

Нейродегенеративні мутанти *Drosophila melanogaster*: отримання, фенотипові особливості, тривалість життя

А. С. Яценко, Ю. А. Прадєд, О. В. Кисла, Д. В. Максимів, Г. Р. Щербата

Львівський національний університет імені Івана Франка
Вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна

*Отримано індуковані етилметансульфонатом нейродегенеративні мутанти *D. melanogaster* з різними фенотиповими особливостями будови структури головного мозку. Досліджено їхню тривалість життя і особливості фенотипового прояву змін головного мозку. Показано, що у них відсутнє плато на кривих виживання, яке відповідає періоду активної життєздатності, відмирання окремих особин починалося вже з перших днів життя мутантних мух.*

Вступ. Актуальним в умовах забруднення довкілля і зростання генетично зумовлених захворювань нервової системи є пошук мутантів із змінами у структурі головного мозку. Особливу увагу привертають мутації, які проявляються при старінні організму, оскільки саме вони зумовлюють розвиток у людини таких захворювань, як синдром Паркінсона, Альцгеймера, Шарко-Марі-Туз та ін. [1]. Пошук і вивчення цих мутантів відкривають нові перспективи можливого лікування.

Матеріали і методи. В роботі використано лінію дикого типу Oregon R з ізогенованими хромосомами, отриману з музею ліній дрозофіли Університету м. Базеля (Швейцарія). Тестерними лініями служили лінії самок зі зчепленими X-хромосомами C(1)DX, yf та самки балансерної лінії по третій хромосомі Dg/Xa. Для індукції мутагенезу використовували хімічний мутаген етилметансульфонат (EMS), який спричинює точкові мутації [2]. Мутаген вводили методом личинкового згодовування [3]. Для пошуку нейродегенеративних змін у структурах головного мозку робили гістологічні зрізи мозку мух у віці 30 днів. Показано [4], що у дрозофіли старіння починається з 18—20-го дня, тому для досліджень брали 30-денних мух. Препарати аналізували в УФ світлі на мікроскопі Laboval Carl Zeiss (Австрія). Криві виживання мутантних культур будували за стандартною методикою [4].

Результати і обговорення. Для індукції му-

тацій, які призводять до появи генетичних змін у структурі головного мозку, використовували EMS в різних концентраціях: 25, 50, 75, 100, 125, 250 і 500 мМ. Мутагеном обробляли личинок другого віку. Слід відзначити, що розвиток відбувався лише при концентраціях 100 мМ і нижче, вищі дози мутагену викликали летальний ефект (табл. 1).

При використанні мутагену в концентрації 25 мМ отримано шість мутантів з частотою появи $2,02 \cdot 10^{-2}$. Важливо відмітити, що підвищення концентрації мутагену не корелювало із значним збільшенням частоти появи мутацій зі змінами структури мозку, однак при цьому значно знижувалася (в 5—6 разів) кількість самців, які вижили після обробки мутагеном. Тобто вища концентрація EMS викликала посилення летальної дії мутагену. Оскільки оптимальною для отримання мутантів виявилася концентрація 25 мМ, то в подальшому для індукції мутацій по першій і третій хромосомах використовували саме її (табл. 2).

При аналізі гістологічних препаратів мозку 30-денних імаго серед більш ніж 3000 ізогенованих по X-хромосомі культур виявлено 21 лінію, яка характеризувалася морфологічними змінами у структурі головного мозку. Серед 1800 препаратів мозку особин, отриманих при скринінгу мутантів по третій хромосомі, виявлено 12 мутантних культур. Частота появи мозкових мутантів була однаковою для обох досліджуваних хромосом і коливалася в межах $(6,64—7,16) \cdot 10^{-3}$.

© А. С. ЯЦЕНКО, Ю. А. ПРАДЄД, О. В. КИСЛА,
Д. В. МАКСИМІВ, Г. Р. ЩЕРБАТА, 2003

Таблиця 1
Вплив різних концентрацій етилметансульфонату на частоту появи мутантів зі змінами в структурі мозку у лінії дикого типу *Oregon R. D. melanogaster*

Концентрація мутагену, мМ	Кількість проаналізованих препаратів	Кількість мутантів зі змінами в структурі мозку	Частота появи мутантів зі змінами в структурі мозку ($\cdot 10^{-3}$)
25	297	6	2,02
50	59	2	3,39
75	63	2	3,17
100	49	4	4,01

