

Фенотипи *Drosophila melanogaster*, зумовлені порушеннями функціонування дистрофіну та дистроглікану

В. М. Рішко, Н. Я. Голуб, Я. І. Черник

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

valentyna.rishko@gmail.com

*Основні компоненти дистрофін-глікопротеїнового комплексу – дистрофін і дистроглікан – необхідні для нормальної життєдіяльності *D. melanogaster* упродовж усього онтогенезу. Мутації в генах цих білків спричиняють різні фенотипи, серед проявів яких є ознаки, характерні для м'язової дистрофії людини. Крім того, описано низку відмінних фенотипів, вивчення яких проливає світло на розуміння перебігу різних патологій, дає змогу виявляти нові компоненти у складі дистрофін-глікопротеїнового комплексу та нові регуляторні білки, що впливають на функціонування цього комплексу. Таким чином, на основі генетичного об'єкта *D. melanogaster* створено хорошу модельну систему для вивчення міопатій людини.*

*Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, дистрофін-глікопротеїновий комплекс, м'язові дистрофії, експресія дистрофіну (дистроглікану).*

Захворювання людини, спричинені порушеннями функціонування дистрофіну та дистроглікану. На сьогодні відомо понад 30 спадкових захворювань під загальною назвою м'язові дистрофії [1]. Ці хвороби мають спільні ознаки дегенерації скелетних м'язів, кардіоміопатії, зниженої тривалості життя, а при деяких формах дистрофій відбувається порушення розвитку мозку та зорового апарату.

Найважчим перебігом характеризується м'язова дистрофія Дюшенна (МДД). МДД виникає в результаті відсутності всього або частини білка дистрофіну, тоді як її легша форма, м'язова дистрофія Беккера (МДБ), обумовлена зниженою кількістю дистрофіну або експресією частково функціонального білка [1]. За відсутності дистрофіну дистрофін-глікопротеїновий комплекс (ДГК) білків деста-

білізується [2]. Відповідно втрачається захисна та сигнальна роль ДГК, яка полягає у зв'язку сарколеми з внутрішнім актиновим цитоскелетом та передачею сигналів з позаклітинного простору всередину клітини [3–5]. Незважаючи на те, що при МДД уражаються у першу чергу скелетні м'язи, більшість хворих часто помирає у ранньому віці від серцевої та дихальної недостатності. У пацієнтів з МДД і МДБ порушується також функціонування головного мозку [3].

Причиною виникнення МДД і МДБ є мутації у найбільшому гені людини, гені дистрофіну (*Dys*), ідентифікованому у 1987 р. [6]. Розмір цього гена Х-хромосоми становить близько 2400 тис. п. н. геномної ДНК людини і містить він 79 екзонів. Його транскрипт величиною 14 тис. п. н. кодує білок з молекулярною масою 427 кДа [5, 7, 8]. Експресія повнорозмірного транскрипта (Dp427) контролюється

трьома різними промоторами, що ініціюють транскрипцію в мозку, м'язах і клітинах Пуркінє [7, 9]. Короткі ізоформи Dp71, Dp116, Dp140 і Dp260 транскрибуються з чотирьох внутрішніх промоторів. Dp71 експресується у мозку, легенях, печінці, нирках; інші три ізоформи – переважно в центральній та периферійній нервовій системі [7].

Серед мутацій гена дистрофіну, які призводять до МДД і МДБ, є як великі делеції, так і великі дуплікації нуклеотидних послідовностей, а також точкові мутації [8].

Не описано дистрофій, спричинених мутаціями у гені дистроглікану (*Dg*). Білок дистроглікану відіграє важливу роль не лише у функціонуванні м'язів, але й нервової системи, у сигнальній трансдукції. Внаслідок посттрансляційної модифікації він зазнає розділення на дві окремі субодиниці – α і β . Для мишей показано, що за відсутності α -дистроглікану порушується Ca^{2+} -залежний регенераційний процес у міофібрилах. Втрата дистроглікану у мишей веде до їхньої смертності ще на стадії ембріона [10]. Цим пояснюється відсутність у мишей міопатій, зумовлених мутаціями у гені *Dg*. Проте якщо функціонування дистроглікану вибірково порушується уже в зрілих м'язових волокнах, то це призводить до нестабільності і дегенерації м'язів [7]. Очевидно, у людини цей білок є настільки важливим, що його відсутність несумісна з життям.

Гіпоглікозилювання α -дистроглікану, причиною якого є мутації в генах, що кодують глікозилтрансферази, викликає розвиток дистрогліканопатій [11]. Серед таких захворювань – м'язово-зоровозове захворювання (Muscle eye brain, МЕБ), синдром Волкер-Варбурга (WWS), конгенітальна м'язова дистрофія Фукуяма, конгенітальні дистрофії 1С та 1D [12]. Фенотипово такі порушення виявляються у м'язовій слабкості та аномаліях у формуванні і функціонуванні головного мозку і зорового апарату.

Оскільки вивчення механізмів розвитку м'язових дистрофій у людини ускладнене через наявність багатоконпонентного ДГК та великої кількості ізоформ дистрофіну, на сьогодні для цього використовують тваринні моделі.

