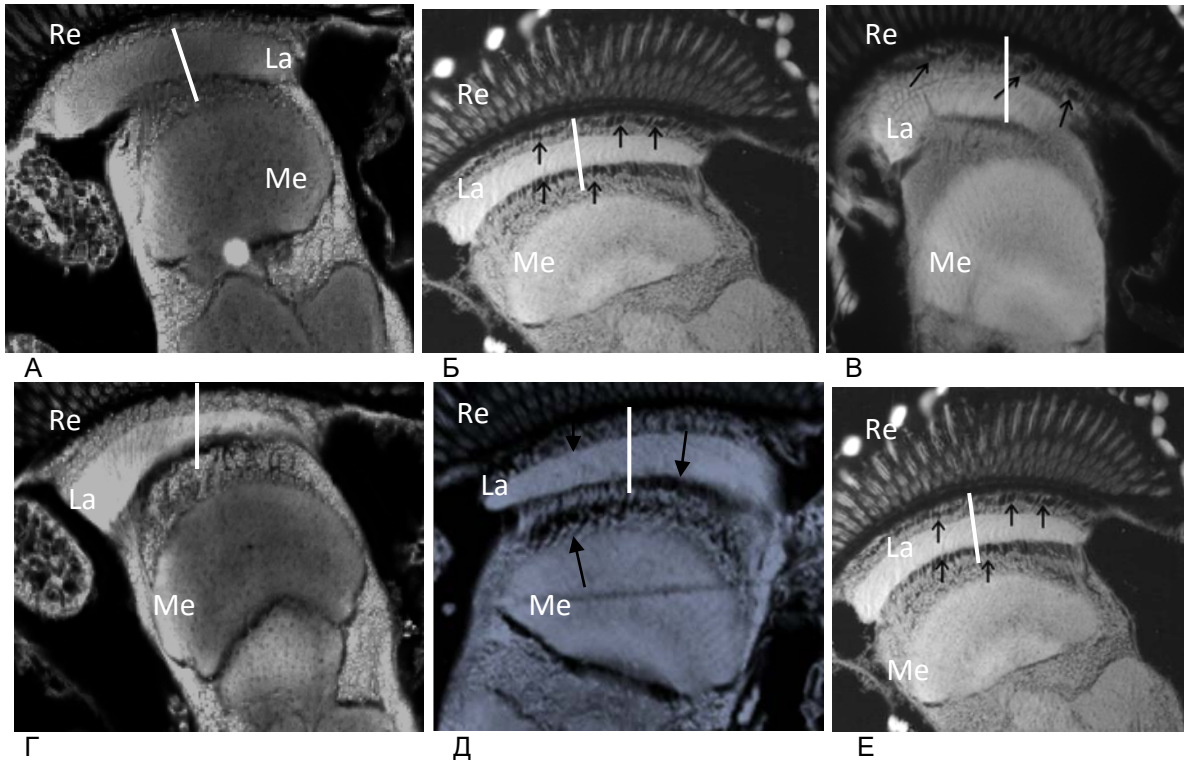


Рис. 1. Фенотип тканини мозку імаго *D. melanogaster* двох вікових груп (3-денні та 21-денні): А) молоді контрольні особини *Repo-Gal4/Oregon R*; Б) молоді особини *UAS-Sod1-RNAi/Repo-Gal4*; В) молоді особини *UAS-Sod1/Repo-Gal4*; Г) старі контрольні особини *Repo-Gal4/Oregon R*; Д) старі особини *UAS-Sod1-RNAi/Repo-Gal4*; Е) старі особини *UAS-Sod1/Repo-Gal4*. Re – ретина, La – ламіна, Me – медула. Стрілки вказують на нейродегенеративні зміни у тканині мозку; ділянка, в якій визначали ширину ламіни, – біла лінія