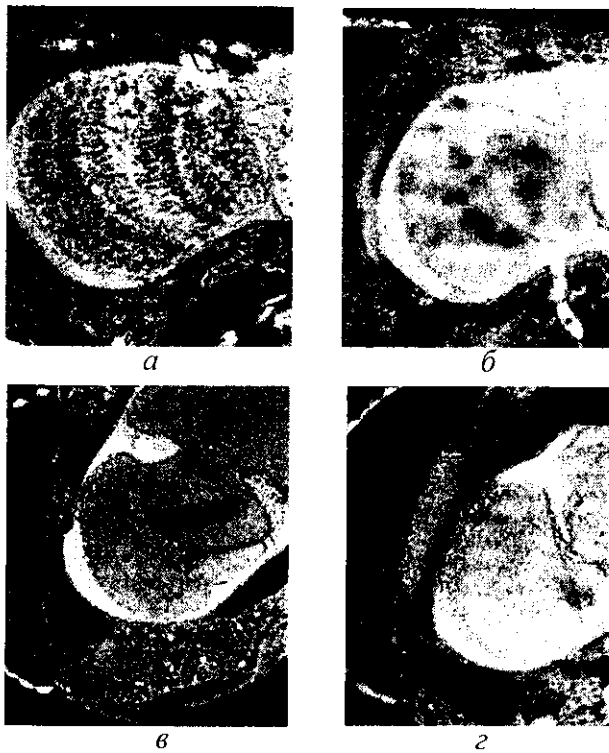


Рис. 1. Фенотиповий прояв мутантів *D. melanogaster* з морфологічними змінами у структурі головного мозку: а — павутиноподібна тканина, *cwl*; б — пошкодження у вигляді плям з нечіткими краями (*usc*); в — поодинокі *vam*-подібні отвори в ділянці медули (*vam*); г — губкоподібна структура мозку (*spl*)

Таблиця 2

Частота появи мутантів зі змінами у структурі мозку, індукованих етилметансульфонатом в концентрації 25 мМ у лінії *Oregon R. D. melanogaster*

Дослід	Кількість ізогомізованих хромосом	Кількість проаналізованих препаратів головного мозку	Кількість мутантів зі змінами в структурі мозку	Частота появи мутантів зі змінами в структурі мозку ($\cdot 10^{-3}$)
Контроль	3121	—	—	—
X-хромосома	3503	2935	21	7,16
Третя хромосома	2488	1806	12	6,64
Всього	9112	4741	33	6,96

Згідно з літературними даними [5, 6], відомо мутації, які призводять до появи дегенеративних змін у структурі мозку дрозофіли в процесі старіння. Показано [7], що у мутантів *swiss cheese* (*sws*) мозкові дефекти проявляються у формуванні вакуолей в усіх мозкових структурах. Встановлено, що продукт цього гена регулює гліальне обгортання нейронів, внаслідок чого мутація *sws* спричиняють гіпермієлінізацію. Інші три досліджені нейродегенеративні мутації *Vacuolar medulla* (*Vac*), *retina degenerated* (*rdg*) і *drop-dead* (*drd*) викликають дегенерацію клітин глії або відмирання відповідних нейронів і формування вакуолей в очних структурах головного мозку дрозофіли [5].

За фенотиповим проявом отримані нами мутанти зі змінами головного мозку умовно було розділено на чотири групи. Найбільшу ступінь уражень головного мозку демонстрували особини першої групи, які характеризувалися сітчастою або павутиноподібною тканиною мозку, названої нами *cwl* (cobweb-like structure) (рис. 1, а). До другої групи віднесено лінії, що склалися з представників лише однієї мутантної культури, мозок яких містив пошкодження у вигляді плям з нечітко окресленими краями, *usc* (unclear contour) (рис. 1, б). Окрему групу становили мутанти, які мали ряд дрібних вакуолей в медулі, *vam* (*Vam* like phenotype) (рис. 1, в). До останньої групи входили особини, які характеризувалися пористою або губкоподібною будовою тканини мозку, *spl* (sponge-like) (рис. 1, г).