Моделльні об'єкти в дослідженнях м'язових дистрофій. Серед представників ссавців досліджу-

ють мишей та собак. Найширше використовують модель миші з точковою мутацією в гені дистрофіну (*mdx*-модель). Некроз м'язів починається приблизно на 3–4-й тиждень життя, проте особини природно одужують унаслідок м'язової регенерації [4, 7, 13, 14]. Найподібніший до МДД фенотип мають миші з одночасно відсутніми дистрофіном та утрофіном, очевидним паралогом дистрофіну, який у хребетних здебільшого локалізований в нейром'язових з'єднаннях [7, 10, 15]. Іншою цікавою моделлю дистрофії Дюшенна є собака породи золотистий ретривер. Дегенерація м'язів починається у двомісячному віці особин і швидко прогресує, характерною є вкорочена тривалість життя. Ретривер – краща модель для вивчення міопатій, ніж миші, оскільки має найподібніший з людиною прояв захворювання. Проте мінливий фенотип і непросте утримання роблять цих собак важким об'єктом для дослідження [7, 13, 16]. Останнім часом через еволюційну консервативність ДГК [4] все більше застосовують і інші моделі для вивчення дистрофій, серед яких *Caenorabditis elegans*, *Danio rerio*, *D. melanogaster*. У *C. elegans* відсутність ортолога дистрофіну *DYS-1* не викликає м'язової дегенерації, а спричиняє гіперактивність через відхилення у холінергічній передачі сигналів [7, 17, 18]. Поряд з тим, одночасна відсутність *DYS-1* і міогенного фактора регуляції *MyoD* викликає порушення локомоторної активності та прогресуючої м'язової дегенерації [7]. Важливою моделлю є також *zebrafish*, що має ортологи дистрофіну, дистроглікану та саркоглікану [19]. Мутації в гені-ортолозі дистрофіну *sapje* спричиняють появу фенотипу, подібного до м'язових дистрофій людини. Перебіг цієї патології є важчим, аніж у миші (*mdx*) без білка дистрофіну. Очевидно, у *zebrafish*, як і у людини, відсутні такий потужний механізм регенерації м'язів і компенсаторний рівень утрофіну, як у мишей. Мутанти за геном *Dg* у *zebrafish* характеризуються нерегулярним розташуванням саркомерних білків, необхідних для скорочення м'язів. Такі мутанти можуть слугувати моделлю для вивчення конгенітальних м'язових дистрофій [19].

Чому *D. melanogaster* придатна для вивчення міопатій? По-перше, це зручний модельний еукаріотичний об'єкт (піддається генетичним маніпу-

ляціям, має короткий період життя, продукує багато потомків). По-друге, у дрозофіли присутні всі компоненти ДГК людини, але з дещо меншою різноманітністю ізоформ [20]. Так, із 17 білків комплексу, описаних у людини, у дрозофіли зафіксовано дев'ять [20]. Основними білками ДГК дрозофіли, як і людини, є дистрофін і дистроглікан.

Ген дистрофіну – один із найбільших у геномі *D. melanogaster*, розташований на правому плечі 3-ї хромосоми у положенні 92A5–92A10 (<http://flybase.bio.indiana.edu/>), містить близько 13 тис. п. н. Подібно до людини дистрофін дрозофіли має три довгі (DLP1–DLP3) та три короткі (Dp186, Dp205, Dp117) форми, експресія яких є тканинспецифічною. Dp205 є гомологом Dp116 людини. Для Dp117 і Dp186 не знайдено гомологів у ссавців [21].

Ген дистроглікану *D. melanogaster* розташований на правому плечі 2-ї хромосоми, у положенні 52E2–52E4 (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). У дрозофіли, на відміну від ссавців, дистроглікан при дозріванні не розщеплюється на дві субодиниці – α і β [20], однак має три ізоформи Dg-A, -B і -C, які, очевидно, виникають унаслідок альтернативного сплайсингу [16, 22].

Домени білків ДГК, необхідні для взаємодії компонентів комплексу, є висококонсервативними у мухи і людини. Наприклад, С-кінцевий домен дистрофіну дрозофіли виявляє 54 % ідентичності з білком людини [20].

Хуангом та співавт. [23] детально вивчено кристалічну структуру комплексу дистрофіну та дистроглікану людини, проте на той час було невідомо, чи є подібною взаємодія зазначених білків у дрозофіли. Для цього Щербатою зі співавт. [24] методом поляризаційної флуоресценції, який дозволяє вивчати взаємодію білків *in vitro*, визначено константи дисоціації (K_d) дистрофіну і дистроглікану у людини і дрозофіли. Отримані результати свідчать про те, що у *D. melanogaster*, як і у *Homo sapiens*, ці білки фізично взаємодіють між собою. Встановлено також, що дистрофін людини зв'язується з дистрогліканом дрозофіли і навпаки, оскільки K_d з використанням міжвидових компонентів ДГК залишаються на рівні виявлених у разі взаємодії внутрішньовидових зразків цих білків [24]. Таким чином, підтверджено консервативність взаємодії дистро-

фіну і дистроглікану людини та дрозофіли. Надалі цими ж авторами отримано докази специфічності подібної взаємодії та виявлено заміни амінокислот у сайтах зв'язування, які призводять до значного падіння ефективності асоціації дистрофіну і дистроглікану [25].

