

4. *Ischiropoulos H., Beckman J.S.* Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect or association? // *J. Clin. Invest.* – 2003. – V.15. – P.163-169.
5. *Kanazawa I.* How do neurons die in neurodegenerative disease? // *Trends in Mol. Med.* – 2001. – Vol.1, №8. – P.339-344.
6. *Tschaeppe J-A, Hammerschmiedl C., Muehlig-Versenl M., Athenstaedt K., Daum G., Kretzschmar D.* The neurodegeneration mutant loechrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing // *EMBO Jour.* – 2002. – V.21, №23. – 6367-6376.
7. *Sullivan W., Ashburner M., Hawley R.S.* *Drosophila* Protocols // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2000. – 697p.

Резюме

В результаті дії ЕМС був отриманий мутант 4.14 *D.melanogaster* з дегенерацією тканини мозку, мутація локалізована в цитологічному районі 93С3-F14 третьої хромосоми. В умовах гіпероксії в цих мутантів показана дегенерація в кортексі ламіни та субретинальній глії. Фарбування антитілами виявило відмирання фоторецепторних аксонів R7-R8 та зменшення кількості нейронів в ділянці ламіни. Порушення метаболізму ліпідів у даного мутанта може бути причиною появи нейродегенерацій.

С помощью химического мутагенеза получен мутант 4.14 *D.melanogaster* с дегенерацией структур мозга; мутация локализована в цитологическом районе 93С3-F14 3-ей хромосомы. После гипероксии в мутантов 4.14. фиксировались дегенерации в кортексе ламины и субретинальной глии. Проведено иммуногистохимические исследования ткани мозга. Нарушения в метаболизме липидов в этих мутантов могут быть одной из причин развития нейродегенераций.

Using chemical mutagenesis neurodegenerative mutant 4.14 of *D.melanogaster* was obtained; mutation was localized in cytological region 93С3-F14 of the 3rd chromosome. Under hyperoxia these mutants showed severe degeneration of lamina cortex. Immunohistochemical staining showed degeneration of photoreceptor axons R7-R8 and neurons of lamina region. In this mutant, probably, lipid metabolism disturbance is one of the reasons of neurodegeneration appearance.

ЯЦЕНКО А.С.¹, КУЧЕРЕНКО М.М.¹, ЩЕРБАТА Г.Р.², РУОХОЛА-БЕЙКЕР Х.², ГОЛУБ Н.Я.¹, МАКСИМІВ Д.В.¹, ЧЕРНИК Я.І.¹

¹ *Львівський національний університет імені Івана Франка, вул.Грушевського, 4, Львів 79005, Україна e-mail: anubius81@gmail.com*

² *Department of Biochemistry, University of Washington, Box 357350, Seattle, WA 98195, USA e-mail: hannele@u.washington.edu*

ДИСТРОФІН ТА ДИСТРОГЛІКАН Є НЕОБХІДНИМИ ДЛЯ ФУНКЦІОНУВАННЯ М'ЯЗІВ ТА ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ПОЛЯРНOSTІ ФОТОРЕЦЕПТОРНИХ АКСОНІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ У DROSOPHILA MELANOGASTER

Дистрофін та дистроглікан є центральними компонентами, які входять до складу дистрофін-глікопротеїнового комплексу (ДГК), що забезпечує структурну роль зв'язку білків зовнішньоклітинного простору, таких як ламінін, агрін і перлекан з компонентами цитоскелету. Втрата взаємозв'язку між компонентами комплексу призводить до розвитку м'язових дистрофій ¹. Розроблені і вивчені на сьогоднішній день моделі м'язової дистрофії дали змогу виявити загальні процеси патологій ².

Незважаючи на це, відсутність чіткого розуміння функції ДГК у специфічних тканинах і його регуляції не дає змоги розробити ефективної стратегії лікування міопатій, які і досі відносяться до категорії невиліковних. Висока гомологія основних компонентів ДГК у людини і дрозофіли дає підстави вважати, що основні функції цього комплексу збереглись впродовж еволюції. Будучи зручним об'єктом генетики *Drosophila melanogaster* може бути використана для проведення генетичного скринінгу різних компонентів, що входять до складу ДГК. Як модельний еукаріотичний організм дрозофіла має низку переваг для вивчення молекулярно-генетичних механізмів розвитку м'язових дистрофій, із подальшою інтерпретацією результатів у людини.