Використана нами драйверна лінія *Repo-Gal4* забезпечує активацію експресії генів в усіх типах гліальних клітин. У ламіні можна розрізнити шість морфологічно відмінних класів гліальних клітин, що утворюють відповідні популяції і розташовані в дистально-проксимальній площині в наступній послідовності: верхівкова глія, глія псевдокартриджу, дистальна (зовнішня) та проксимальна (внутрішня) сателітна глія, епітеліальна та маргінальна глія (Aritz, Salecker, 2014). В інших ділянках мозку дрозофіли структура глії є менш складною. Виявлений нами фенотип «вузької ламіни» дозволяє припустити, що зміна експресії гена *Sod1* у глії може призводити не лише до дегенерації тканини, але і до порушення нормального формування складних структур оптичної частки мозку дрозофіли.

Таблиця 2.

Умовна ширина ламіни в імаго *D. melanogaster* різного віку в контролі та у разі тканинно-специфічної експресії гена *Sod1* у гліюцитах

Генотип ♂, n=10	Ширина ламіни, мм (M±m)	
	3-денні імаго	21-денні імаго
<i>Oregon R/Repo-Gal4</i>	29,047±2,031	30,012±1,560
<i>w[*]; P{UAS-Sod1-RNAi}/Repo-Gal4</i>	24,909±1,456	23,689±3,080**
<i>w¹¹¹⁸; P{UAS-Sod1}/Repo-Gal4</i>	22,163 ±2,456	17,969±1,266**

Примітка: рівень значущості $p \leq 0,05$ (*) порівняно із контрольними особинами

Для з'ясування впливу тканинно-специфічної експресії гена *Sod1* у гліюцитах на рухову активність дослідних комах ми використали метод «відкритого поля». Метод ґрунтується на фіксації довільної поведінки комах і дозволяє оцінити одразу декілька поведінкових параметрів: час спокою, час вмивання, загальний пробіг та кількість стрибків. Оцінювали самців двох вікових груп – молодих (3–5-денних) та старих (21-денних).

У молодих контрольних імаго (*Repo-Gal4/Oregon-R*) та особин із функціональним нокаутом гена *Sod1* (w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$) параметри рухової активності не відрізнялися. З віком у контрольних самців достовірно зменшувався загальний пробіг, що вказує на закономірне зниження довільної рухової активності із старінням. У старих трансгенних особин (w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$), цей показник достовірно зростав порівняно з контролем (табл. 3). Разом з тим, у цих особин суттєво зменшувався час спокою; щодо часу вмивання і кількості стрибків, то ці показники достовірно не відрізнялися від значень контрольних імаго (*Repo-Gal4/Oregon-R*).

Таблиця 3.

Рухова активність у «відкритому полі» молодих (3–5-денних) і старих (19–21-денних) самців *D. melanogaster* в контролі та із функціональною інактивацією гена *Sod1*

Генотип ♂, n=10	Параметри рухової активності							
	Час спокою, хв. (M±m)		Час вмивання, хв. (M±m)		Загальний пробіг, см (M±m)		Кількість стрибків, n (M±m)	
	молоді	старі	молоді	старі	молоді	старі	молоді	старі
<i>Oregon-R/Repo-Gal4</i>	0,473± 0,18516	0,833± 0,3015	3,602± 0,68029	4,759± 0,592	248,540± 46,961	121,470± 22,195*	6,304± 1,158	6,523± 1,403
w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$	0,155± 0,093	0,041± 0,016*	4,177± 0,851	2,782± 0,534*	213,540± 44,355	222,400± 32,476*	5,416± 1,876	5,416± 0,681

Примітка: рівень значущості $p \leq 0,05$ (*) порівняно із контрольними особинами.

Подібний стан гіперкінезії описано у людей із деякими нейрональними розладами, зокрема у разі хореї Гентінгтона (Матійців та ін., 2013). Гіперкінезія – це стан, що супроводжується надмірними аномальними або нормальними рухами, які виникають унаслідок порушення контролю локомоторної активності. Для з'ясування природи підвищеної рухливості особин необхідно провести додаткові поведінкові тести.

