

**ГЕНЕТИЧНЕ КАРТУВАННЯ Х-ЗЧЕПЛЕНИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИХ  
МУТАЦІЙ У *DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Н. Матійців**

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

Проаналізовано нейродегенеративні мутації *Drosophila melanogaster*, індуковані етилметансульфонатом, на домінантність/рецесивність. Виявлено, що серед 11 мутацій, які зумовлюють структурні зміни в мозку, дві домінантні та дев'ять рецесивних. Шляхом делеційного картування чотири рецесивні мутації локалізовано в певних ділянках Х-хромосоми: мутації 60-15 та 60-16 у 012D02 ділянці Х-хромосоми або 013A02 – 05; мутації 61-7 та 65-10 у 001A01 або 002A ділянці Х-хромосоми.

*Ключові слова:* *Drosophila melanogaster*, нейродегенерація, генетичний аналіз, делеційне картування.

Нейродегенерація є характерною ознакою хвороб центральної нервової системи, що виявляються в пізньому онтогенезі в різноманітних організмів – від людини до нематод. Багато досліджень [6, 10, 16] на червах, плодових мушках, мишах та людях дало змогу виявити, що подібні патології мають в основі ушкодження на генетичному рівні: часто це є результатом мутантної зміни лише одного гена. Деякі мутації *Drosophila* спричиняють тканинно-специфічну нейродегенерацію в разі старіння [9]. Подібні дослідження на *Drosophila melanogaster* достатньо інформативні, вони доводять, що плодова мушка – це хороша система для моделювання нейродегенеративних розладів людини [18, 10]. Наприклад, експресія людського  $\alpha$ -синуклеїну і тау білків у нервовій системі дрозофіли спричиняли розвиток нейродегенеративних змін, які за багатьма фенотиповими проявами нагадували хвороби Паркінсона та Альцгеймера [20]. Молекулярні механізми цих захворювань стали зрозумілими завдяки використанню генетичних методів, що дають змогу швидко ідентифікувати і клонувати гени, які відповідають за ці відхилення. Значна фенотипова подібність у прояві різних нейродегенеративних розладів між дрозофілою та людиною свідчить, що дрозофіла – вдалий модельний об'єкт для з'ясування ключових механізмів.

Крім моделювання дегенерації нервової системи шляхом експресії людських генів у геномі дрозофіли, триває пошук нових генних мутацій, що зумовлюють нейродегенерацію. До відомих Х-зчеплених мутантів зі змінами в мозку належать *drop-dead*, *swiss cheese*, *eggroll*, *spongecake*, *bubblegum* [5, 13, 15, 15]. Вони мають знижену тривалість життя порівняно з особинами дикого типу та виявляють пов'язану з віком нейропатологію.

Ми мали на меті виконати генетичне картування нейродегенеративних мутацій *D. melanogaster* в певній ділянці Х-хромосоми. У дослідженнях використано 11 ліній нейродегенеративних мутантів по Х-хромосомі, отриманих шляхом індукованого етилметансульфонатом мутагенезу [1] та лінію дикого типу *Oregon*. Тестерними лініями слугували культури 998 та 1329, одержані з Bloomington *Drosophila* Stock Center (університет штату Індіана, США): 998 Df(1)RK2/FM7a і 1329 Df(1)BA1, w[\*]/FM7a; Dp(1;2)E1, y[+]/+; самки цих ліній в одній з Х-хромосом несуть делецію, а в іншій – маркерні мутації.

Тест на домінантність нейродегенеративних мутацій полягав у проведенні індивідуальних реципрокних схрещувань особин мутантних ліній з лінією дикого типу *Oregon*. Аналізували особин першого покоління: якщо гетерозиготна особина виявляла мутантний фенотип – зміни в структурі мозку, то мутацію вважали домінантною; якщо ж у самок першого покоління не виявлялось змін у тканині мозку, то мутацію зачисляли до рецесивних.

Локалізацію рецесивних мутацій проводили шляхом схрещування самців нейродегенеративних мутантів по Х-хромосомі із самками лінії, що несе делецію у певній ділянці Х-хромосоми (рис. 1). Завдяки наявності домінантної маркерної мутації *Bar* у тестерної лінії [14] серед гетерозиготних самок першого покоління відбирали для аналізу тих, у яких не виявляли фенотипу *Bar*. Це означало, що у них в одній з гомологічних хромосом міститься нейродегенеративна мутація, а в іншій – делеція.