Тканинспецифічна експресія дистрофіну та дистроглікану у дрозофіли. Внаслідок дослідження тканинспецифічної експресії дистрофіну і дистроглікану у личинок *D. melanogaster* імуногістохімічною детекцією з використанням антитіл, які специфічно впізнають N- або С-кінцеві ділянки білків, показано, що дистрофін і дистроглікан присутні в тканинах різного походження: ектодермального – слинних залозах, центральній нервовій системі (ЦНС), периферійній нервовій системі, шлунку, трахеї, мальпігієвих судинах; мезодермального – серці та ентодермального – кишечнику [24, 26–28]. Крім того, виявлено, що довгі ізоформи дистрофіну DLP1, DLP2 і коротка Dp186 експресуються на всіх стадіях розвитку дрозофіли, тоді як DLP3 – тільки у імаго [26, 29]. В ембріональному періоді ізоформа Dp186 високо експресується у ЦНС, однак відсутня у мускулатурі [27]. У личинок довгу ізоформу дистрофіну DLP2, але не DLP1, знайдено в усіх м'язових волокнах. Довгі ізоформи не експресуються в нейропілі личинок, де розташовані тіла мотонейронів, на відміну від короткої ізоформи Dp186, яку виявлено в мозку та очних дисках [27]. Ізоформа дистрофіну Dp117 експресується у м'язах стінки тіла ембріонів та личинок, на противагу Dp205, яка присутня в перикардальній частині дорзальної судини. Обидві короткі ізоформи функціонують у мозку личинок і лише Dp205 – у вентральній середній лінії нейропіля личинок.

Надалі логічно виникло питання, яку ж роль відіграють дистрофін і дистроглікан в овогенезі, ембріогенезі та у дорослих особин? Роботами декількох груп авторів [22, 24, 27, 28, 30–35] отримано та проаналізовано фенотипи, які проявляються на різних стадіях онтогенезу і зумовлені порушенням функціонування основних компонентів ДГК – дистрофіну і дистроглікану.

Дистрофін і дистроглікан у дрозофіли необхідні для забезпечення полярності овоцита та фолікулярних клітин. Дистроглікан у дрозофіли

вперше виявлено під час овогенезу [22]. Овогенез у дрозофіли представлений 12 стадіями розвитку яйця, до складу якого входять клітини гермінативного ряду (ооцит і клітини-годувальниці) та фолікулярні клітини. Для вивчення полярності овоцита використано маркер полярності ORB, який у мух дикого типу локалізується на задній частині овоцита [22].

Показано, що у мутантів за геном *Dg* на 4–6-й стадії розвитку цей маркер розташований навколо овоцита або відсутній чи локалізований нерівномірно. Це свідчить про порушення полярності овоцита. Надекспресія повнорозмірної форми гена *Dg* у зародкових клітинах призводить до часткової реверсії мутантного фенотипу [25]. Подібний фенотип неправильної локалізації ORB спостерігається також у мутантів за геном дистрофіну [24]. Авторами отримано експериментальні докази взаємодії дистрофіну і дистроглікану між собою для забезпечення полярності овоцита, що підтверджує зміна локалізації маркерів полярності у клітинах, які одночасно несуть мутантні алелі як *Dys*, так і *Dg*. Причому фенотип подвійних мутантів не відрізняється від такого ж у гомозиготного мутанта за геном *Dg* і гетерозиготного – за геном *Dys* [24].

Зниження експресії дистроглікану і дистрофіну порушує також полярність клітин фолікулярного епітелію, про що свідчить неправильне розташування маркера полярності β -H-Spec. За норми цей маркер локалізується на апікальному боці клітини, у мутантів він розміщений хаотично або відсутній [22, 24]. Міроуз та співавт. [36] показали, що у мутантів за геном *Dg* втрата полярності фолікулярних клітин відбувається за умов енергетичного стресу.

Дистрофін і дистроглікан необхідні для забезпечення полярності аксонів фоторецепторів та функціонування клітин глії у головному мозку личинок дрозофіли. Око дрозофіли побудоване за фасетковим типом і складається приблизно з 800 оматидій, кожна з яких містить вісім типів фоторецепторних нейронів типу R. Аксони фоторецепторів мігрують з очних дисків у мозок личинки. Аксони R1–R6 зупиняють свою міграцію в зоні ламіни, формуючи чіткий термінуючий сайт сплетіння ламіни. Аксони нейронів R7 і R8 мігрують через ламіну в медулу. Формування і міграція аксонів фо-

торецепторів проходить на пізніх стадіях розвитку личинки.

З використанням антитіл 24B10 для візуалізації аксонів фоторецепторних нейронів R-типу показано порушення нормальної термінації аксонів (з частотою 60–80 %) у ділянках оптичних часток у мутантів за генами *Dg* і *Dys*. Одночасне зниження експресії цих генів призводить до подібних порушень [24]. Визначення напрямку міграції аксонів фоторецепторів вимагає також нормального функціонування клітин глії. За допомогою функціонального нокауту генів *Dys* і *Dg* у фоторецепторних клітинах та глії виявлено, що функціонування цих генів є необхідним як в одних, так і в інших типах клітин. У дрозофіли у зоні ламіни гліальні клітини утворюють два шари – епітеліальний і граничний, простір між якими є місцем термінації аксонів R1–R6. У мух зі зниженим рівнем експресії генів *Dys* і *Dg* міграція клітин глії відбувається у правильному напрямку, однак розташування шарів цих клітин є неорганізованим, унаслідок чого немає чітко визначеної межі між епітеліальним і граничним шарами гліальних клітин [24].