Матеріали і методи

Мутантні лінії *Drosophila melanogaster*, використані у роботі. Лінії мух *Drosophila melanogaster* утримувалися при температурі 25 °С на стандартному середовищі, що складалось з кукурудзяного борошна, дріжджів та агару. У проведеній роботі були використані наступні лінії: для отримання мутантних клонів за геном дистроглікану у мозку личинок: *hsFLP; FRT42D Ubi-GFP/CyO* та *eyFLPGMR-lacZ; FRT42D I(2)cl-R111/CyO*, *Gal4-elav* (колекція дрозофіли, м.Блумінгтон, США); *Df(3R)Dl-X43/TM3,Tb,Sb* з делецією гена дистрофіну, у тексті позначена під назвою *DfKX43* (колекція дрозофіли, м.Блумінгтон, США); *Dys⁸⁻²/TM3,Sb* з гіпоморфним алелем дистрофіну, отримана в результаті транспозиції мобільного генетичного елемента *EP(3)³³⁹⁷* (<http://engels.genetics.wisc.edu/Pelements/index.html>); для негативної регуляції дистрофіну – трансгенна лінія *pUASdsDysC-term* (лінії - *dsDysC-term*, *tg5*, *tg6*); для тканинно-специфічної активації трансгенних конструктів були використані наступні лінії: у клітинах фоторецепторів – *wⁱ*; *GMR-Gal4*, у клітинах мезодерми – *wⁱ*; *24B-Gal*. Усі лінії для специфічної експресії були отримані з колекції дрозофіли (м.Блумінгтон, США). Імуногістохімічні фарбування проводились за стандартною методикою описаною раніше ⁹.

Результати та обговорення

У мутантів за генами дистрофіну та дистроглікану порушена локомоторна функція. Відомо, що у людей втрата компонентів дистрофін-дистрогліканового комплексу призводить до регресії м'язів і до зниження тривалості життя ¹. Цікаво було дослідити, чи подібні процеси відбуваються у дрозофіли. З цією метою ми перевірили локомоторну функцію у мух із негативною регуляцією дистрофіну та дистроглікану згідно методики, яка використовувалась у подібних дослідженнях ². Локомоторну активність визначали у мух. Для кількісної інтерпретації локомоторної активності визначали день, коли спостерігалось її зниження на 50 відсотків. У експериментах ми використали комбінацію трансгенів і транскрипційного активатора *24B-Gal4*, який специфічно експресується у тканинах мезодермального походження, тим самим забезпечуючи негативну регуляцію дистрофіну та дистроглікану у м'язовій тканині. У особин зі зниженою експресією дистрофіну та дистроглікану в м'язах (*dsDysC-term/24B-Gal4*, *dsDysN-term/24B-Gal4*, *dsDg30A/24B-Gal4*) було відзначено швидке зниження локомоторної активності порівняно з контролем (*pUASpGFP/24B-Gal4*). Таким чином, на основі отриманих результатів можна стверджувати, що дистрофін і дистроглікан відіграють важливу роль у забезпеченні локомоторної функції дрозофіли.

Залежна від віку дегенерація м'язів у мутантів за генами дистрофіну та дистроглікану. Для пояснення отриманих результатів по дослідженню локомоторної активності мутантів за генами дистрофіну та дистроглікану (*dsDg30A* або *dsDys/P-tub-Gal4*, *Dys⁸⁻²/KX43*), нами було проаналізовано морфологічні зміни у м'язовій тканині комах, використовуючи гістологічні методи.

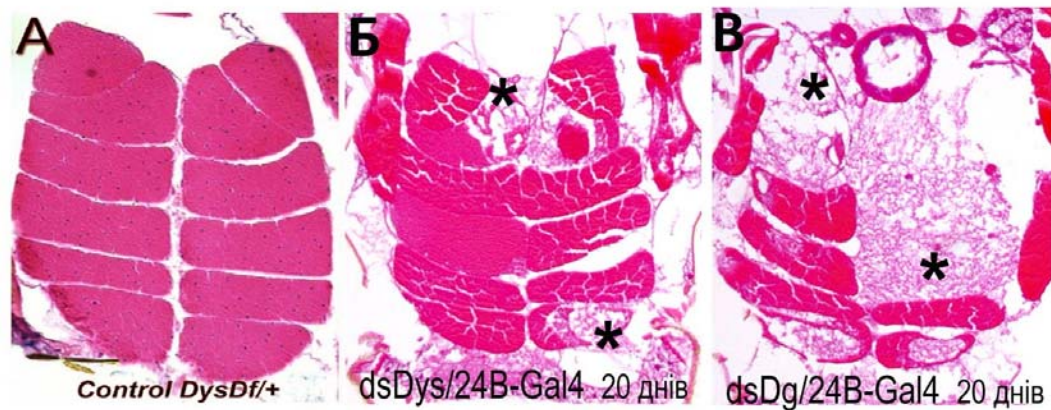


Рис.1. Гістологічні зрізи м'язів у мух дикого типу та мутантів за дистрофіном та дистрогліканом.