Фенотиповий аналіз мозку виконували у самок 20-денного віку на гістологічних препаратах, які виготовляли за стандартною методикою [13]. Препарати аналізували за допомогою мікроскопа Carl Zeiss Jena зі збільшенням 12×40 в ультрафіолетовому світлі. Дрозофіл утримували при температурі 25°C у цукрових склянках на стандартному поживному середовищі [3]. Тестуванням 11 Х-зчеплених мутантних ліній *D. melanogaster* зі структурними змінами в мозку на домінантність виявлено дев'ять культур (2-14, 60-15, 60-16, 61-7, 65-10, 72-2, 72-7, 76-15, 77-4) з рецесивним фенотипом та дві культури (67-2 і 71-21) з домінантним.

З використанням делеційного картування для локалізації рецесивних мутацій ми провели 18 схрещувань самок делеційних ліній з самцями нейродегенеративних мутантів. Результати схрещувань наведені в таблиці. Мутації 60-15 та 60-16 локалізовано в ділянці делецій, які несе лінія 998, а саме: 012D02 або 013A02-05 Х-хромосоми. Ділянка 013A02-05 захоплює місце, в якому картовано відомі мутації *drop-dead*, *ethergo-go*, в ділянці 012D02 Х-хромосоми картовано ген *bendless*. Усі ці гени задіяні у формуванні структур головного мозку.

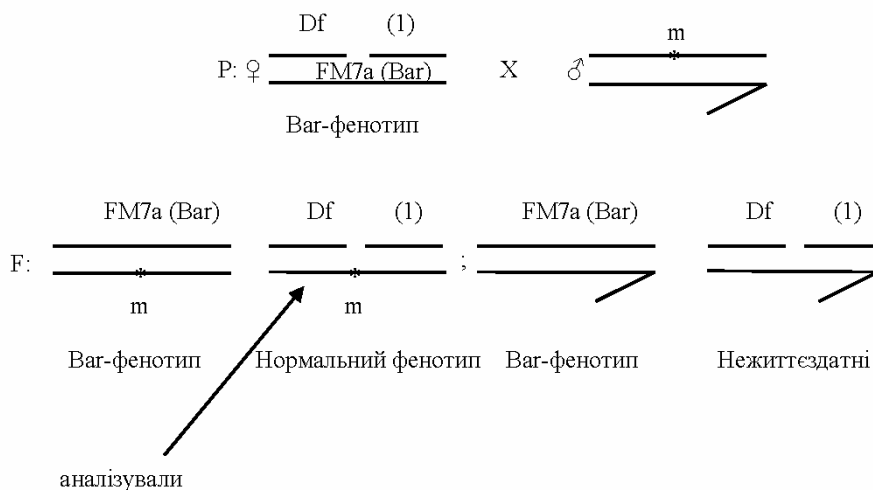


Рис. 1 Схема схрещування нейродегенеративних мутантів дрозофіли по Х-хромосомі з делеційними лініями: \**m* – схематичне позначення нейродегенеративної мутації, яку несе Х-хромосома; *Df* (1) – схематичне позначення Х-хромосоми, що несе делецію.

Результати схрещувань нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*  
з делеційними лініями,  $n = 2$

Лінії	2-14	60-15	60-16	61-7	65-10	72-2	72-7	77-4	76-15
998	+	M	M	+	+	+	+	+	+
1329	+	+	+	M	M	+	+	+	+

Примітка: + – Нормальний фенотип; M – мутантний фенотип.

Відомо [5], що мутанти *drop-dead* мають дуже коротку тривалість життя – більшість особин гинуть на четвертий день після вильоту імаго. Продуктом гена *eag* є одна з субодиниць калієвого каналу [7, 4, 21]. Мутація в цьому гені спричиняє порушення збудливості моторних нейронів, ольфакторної чутливості, поведінкових реакцій – знижується здатність до навчання, у самців змінюється ритуал залицяння [7]. Всі фенотипові прояви цієї мутації зумовлені дефектною структурою калієвих каналів. Також є дослідження Ягера та ін. [21], які доводять участь гена *eag* у процесах формування глії. Ген *ben* кодує протеїн, який близько споріднений з убіквітинозв'язувальним ферментом, що каталізує ковалентне приєднання убіквітину до протеолітичного субстрату. Міссенс-мутація в ділянці висококонсервативного активного центра ферменту призводить до ряду функціональних змін на організменому рівні [17, 8, 19], серед яких – порушення утворення синаптичних зв'язків між нейронами центральної нервової системи. Можна припустити, що нейродегенеративні мутанти 60-15 та 60-16, одержані в нашій лабораторії, містять мутацію в одному з цих генів. Максимальна тривалість життя особин ліній 60-15 та 60-16 становить 35 та 43 дні, відповідно, що на 52–41% менше, ніж в особин дикого типу [2], але значно більше, ніж у мух з мутацією *drop-dead*. Зазначені факти свідчать, що мутація в гені *eag* може бути причиною нейродегенеративних змін у структурі мозку дрозофіли, а цей ген може бути кандидатом для детального вивчення. На підставі цього ми припускаємо, що в нашій лабораторії одержані мутації, які можуть бути алельними формами мутацій *drop-dead*, *eag*, *ben*.