Дистрофін і дистроглікан у дрозофіли залучені до нейром'язових з'єднань та центрального синапсу. Відомо, що у хребетних більшість компонентів ДГК локалізується у холінергічних нейром'язових з'єднаннях (НМЗ), а їхня відсутність призводить до порушення структури цих з'єднань, що, очевидно, відбувається за м'язових дистрофій [37, 38]. У комах роль нейромедіатора у НМЗ відіграє глутамат, а не ацетилхолін, як у хребетних.

Щоб зрозуміти сигнальну функцію дистрофіну ван дер Плас та співавт. [27] дослідили роль довгих ізоформ дистрофіну у функціонуванні НМЗ личинок 3-го віку дрозофіли. Використовуючи антитіла, специфічні до всіх ізоформ дистрофіну, авторами виявлено, що дистрофін експресується у синапсах. Для точнішої локалізації застосовано комаркування дистрофіну і специфічного пресинаптичного білка HRP і показано, що дистрофін розміщується у НМЗ постсинаптично. Таку ж локалізацію дистрофіну спостерігали і при надекспресії ізоформи DLP2. Крім того, встановлено позасинаптичну експресію цього білка, де він колокалізується з актином [27]. Авторами зазначено, що відсутність дов-

гих ізоформ дистрофіну у мутантів дрозофіли не веде до зміни морфології м'язів личинок 3-го віку, кількості нервових бутонів, довжини синаптичних закінчень, кількості розгалужень чи порушень у постсинаптичній електричній відповіді на виділення нейромедіаторів. Нормальним виявилось розташування рецепторів нейромедіатора глутамату та актину у мутанта без ізоформи дистрофіну DLP2. Проте авторами показано, що відсутність цієї ізоформи у постсинаптичних м'язових клітинах спричиняє збільшення на 35–50 % порівняно з контролем вивільненого з пресинаптичного апарату під впливом певного стимулу нейромедіатора глутамату, а це, в свою чергу, підвищує деполяризацію м'язів. Важливо, що при функціональному нокауті гена *Dys* у нервовій системі порушень у вивільненні глутамату не спостерігається. Авторами встановлено, що дистрофін функціонує у ВМР-залежному шляху, який забезпечує постсинаптичне регулювання пресинаптичного вивільнення медіаторів у НМЗ, і є необхідним для підтримання гомеостазу у НМЗ [27].

За допомогою антитіл до С-кінцевих залишків дистроглікану, Богданік та співавт. [32] показали, що цей білок, як і дистрофін, також локалізується постсинаптично у глутаматергічних НМЗ личинок 3-го віку дрозофіли. У особин з функціональним нокаутом гена *Dg* у м'язах із використанням активатора транскрипції 24В-Gal4 спостерігали зниження кількості цього білка у синапсі. Надекспресія гена *Dg* підвищувала концентрацію білка у вигляді нечітких окремих скупчень. Важливо, що мутанти за геном *Dg* характеризуються відсутністю експресії дистрофіну та її появою при надекспресії гена *Dg*. І навпаки, функціональний нокаут дистрофіну у м'язах спричиняє послаблену експресію дистроглікану. Останнє вказує на те, що дистроглікан контролює концентрацію дистрофіну у глутаматергічних НМЗ, а дистрофін – концентрацію дистроглікану. За допомогою електрофізіологічного аналізу у роботі [32] також показано, що втрата *Dg* у м'язах, тобто постсинаптично, веде до зниження пресинаптичного вивільнення глутамату на 40 %.

Вейркар та співавт. [39] ідентифікували мутації у гені *rt*, який кодує білок РОМТ1 – гомолог О-манозилтрансферази людини. Мутанти дрозофіли за

геном *dPOMT1* характеризуються зниженням ефективної передачі сигналів у синапсах через зменшення кількості вивільнених синаптичних міхурців та зміною будови субодиниць рецептора глутамату у НМЗ. Автори встановили, що у дрозофіли *dPOMT1* є необхідним для глікозилування дистроглікану *in vivo* і, очевидно, порушення в цьому процесі викликають синаптичні дефекти, оскільки подібні фенотипи виявлено у мутантів за геном *Dg*. Встановлено також взаємодію генів *Dg* та *rt*. Важливо, що для нормального функціонування НМЗ необхідним є глікозилування дистроглікану *dPOMT1* як у м'язах, так і в нервах [39].

Іншими авторами [33] показано локалізацію ізоформи Dp186, специфічної для ЦНС, у нейропідлі ембріонів і личинок. Досліджено електрофізіологію центрального синапсу між мотонейронами та їхніми пресинаптичними холінергічними інтернейронами. За відсутності ізоформи Dp186 постсинаптичне розташування рецептора нейромедіатора ацетилхоліну AchR є непорушеним, проте у відповідь на певний стимул збільшується пресинаптичне вивільнення нейромедіатора.

Отже, якщо ізоформа DLP2 є важливою для нормального функціонування НМЗ, де роль нейромедіатора відіграє глутамат, то ізоформа Dp186 необхідна для центрального холінергічного синапсу. При цьому ізоформа Dp186 здійснює подібне регулювання, використовуючи інші сигнальні шляхи, ніж ВМР-залежний, як DLP2 [33].