На основі аналізу гістологічних зрізів м'язів грудей показано залежну від віку дегенерацію м'язів, що корелює з попередньо отриманими результатами щодо зниженої у цих мутантів локомоторної активності. Аналіз зрізів із використанням конфокальної та світлової мікроскопії виявив порушення клітинної організації м'язів у мутантів порівняно з м'язами мух дикого типу. На зрізах виявлені численні пошкодження м'язової тканини. У мух дикого типу літальні м'язи мають чітко організовану структуру м'язових волокон та периферійно розташовані ядра (рис. 1 А). У мутантних особин 20-денного віку зі зниженим рівнем дистрофіну *dsDys/24B-Gal* (рис.1 Б) та зі зниженим рівнем дистроглікану *dsDys/24B-Gal4* (рис.1.В) спостерігались значні порушення структури м'язових волокон, вакуолізація і повна відсутність окремих м'язів. Опираючись на одержані результати можна зробити висновок, що, у дрозофіли, як і у людини, для забезпечення нормальної роботи м'язів упродовж життя є необхідним нормальне функціонування дистрофін-дистрогліканового комплексу.

Дистрофін та дистроглікан необхідні для забезпечення полярності фоторецепторних аксонів мозку під час личинкової стадії. Око дрозофіли побудоване за фасетковим типом і складається з ~800 омаїдій, кожна з яких містить вісім різних типів фоторецепторних нейронів R-типу, що проєктують свої аксони у дві чітко визначені ділянки мозку під час розвитку нервової системи на пізніх стадіях личинки. Аксони нейронів типу R1-R6 інервують поверхневі шари ламіни, формуючи структуру lamina plexus, натомість аксони нейронів типу R7 та R8 мігрують через ламіну в глибші шари медули^{4,5,6,7} (рис.1 А). Характер формування та міграції аксонів фоторецепторів проходить на пізніх стадій розвитку личинки, розтягування ж ретинальних ділянок з формуванням тіл омаїдій відбувається під час метаморфозу⁸. Для того, щоб визначити, на якій саме стадії втрата дистроглікану призводить до появи мутантного фенотипу у фоторецепторних нейронах, ми індукували клоноутворення специфічно в очах (*eyFLP; FRT42D Dg³²³/FRT42D(12)cl-R11*) з подальшим препаруванням головного мозку личинок на пізніх стадіях розвитку. Для візуалізації аксонів нейронів R-типу використано специфічні

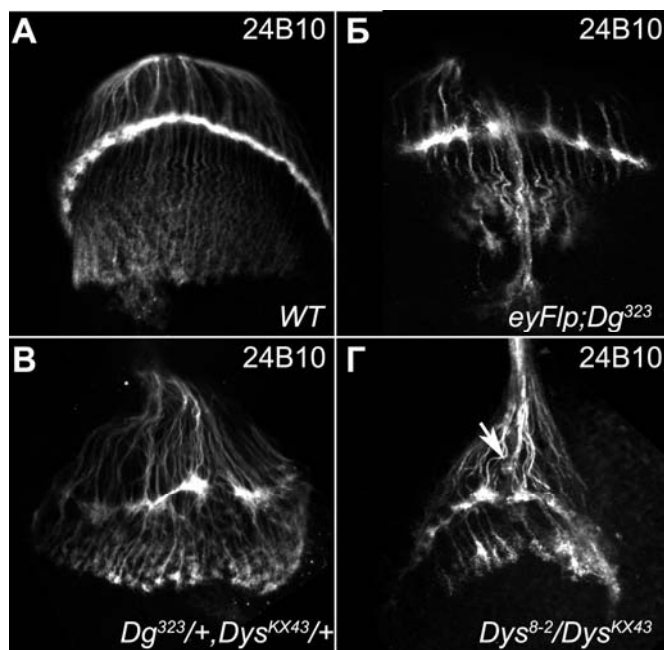


Рис.2 Фарбування аксонів фоторецепторів головного мозку у клітин дикого типу (WT) та мутантів за дистрогліканом та дистрофіном.