Мутації 61-7 та 65-10 картовано в ділянках 001A01 або 002A X-хромосоми, які відповідають делеціям тестерної лінії 1329 (див. таблицю). Описана Бензером та Міном [15] мутація *spongecake* локалізована в одній з цих ділянок – 001A01. Мухи *spongecake* живуть до 60 днів, що лише на 17% менше від тривалості життя у мух дикого типу. Зміни в структурі мозку в разі мутації *spongecake* виявляються у значній вакуолізації тканини в оптичній ділянці мозку [15]. Подібні характеристики тривалості життя та нейродегенеративного фенотипу має лінія 65-10 (рис. 2, б). Це дає підстави вважати, що зміни у мозку особин цієї лінії зумовлені мутацією саме в гені *spongecake*, однак для точного ствердження необхідно виконати молекулярний аналіз.

Щодо лінії 61-7, то вона має дещо інші фенотипові прояви: тривалість життя становить 45 днів, а нейродегенеративні зміни виявляються у вигляді зон відмирання нервової тканини по всій структурі мозку (див. рис. 2, в). Тому ми припускаємо, що мутацію 61-7 треба картувати в ділянці 002A X-хромосоми. Ця ділянка досить велика (100 Kb) (рис. 3) і містить 16 генів, функція яких ще не відома: *CG3056*, *CG14772*, *CG14773*, *CG3719*, *CG32813*, *CG14774*, *CG11448*, *CG14785*, *CG14779*, *CG14786*, *CG14787*, *CG14788*, *CG14780*, *CG14777*, *CG32808*, *CG14778*. Шляхом комп'ютерного аналізу з'ясовано, до якого класу належать продукти таких генів: *SNF 1A* – треоінкіназа, *O-fut2* – фукозилтрансфераза. Ген *l(1)2Ac* у гомозиготному стані спричиняє летальний ефект. Серед інших генів, картованих у цій ділянці, є описаний у літературі ген *futsch* [12, 22].

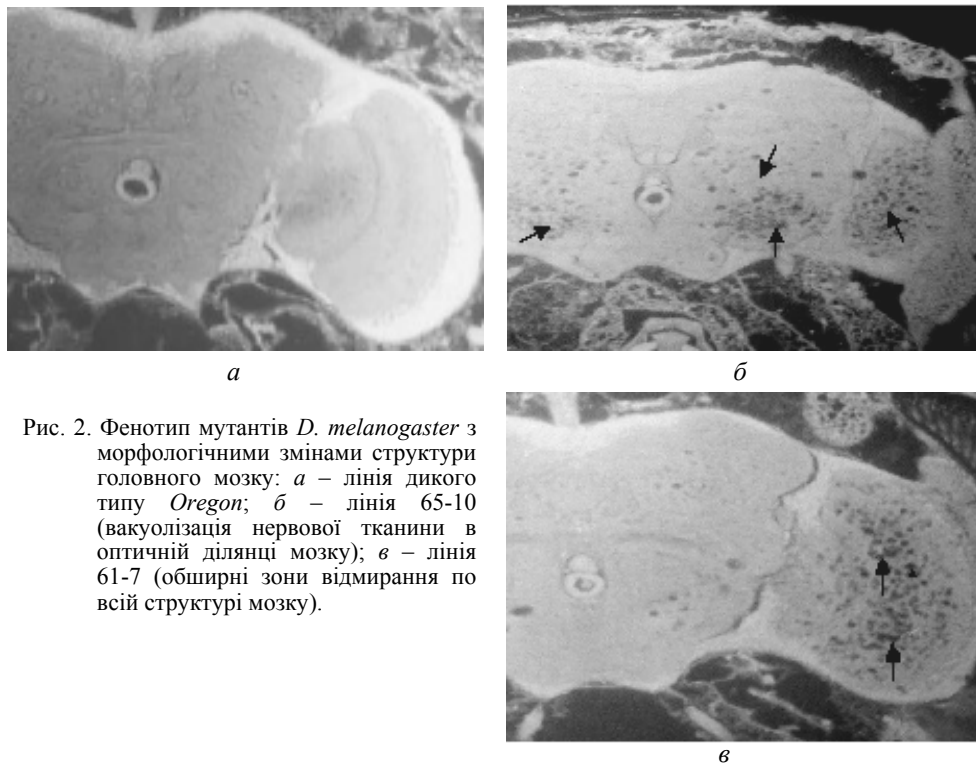


Рис. 2. Фенотип мутантів *D. melanogaster* з морфологічними змінами структури головного мозку: *а* – лінія дикого типу *Oregon*; *б* – лінія 65-10 (вакуолізація нервової тканини в оптичній ділянці мозку); *в* – лінія 61-7 (обширні зони відмирання по всій структурі мозку).