Дистрофін і дистроглікан необхідні для підтримання м'язової цілісності у личинок дрозофіли. Ван дер Плас зі співавт. [28] виявили, що в м'язах експресується не лише довга ізоформа дистрофіну DLP2, а й коротка Dp117. Очевидно, разом вони відіграють певну роль у підтриманні м'язової цілісності. Зниження експресії Dp117 веде до дегенерації м'язової тканини та летального ефекту. Автори [28] перевірили такі дегенеровані личинкові та дорослі м'язи на апоптоз і показали, що цей процес не причетний до виникнення морфологічних змін у м'язах, а порушення м'язової тканини, вочевидь, викликані некрозом. При функціональному нокауті всього гена дистрофіну у м'язах личинок спостерігали сильнішу дегенерацію м'язів, ніж при зниженні експресії лише ізоформи Dp117, що

вказує на важливість для підтримання цілісності м'язів поряд з Dp117 і інших ізоформ дистрофіну. Під час метаморфозу у дрозофіли всі личинкові м'язи дегенерують і замінюються на дорослі. При зниженні експресії дистрофіну відродження м'язів на початку стадії лялечки проходить без відхилень, але вже на пізніх стадіях лялечки, коли м'язи активно працюють під час линяння, проявляється м'язова дегенерація. Автори зробили висновок, що дистрофін не є важливим для міогенезу, проте відіграє певну роль у підтриманні м'язової цілісності, яка, очевидно, порушується у зв'язку з виконанням вправ [28]. Дослідники проаналізували залежність рівня дегенерації м'язів та летальності і не виявили між ними кореляції. Наприклад, до летального ефекту на стадії личинки 3-го віку призводить зниження рівня експресії Dp117 у м'язах, хоча дегенерація цієї тканини менш виражена, ніж у мух з функціональним нокаутом довгих ізоформ дистрофіну. У таких мух знайдено суттєві порушення у м'язовій тканині, однак гинуть вони лише в дорослому віці. Дослідники припустили, що летальний ефект спричиняють відхилення у функціонуванні не тільки м'язової, а й інших тканин, де дистрофін теж необхідний. Варто зазначити, що мухи, у яких відсутня ізоформа Dp117 у м'язах, втрачають здатність до живлення на 2-й стадії личинки і саме тому, очевидно, гинуть. Цей поведінковий фенотип міг виникнути через пошкодження м'язів, залучених до травлення. Автори [28] підсумували, що ізоформа Dp117 є важливою для підтримання цілісності м'язів на більш ранній стадії розвитку, ніж DLP2.

Групою інших вчених [40] визначено дефекти у прикріпленні м'язів і їхньому скороченні, зміни у стійкості м'язової мембрани у мутантних за геном *Dg* личинок та при функціональному нокауті цього гена. У мутантів за генами *rt* і *tw*, що кодують глікозилтрансферази dPOMT1 та dPOMT2 відповідно, спостерігали подібні фенотипові прояви. Автори показали взаємодію генів *Dg*, *tw* і *rt*, що свідчить про функціонування продуктів цих генів в одному сигнальному шляху.

Мутанти за геном *Dg* характеризуються пришвидшеним метаболізмом. Згідно з результатами Такеучі зі співавт. [41], мутантні за геном *Dg* личинки 3-го віку *D. melanogaster* характеризуються

кріофільним фенотипом, тобто надають перевагу нижчим температурам (близько 18 °C) порівняно з контролем (приблизно 22 °C). У таких личинок у порівнянні з диким типом відмічено інтенсивніше виділення CO₂ та концентрація АТФ, тобто прискорюється метаболізм. Таке часто трапляється в екотермічних тварин при адаптації до низьких температур. Важливо також, що у мутантів за геном *Dg* спостерігається збільшений рівень іонів Ca²⁺, які, очевидно, активують піруватдегідрогеназу, а це спричиняє підвищений оксидативний метаболізм у мітохондріях.

Підсумовуючи, автори припустили, що зниження чи відсутність експресії гена *Dg* викликає «протікання» плазматичної мембрани, активує викид іонів Ca²⁺, які прискорюють оксидативний метаболізм у мітохондріях, а це, в кінцевому рахунку, призводить до зміненої терморегуляторної поведінки [41].

У дрозофіли зі зниженим рівнем експресії генів *Dys* і *Dg* вкорочена тривалість життя. Одним із перших описаних мутантних фенотипів за генами *Dys* і *Dg*, яким характеризуються дорослі особини *D. melanogaster*, стало скорочення тривалості життя. У мух з функціональним нокаутом ізоформ з N- та C-кінця транскрипта гена дистрофіну в усіх клітинах (з використанням драйвера *tubGal4*) не реєструється плато на кривих виживання, а максимальна тривалість життя становить 10–22 діб порівняно з 45 добами у лінії дикого типу Oregon [42].