Таким чином, нами з'ясовано, що для формування мозкових структур у *D. melanogaster* необхідною є нормальна (оптимальна) експресія гена *Sod1* у гліюцитах. Як функціональний нокаут, так і надекспресія *Sod1* спричиняють нейродегенеративні зміни та появу фенотипу «вузької ламіни», які прогресують з віком. Вочевидь, зазначені зміни у мозку призводять до порушення параметрів поведінки і надмірної активності комах в процесі старіння.

Список літератури

- Вітушинська М.В., Матійців Н.П., Черник Я.І. Вплив тканинно-специфічної експресії генів супероксиддисмутази у клітинах мозку на чутливість до умов оксидативного стресу і життєздатність *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 2015. – Т.49, №2. – С. 21–28. /Vitushins'ka M.V., Matiytsiv N.P., Chernyk Ya.I. Vplyv tkanyнно-spetsyfychnoi ekspresii geniv superoksyddysmutazy u klitynakh mozku na chutlyvist' do umov oksydatyvnoho stresu i zhittyezdatsnist' *Drosophila melanogaster* // Tsytologiya i genetyka. – 2015. – Т.49, №2. – С. 21–28./
- Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1991. – Т.29. – С. 3–250. /Vladimirov Yu.A., Azizova O.A., Deyev A.I. i dr. Svobodnyye radikaly v zhivyykh sistemakh // Itogi nauki i tekhniki. Ser. Biofizika. – 1991. – Т.29. – С. 3–250./
- Матійців Н.П., Могиляк І.І., Труш О.І., Черник Я.І. Рухова активність нейродегенеративних мутантів *Drosophila melanogaster* // Вісник Одеського університету. Серія біологічна. – 2013. – Вип.2 (31). – С. 70–76. /Matiytsiv N.P., Mogylyak I.I., Trush O.I., Chernyk Ya.I. Rukhova aktyvnist' neyrodegeneratyvnykh mutantiv *Drosophila melanogaster* // Visnyk Odes'kogo universytetu. Seriya biologichna. – 2013. – Vyp.2 (31). – С. 70–76./
- Andersen J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? // Journal of Natural Medicines. – 2004. – Vol.10. – P. 18–25.
- Ashburner M. *Drosophila: a laboratory manual*. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – 456p.

-
- Chad M., Artymovych N., Makarenko O., Matiytsiv N. Effects of mitochondrin-2 on the dynamics of degeneration of brain tissues in *Drosophila* with an altered function of the *swiss cheese* gene // *Neurophysiology*. – 2014. – Vol.6. – P. 455–460.
- Crapo J.D., Oury T., Rabouille C. et al. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – Vol.89. – P. 10405–10409.
- Dirrena E., Aebischer J., Rochat C. et al. SOD1 silencing in motoneurons or glia rescues neuromuscular function in ALS mice // *Annals of Clinical and Translational Neurology*. – 2015. – Vol.2. – P. 167–184.
- Forman M.S., Trojanowski J.Q., Lee V.M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs // *Journal of Natural Medicines*. – 2004. – Vol.10. – P. 1055–1063.
- Tafari F., Ronchi D., Magri F. et al. SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis // *Cell. Neurosci*. – 2015. – Vol.9. – P.336.
- Heisenberg M., Bohl K. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means // *Naturforsch.* – 1979. – Vol.34. – P. 143–147.
- Apitz H., Salecker I. A challenge of numbers and diversity: neurogenesis in the *Drosophila* optic lobe // *Journal of Neurogenetics*. – 2014. – Vol.28 (3–4). – P. 233–249.
- Jones W.D. The expanding reach of the GAL4/UAS system into the behavioral neurobiology of *Drosophila* // *BMB Rep.* – 2009. – Vol.42. – P. 705–712.

Представлено: О.М.Вайсерман, Я.П.Бобак / Presented by: A.M.Vaiserman, Ya.P.Bobak
Рецензент: Н.Є.Волкова / Reviewer: N.Ye.Volkova
Подано до редакції / Received: 15.03.2016