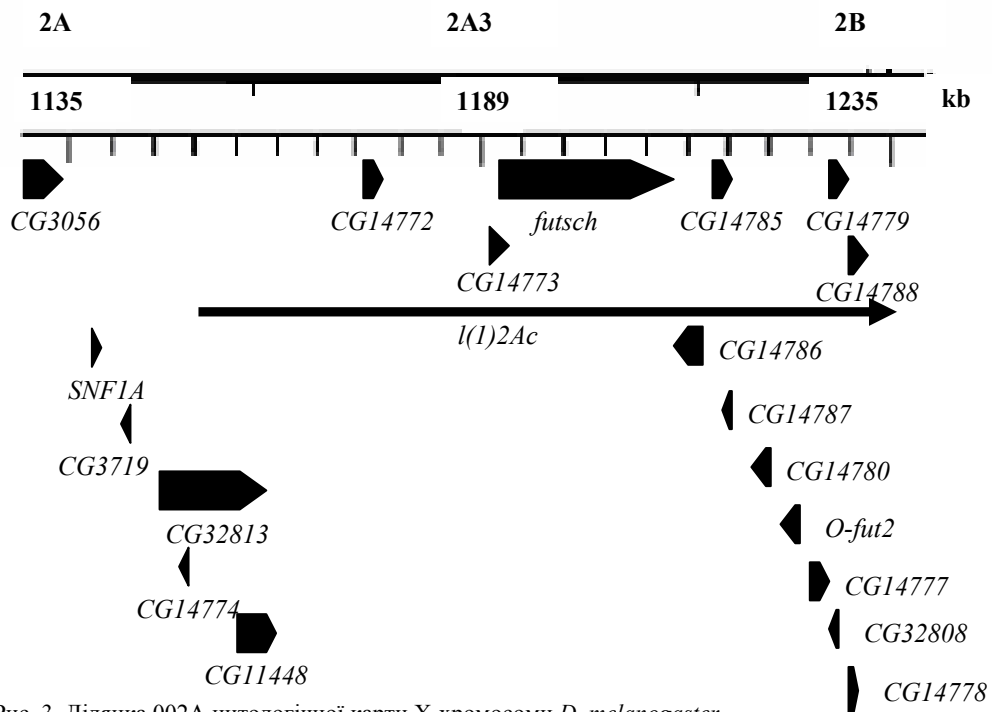


Рис. 3. Ділянка 002А цитологічної карти Х-хромосоми *D. melanogaster*.

Продукт цього гена складається з 5327 амінокислотних залишків і бере участь у формуванні мікротубул. Білок Futsch експресується лише в нервовій системі та необхідний для формування дендритів і аксонів під час ембріонального розвитку [12, 22]. Мутація в цьому гені може спричинювати ранню нейродегенерацію, подібну до тої, яка простежується в особин 61-7.

Для точнішої локалізації описаних мутацій необхідні додаткові експерименти щодо полімеразно-ланцюгової реакції клонування відповідних генів та визначення їхньої повної нуклеотидної послідовності. Порівняння цих даних з нуклеотидними послідовностями генів дикого типу дасть змогу виявити можливі причини нейродегенеративних порушень у мутантних ліній та передбачити молекулярні механізми процесів, що є в основі цих змін.