Іншими авторами [34] показано, що функціональний нокаут дистрофіну в мезодермі веде до скорочення тривалості життя приблизно на 13 %, тим самим засвідчуючи важливість функціонування дистрофіну в усіх м'язах для підтримання нормальної життєздатності. Мухи, трансгетерозиготні за делеціями різної довжини в гені дистрофіну, продемонстрували значно нижчу максимальну тривалість життя (приблизно 40 діб) порівняно з контролем (близько 75 діб). Не зафіксовано змін тривалості життя при зниженні експресії дистрофіну в серці особин [34].

Дистрофін і дистроглікан у дрозофіли причетні до формування вен крила. Наглядним і дуже зручним для генетичного скринінгу проявом мутантного за генами *Dg* та *Dys* фенотипу в імаго

Drosophila є порушення формування вен крила. Якщо у особин дикого типу формуються суцільні вени: п'ять поздовжніх та дві поперечні (передня і задня), то в особин з мутантним фенотипом задня поперечна вена перервна, галузиться або ж взагалі відсутня [43–47]. Цей фенотип першочергово використано для отримання мутантів і пошуку генів – модифікаторів ДГК.

Дистрофін і дистроглікан необхідні для елонгації оматидій складного ока дрозофіли. У мутантів за генами *Dys* і *Dg* та у трансгенних мух зі зниженою експресією цих генів спостерігали також неправильне видовження фоторецепторних клітин сітківки ока дорослих мух [24, 48]. Авторами [48] показано, що довжина оматидій у гомозиготних і гетерозиготних мутантів за «нуль»-алелями є майже в 3 рази меншою, ніж у мух дикого типу, причому порушення організації і росту оматидій відбувається ще у личинковому віці.

У дрозофіли зі зниженим рівнем експресії генів *Dys* і *Dg* зменшена локомоторна активність. Досліджено локомоторну активність в імаго зі зниженими рівнями *Dys* і *Dg* в усіх клітинах з використанням драйвера *tubGal4*. Зменшення індексу локомоторної активності відмічено вже в перші дні життя мух порівняно з контролем. Для кількісної оцінки визначали день, на який величина індексу падала на 50 %. У мух дикого типу це відбувалося на 22–24-й день життя, натомість у трансгенних мух – на 10–14-й день. Щоб дізнатися, чи призведе до подібного результату втрата функції *Dg* і *Dys* у м'язах, використано драйвер *24B-Gal4*, який специфічно експресується у тканинах мезодермального походження. Як і раніше, особини швидко втрачали локомоторну здатність.

Таким чином, встановлено, що *Dg* і *Dys* у дрозофіли відіграють важливу роль у забезпеченні локомоторної функції та нормального функціонування м'язів [24].

У дрозофіли зі зниженим рівнем експресії генів *Dys* і *Dg* дегенерують м'язові волокна. На основі аналізу гістологічних зрізів непрямих літальних м'язів тораксу імаго з використанням конфокальної та світлової мікроскопії виявлено морфологічні зміни у м'язовій тканині мутантів за геном дистрофину, а також у мух зі зниженим рівнем ек-

спресії генів *Dys* і *Dg*. Крім того, у пошкоджених м'язах дрозофіли, як і у хребетних, зафіксовано центральне розміщення ядер [24]. У 12–20-денних мутантів спостерігали вакуолізацію м'язових волокон або повну відсутність окремих м'язів, причому ці зміни швидко прогресували з віком особин порівняно з молодими триденними особинами. Автори вважають, що це може бути однією з причин порушення локомоторної активності.

Кучеренко зі співавт. [35] виявили, що індукувати та підсилювати м'язову дегенерацію у дрозофіли може стрес. Вони показали, що висока температура та оксидативний стрес спричиняють м'язову дегенерацію як у мутантів за генами *Dys* і *Dg*, так і в особин дикого типу. А такі фактори, як низька температура і енергетичний стрес (коли йдеться про мутантів за геном *Dg*) посилюють ушкодження м'язової тканини [35].

Іншими авторами [34] встановлено, що делеції в гені дистрофину у серці дрозофіли викликають залежну від віку дегенерацію міокарда та порушення роботи серця. У мутанта за геном *Dys* вже на першому тижні життя виявлено порушене розташування міофібрил міокарда, і цей фенотип прогресував з віком особин. Крім того, відмічено зменшення інтервалу діастолі, що пришвидшує темп роботи серця.

Висновки. Для з'ясування ролі різних білків у складі дистрофін-глікопротеїнового комплексу важливим завданням є розробка модельних систем, у яких були б присутні фенотипові прояви м'язових дистрофій.

Прояви дистрофії, подібні до таких людини, описано у миші та собаки, однак проблематика вивчення причин і механізмів розвитку цих патологій у хребетних полягає у складності будови ДГК і наявності багатьох ізоформ кожного з білків, що утруднює отримання мутантів. Саме тому актуальними на сьогодні є дослідження на безхребетних організмах, таких як *D. melanogaster*. Дрозофіла дозволяє проводити генетичні експерименти, які неможливо здійснити на хребетних. У цього об'єкта є більшість компонентів ДГК і вони проявляють високий ступінь гомології з відповідними білками людини. Крім того, мутанти за генами *Dys* і *Dg* характеризуються фенотипами, подібними до таких у

людини при розвитку міопатій. Таким чином, використання *D. melanogaster* як модельної системи для вивчення м'язових дистрофій людини є зручним і перспективним.