Оскільки метою даної роботи було отримання мутаційних змін головного мозку, які проявляються в процесі старіння, ми досліджували середню тривалість життя одержаних мутантних культур. Для цього побудували криві виживання мутантних самок і самців при температурі 25 °С. Як контроль використовували показники тривалості життя лінії дикого типу *Oregon* (рис. 2). Аналіз виживання мутантних ліній показав, що в них відсутнє плато на кривих виживання, яке відповідає періоду активної життєздатності, тобто відмирання особин починається вже з перших днів життя мутантних

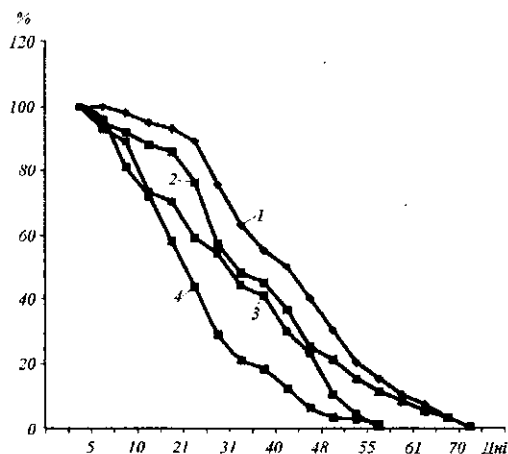


Рис. 2. Криві виживання самок і самців нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*: 1 — Oregon R; 2 — *vaml* 67-11; 3 — *iss* 5-5; 4 — *cws* 73-8

мух. В середньому тривалість життя мух становила від 50 до 75 днів. У ліній типу *cws*, *iss*, *spl* вже до 20-го дня гине більше 50 % мух (для Oregon R цей показник становить 40 днів).

Авторами [7] показано, що у ліній, мутантних за геном *swiss cheese*, при підвищеній температурі (29 °C) 50 % виживання спостерігалось на 3–10-й день порівняно з 15-м днем у контрольній лінії дикого типу. Дослідження тривалості життя у мутантів *drop-dead* виявило, що більшість особин гине протягом першого тижня після вильоту імаго, смерть звичайно настає упродовж чотирьох годин після появи дефектів у мозку [8].

A. S. Yatsenko, Yu. A. Praded, O. V. Kysla, D. V. Maximiv, G. R. Shcherbata

The neurodegenerative *Drosophila melanogaster* mutants: obtaining, phenotypic properties, lifespan

Summary

The neurodegenerative *D. melanogaster* mutants on X and 3rd chromosomes induced by ethylmethanesulphonate have been ob-

tained. All mutants have been divided into different phenotype groups. The investigation of their lifespan has shown that they have no plateau on the survival curves, which refers to the period of active viability.

A. S. Yatsenko, Yu. A. Praded, O. V. Kysla, D. V. Maximiv, G. R. Shcherbata

Нейродегенеративные мутанты *Drosophila melanogaster*: получение, фенотипические особенности, время жизни

Резюме

Получены индуцированные этилметансульфонатом нейродегенеративные мутанты по первой и третьей хромосомах у дрозофилы, характеризующиеся различным фенотипом. Исследована продолжительность жизни мутантов с изменениями в структуре мозга и показано, что у них отсутствует плато на кривых выживания, соответствующее периоду активной жизнеспособности, отмирание отдельных особей началось уже с первых дней жизни мутантных мух.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Корочкин Л. И., Михайлов А. Т. Введение в нейрогенетику.—М.: Наука, 2000.—247 с.
2. Ashburner M. *Drosophila*.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—Vol. 1.—1331 p.
3. Belokon E. M., Chernik Ya. I., Bodnar L. S. Investigations of biochemical genetics of *Drosophila melanogaster* // Arh. Biol. Nauka. Beograd.—1991.—43, N 1—2.—P. 1—14
4. Heisenberg M., Bohl K. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means // Z. Naturforsch [C].—1979.—34.—P. 143—147.
5. Coombe P. E., Heisenberg M. The structural brain mutant *Vacuolar medulla* of *Drosophila melanogaster* with specific behavioral defects and cell degeneration in the adult // J. Neurogenet.—1986.—3.—P. 135—158.
6. Rogina B., Benzer S., Helfand S. L. *Drosophila drop-dead* mutations accelerate the time course of age-related markers // Proc. Nat Acad. Sci. USA.—1997.—94.—P. 6303—6306.
7. Kretschmar D., Hasan G., Heisenberg M., Benzer S. The *swiss cheese* mutant glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* // J. Neurosci.—1997.—17, N 19.—P. 7425—7432.
8. Buchanan R. L., Benzer S. Defective glia in the *Drosophila* brain degeneration mutant *drop-dead* // Neuron.—1993.—10.—P. 839—850.

УДК 575.24:577.7:591.481.1
Надійшла до редакції 30.01.02