1. Щербата Г.Р., Матійців Н.П., Черник Я.И., Максимів Д.В. Химически индуцированный мутагенез у *Drosophila melanogaster* с целью получения мутантов с изменениями в структуре мозга // Генетика. 2004. Т. 40. № 9. С. 1280-1285.
2. Щербата Г.Р., Матійців Н.П., Черник Я.И., и др. Генетический анализ нейродегенеративных мутантов *Drosophila melanogaster* по X-хромосоме, индуцированных этилметансульфонатом и нитрозоэтилмочевинной // Генетика. 2004. Т. 40. № 9. Р. 1286-1292.
3. Ashburner M. *Drosophila*. N.Y.: Cold Spring Harbor Univ. Press., 1989. Vol. 1. 1331 p.
4. Broughton S.J., Kitamoto T, Greenspan R.J. Excitatory and inhibitory switches for courtship in the brain of *Drosophila melanogaster* // Curr Biol. 2004. Vol. 14. P. 538-47.
5. Buchanan R.L., Benzer S. Defective glia in the *Drosophila* brain degeneration mutant *drop-dead* // Neuron. 1993. Vol. 10. P. 839-850.
6. Driskoll M., Gerstbrein B. Dying for a case: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration // Nature Review Genetics. 2003. Vol. 4. P. 181-194.
7. Dubin A.E., Liles M.M., Harris G.L. The K1 Channel Gene *Ether a Go-Go* Is Required for the Transduction of a Subset of Odorants in Adult *Drosophila melanogaster* // J. of Neuroscience. 1998. Vol. 18. P. 5603-5613.
8. Edgecomb, R.S., Ghetti, C., Schneiderman, A.M. Bendless alters thoracic musculature in interacting neurotransmitter-mediated signaling pathways // PNAS. 2001. Vol. 98. P. 10445-10450.
9. Feany M.B., Bender W.W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease // Nature. 2000. Vol. 404. P. 394-398.
10. Fortini M.E., Skupski M.P., Boguski M.S. et al. A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome // J. Cell Biol. 2000. Vol.150. F23-F30.
11. Heisenberg M., Bohl K. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means // Z Naturforsch. 1979. Vol. 4. P 143-147.
12. Hummel T., Krukkert K., Roos J. et al. *Drosophila* Futsch / 22C10 is a MAP1B like protein required for dendritic and axonal development // Neuron. 2000. Vol. 26. P. 357-370.
13. Kretschmar D., Hasan G., Heisenberg M., Benzer S. The swiss cheese mutant glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* // J.Neurosci. 1997. Vol. 17. N 19. P. 7425-7432.
14. Lindsley D., Zimm G. The genome of *Drosophila melanogaster*. NY.: Academic Press, 1992. 523 p.

15. *Min K. T. and Benzer S.* Spongecake and eggroll: the hereditary diseases in *Drosophila* resemble pattern of human brain degeneration // *Curr. Biol.* 1997. Vol. 7. P. 885-888.
16. *Min K.T., Benzer S.* Preventing neurodegeneration in the *Drosophila* mutant *bubblegum* // *Science*. 1999. Vol. 284. P. 1985-1988.
17. *Muralidhar M.G., Thomas J.B.* The *Drosophila* bendless gene encodes a neural protein related to ubiquitin-conjugating enzymes // *Neuron*. 1993. Vol. 11. P.253-266.
18. *Mutsuddi M., Nambu J.R.* Neural disease: *Drosophila* degenerates for a good cause // *Curr. Biol.* 1998. Vol. 8. R809 - 811.
19. *Thomas R.E., Fort M., Cone.D.* Photoreceptor pathfinding defects in *Drosophila* attractin homologue, distracted, mutants linked to an interaction with bendless // *A. Dros. Res. Conf.* 44. 2003. P. 717.
20. *Wittmann C.W., Wszolek M.F., Shulman P.M. et al.* Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles // *Science*. 2001. Vol. 293. P. 711-714.
21. *Yager J., Richards S., Hekmat-Scafe D. S.* Control of *Drosophila* perineurial glial growth by *Drosophila* // *J. Neurogenet.* 1993. Vol. 8(4). P. 201-219.
22. *Zhang Y.Q., Bailey A.M., Matthies H.J. et al.* *Drosophila* fragile Z-related the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function // *Cell*. 2000. Vol. 30. P. 591-603.

#### GENETIC MAPPING OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* X-BOUND NEURODEGENERATIVE MUTATIONS

**N. Matiytsiv**

*Ivan Franko National University of Lviv  
Hrushevskogo str., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: m.n.p@mail.ru*

*Drosophila melanogaster* ethylmethanesulphonate-induced neurodegenerative mutations were analysed on dominance/recessiveness. It was found that, among 11 mutations causing brain changes, 2 mutations were dominant and 9 were recessive. By deficiency mapping, 4 recessive mutations were localized in certain areas of X chromosome: mutations 60-15 and 60-16 in 012D02 region or 013A02 05 region; mutations 61-7 and 65-10 in 001A01 or 002A region of X chromosome.

*Key words:* *Drosophila melanogaster*, neurodegeneration, genetic analysis, deficiency mapping.

Стаття надійшла до редколегії 31.12.2004

Прийнята до друку 17.01.2005