V. M. Rishko, N. Ya. Holub, Ya. I. Chernyk

Phenotypes of the *Drosophila melanogaster* caused by dysfunction of dystrophin and dystroglycan

Ivan Franko National University of L'viv
4, Hrushevskoho Str., Lviv, Ukraine, 79005

Summary

Dystrophin and dystroglycan, the main components of the dystrophin-glycoprotein complex, are essential for normal vital activity of the D. melanogaster during ontogenesis. Mutations in the genes, which encode these proteins, cause different phenotypes, among manifestations of which we noticed characters similar to those observed at human muscular dystrophy. Furthermore, several other phenotypes have been described; their study will shed light on our understanding the development of different pathologies. In addition, it gives an opportunity to reveal new components of the dystrophin-glycoprotein complex as well as new regulatory proteins, which influence the functions of this complex. Thus, based on the D. melanogaster, an appropriate model has been developed to study human myopathies.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, Dystrophin-Glycoprotein complex, muscular dystrophies, dystrophin (dystroglycan) expression.

В. М. Ришко, Н. Я. Голуб, Я. І. Черник

Фенотипи *Drosophila melanogaster*, обусловленные нарушениями функционирования дистрофина и дистрогликана

Резюме

Основные компоненты дистрофин-гликопротеинового комплекса – дистрофин и дистрогликан – необходимы для нормальной жизнедеятельности D. melanogaster на протяжении всего онтогенеза. Мутации в генах этих белков вызывают разные фенотипы, среди проявлений которых встречаются признаки, характерные для мышечной дистрофии человека. Кроме того, описаны некоторые другие фенотипы, изучение которых проливает свет на понимание течения разных патологий, дает возможность выявить новые компоненты в составе дистрофин-гликопротеинового комплекса и новые регуляторные белки, влияющие на функционирование этого комплекса. Таким образом, на основе генетического объекта D. melanogaster создана хорошая модельная система для изучения миопатий человека.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, дистрофин-гликопротеиновый комплекс, мышечные дистрофии, экспрессия дистрофина (дистрогликана).

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Davies K. E., Nowak K. J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*–2006.–7, N 10.–P. 762–773.
2. Matsumura K., Campbell K. P. Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies // *Muscle Nerve.*–1994.–17, N 1.–P. 2–15.
3. Rando T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies // *Muscle Nerve.*–2001.–24, N 12.–P. 1575–1594.
4. Durbeek M., Campbell K. P. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models // *Curr. Opin. Genet. Dev.*–2002.–12, N 3.–P. 349–361.
5. Lavidor K. A., Kakkar R., McNally E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma // *Circ. Res.*–2004.–94, N 8.–P. 1023–1031.
6. Hoffman E. P., Brown R. H. Jr., Kunkel L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus // *Cell.*–1987.–51, N 6.–P. 919–928.
7. Blake D. J., Weir A., Newey S. E., Davies K. E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle // *Physiol. Rev.*–2002.–82, N 2.–P. 291–329.
8. Bennett R. R., den Dunnen J., O'Brien K. F., Darras B. T., Kunkel L. M. Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing // *BMC Genet.*–2001.–2, N 1.–P. 17.
9. Byers T. J., Lidov H. G., Kunkel L. M. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve // *Nat. Genet.*–1993.–4, N 1.–P. 77–81.
10. Allamand V., Campbell K. P. Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies // *Hum. Mol. Genet.*–2000.–9, N 16.–P. 2459–2467.
11. Godfrey C., Clement E., Mein R., Brockington M., Smith J., Talim B., Straub V., Robb S., Quinlivan R., Feng L., Jimenez-Mallebrera C., Mercuri E., Manzur A. Y., Kinali M., Torelli S., Brown S. C., Sewry C. A., Bushby K., Topaloglu H., North K., Abbs S., Muntoni F. Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan // *Brain.*–2007.–130, N 10.–P. 2725–2735.
12. Barresi R., Campbell K. P. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease // *J. Cell Sci.*–2006.–119, N 2.–P. 199–207.
13. Willmann R., Possekel S., Dubach-Powell J., Meier T., Ruegg M. A. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy // *Neuromuscul. Disord.*–2009.–19, N 4.–P. 241–249.
14. Collins C. A., Morgan J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies // *Int. J. Exp. Pathol.*–2003.–84, N 4.–P. 165–172.
15. Nowak K. J., Davies K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment // *EMBO Rep.*–2004.–5, N 9.–P. 872–876.
16. Nakamura A., Takeda S. Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications // *J. Biomed. Biotechnol.*–2011.–2011.–Article ID 184393, 8 pages. Doi:10.1155/2011/184393184393.
17. Bessou C., Giugia J. B., Franks C. J., Holden-Dye L., Segalat L. Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission // *Neurogenetics.*–1998.–2, N 1.–P. 61–72.
18. Pilgram G. S., Potikanond S., Baines R. A., Fradkin L. G., Noor-dermeer J. N. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse // *Mol. Neurobiol.*–2010.–41, N 1.–P. 1–21.
19. Bassett D., Currie P. D. Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*–2004.–31, N 8.–P. 537–540.
20. Greener M. J., Roberts R. G. Conservation of components of the dystrophin complex in *Drosophila* // *FEBS Lett.*–2000.–482, N 1–2.–P. 13–18.