моноклональні антитіла 24B10. У мозку мух дикого типу аксони фоторецепторів формують термінуючий сайт у вигляді півкола (рис.2 А). Гістохімічне фарбування мозків, у яких були присутні популяції клітин з повною втратою дистроглікану, виявило, що негативна регуляція цього білка не супроводжується порушеннями формування аксонів нейронів R-типу. Однак, в результаті детального аналізу прогресії цих відростків у глибші шари мозку показано, що за відсутності дистроглікану у 85% нейронів порушена нормальна термінація аксонів у ділянках оптичних долей (рис.2 Б). Більшість таких аксонів мігрувала у правильному напрямку в зоні ламіни, але з формуванням аномальних згустків у ділянці lamina plexus. Подібний фенотип був виявлений нами і у випадку мутантів за дистрофіном (рис.2 Г; $Dys^{8-2}/KX43$) у 67-75 % випадків аксони термінувались аномально у ділянці lamina plexus з формуванням пропусків у зоні термінації, з відхиленнями від нормального шляху та з утворенням скупчень аксонів у нехарактерних ділянках, де мала б відбуватись термінація. Аналіз термінації аксонів у ділянках мозку показав, що одночасне зниження експресії дистрофіну та дистроглікану призводить до подібних порушень у термінації аксонів фоторецепторних клітин у ділянці lamina plexus (рис. 2 В; $Dg^{323}/+, KX43/+$). Разом з тим жодних значних змін не було виявлено у гетерозиготних мух лише за геном дистроглікану ($Dg^{323}/+$) або лише за геном дистрофіну ($Dys^{8-2}/+$).

Таким чином, отримані нами результати свідчать про можливість використання дрозофіли як зручного генетичного об'єкту для вивчення структури, функції та регуляції компонентів ДГК. В роботі вперше показано, що крім класичної дегенерації м'язів взаємодія між дистрофіном і дистрогліканом є необхідною для забезпечення полярності аксонів фоторецепторів.

Література

1. Cohn R.D., Campbell K.P. Molecular basis of muscular dystrophies // Muscle Nerve. 2000. N23 P. 1456 – 1461.
2. Winder, S.J. The complexities of dystroglycan. Trends Biochem Sci. 2001 26, 118-124.
3. Benzer S Behavioral mutants of Drosophila isolated by countercurrent distribution. Proc Natl Acad Sci 1967 58: 1112–1119

4. *Perez, S.E. & Steller, H.* Migration of glial cells into retinal axon target field in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol.* 1996. 30, 359-373.
5. *Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C.S.* The molecular biology of axon guidance. *Science.* 1996. 274, 1123-1133.
6. *Clandinin, T.R. & Zipursky, S.L.* Making connections in the fly visual system. *Neuron.* 2002 35, 827-841.
7. *Ruan, W., Long, H., Vuong, D.H. & Rao, Y.* Bifocal is a downstream target of the Ste20-like serine/threonine kinase misshapen in regulating photoreceptor growth cone targeting in *Drosophila*. *Neuron.* 2002 36, 831-842.
8. *Izaddoost, S., Nam, S.C., Bhat, M.A., Bellen, H.J. & Choi, K.W.* *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature.* 2002 416, 178-183 2002.
9. *Shcherbata HR, Yatsenko AS, Patterson L, Sood VD, Nudel U, et al.* Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy. *Embo J.* 2007 26: 481-493.

Резюме

У проведених дослідженнях вивчалися білки дистрофін та дистроглікан, які є основними компонентами дистрофін-глікопротеїнового комплексу *Drosophila melanogaster*. У отриманих мутантів втрата дистрофіну та дистроглікану призводила до зниження локомоторної активності, дегенерації м'язів та порушення полярності аксонів фоторецепторів.

В проведених дослідженнях изучались белки дистрофин и дистрогликан, которые являются основными компонентами дистрофин-гликопротеинового комплекса *Drosophila melanogaster*. У полученных мутантов потеря дистрофина и дистрогликана вызывала снижение локомоторной активности, дегенерацию мышц и нарушение полярности аксонов фоторецепторов. Сходные фенотипы были описаны при мышечных дистрофиях человека.

We have studied dystrophin and dystroglycan – highly conserved components of Dystrophin glycoprotein complex (DGC) in *Drosophila melanogaster*. Dystrophin and dystroglycan mutants in *drosophila* showed decreased climbing ability, muscle degeneration and disruption of axon guidance which resemble human case of muscular dystrophy.

DMYTRUK K.V., DMYTRUK O.V., SIBIRNY A.A.

Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Department of molecular genetics and biotechnology, Drahomanov Street 14/16, Lviv 79005, Ukraine, e-mail : dmytruk@cellbiol.lviv.ua

CONSTRUCTION OF URICASE-OVERPRODUCING STRAINS OF THE METHYLOTROPHIC YEAST *HANSENULA POLYMORPHA*

Uric acid is an end product from purine derivatives in human metabolism. The assay of uric acid in body fluids (e.g., serum and urine) is a clinically valuable diagnostic indicator [1]. The presence of elevated uric acid levels is a sign of gout, hyperuricemia, or Lesch-Nyhan