21. Neuman S., Kovalio M., Yaffe D., Nudel U. The *Drosophila* homologue of the dystrophin gene – introns containing promoters are the major contributors to the large size of the gene // *FEBS Lett.*–2005.–**579**, N 24.–P. 5365–5371.
22. Deng W. M., Schneider M., Frock R., Castillejo-Lopez C., Gaman E. A., Baumgartner S., Ruohola-Baker H. Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila* // *Development.*–2003.–**130**, N 1.–P. 173–184.
23. Huang X., Poy F., Zhang R., Joachimiak A., Sudol M., Eck M. J. Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan // *Nat. Struct. Biol.*–2000.–**7**, N 8.–P. 634–638.
24. Shcherbata H. R., Yatsenko A. S., Patterson L., Sood V. D., Nudel U., Yaffe D., Baker D., Ruohola-Baker H. Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy // *EMBO J.*–2007.–**26**, N 2.–P. 481–493.
25. Yatsenko A. S., Gray E. E., Shcherbata H. R., Patterson L. B., Sood V. D., Kucherenko M. M., Baker D., Ruohola-Baker H. A putative Src homology 3 domain binding motif but not the C-terminal dystrophin WW domain binding motif is required for dystroglycan function in cellular polarity in *Drosophila* // *J. Biol. Chem.*–2007.–**282**, N 20.–P. 15159–15169.
26. Dekkers L. C., van der Plas M. C., van Loenen P. B., den Dunnen J. T., van Ommen G. J., Fradkin L. G., Noordermeer J. N. Embryonic expression patterns of the *Drosophila* dystrophin-associated glycoprotein complex orthologs // *Gene Expr. Patterns.*–2004.–**4**, N 2.–P. 153–159.
27. van der Plas M. C., Pilgram G. S., Plomp J. J., de Jong A., Fradkin L. G., Noordermeer J. N. Dystrophin is required for appropriate retrograde control of neurotransmitter release at the *Drosophila* neuromuscular junction // *J. Neurosci.*–2006.–**26**, N 1.–P. 333–344.
28. van der Plas M. C., Pilgram G. S., de Jong A. W., Bansraj M. R., Fradkin L. G., Noordermeer J. N. *Drosophila* Dystrophin is required for integrity of the musculature // *Mech. Dev.*–2007.–**124**, N 7–8.–P. 617–630.
29. Neuman S., Kaban A., Volk T., Yaffe D., Nudel U. The dystrophin/utrophin homologues in *Drosophila* and in sea urchin // *Gene.*–2001.–**263**, N 1–2.–P. 17–29.
30. Schneider M., Khalil A. A., Poulton J., Castillejo-Lopez C., Eger-Adam D., Wodarz A., Deng W. M., Baumgartner S. Perlecan and Dystroglycan act at the basal side of the *Drosophila* follicular epithelium to maintain epithelial organization // *Development.*–2006.–**133**, N 19.–P. 3805–3815.
31. Yatsenko A. S., Kucherenko M. M., Pantoja M., Fischer K. A., Madeoy J., Deng W. M., Schneider M., Baumgartner S., Akey J., Shcherbata H. R., Ruohola-Baker H. The conserved WW-domain binding sites in Dystroglycan C-terminus are essential but partially redundant for Dystroglycan function // *BMC Dev. Biol.*–2009.–**9**.–P. 18.
32. Bogdanik L., Framery B., Frolich A., Franco B., Mornet D., Bockaert J., Sigrist S. J., Grau Y., Parmentier M. L. Muscle dystroglycan organizes the postsynapse and regulates presynaptic neurotransmitter release at the *Drosophila* neuromuscular junction // *PLoS One.*–2008.–**3**, N 4.–e2084.
33. Fradkin L. G., Baines R. A., van der Plas M. C., Noordermeer J. N. The dystrophin Dp186 isoform regulates neurotransmitter release at a central synapse in *Drosophila* // *J. Neurosci.*–2008.–**28**, N 19.–P. 5105–5114.
34. Taghli-Lamalle O., Akasaka T., Hogg G., Nudel U., Yaffe D., Chamberlain J. S., Ocorr K., Bodmer R. Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype // *Aging Cell.*–2008.–**7**, N 2.–P. 237–249.
35. Kucherenko M. M., Marrone A. K., Rishko V. M., Magliarelli H. de F., Shcherbata H. R. Stress and muscular dystrophy: a genetic screen for dystroglycan and dystrophin interactors in *Drosophila* identifies cellular stress response components // *Dev. Biol.*–2011.–**352**, N 2.–P. 228–242.
36. Mirouse V., Christoforou C. P., Fritsch C., St Johnston D., Ray R. P. Dystroglycan and perlecan provide a basal cue required for epithelial polarity during energetic stress // *Dev. Cell.*–2009.–**16**, N 1.–P. 83–92.
37. Grady R. M., Merlie J. P., Sanes J. R. Subtle neuromuscular defects in utrophin-deficient mice // *J. Cell. Biol.*–1997.–**136**, N 4.–P. 871–882.
38. Grady R. M., Zhou H., Cunningham J. M., Henry M. D., Campbell K. P., Sanes J. R. Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex // *Neuron.*–2000.–**25**, N 2.–P. 279–293.
39. Wairkar Y. P., Fradkin L. G., Noordermeer J. N., DiAntonio A. Synaptic defects in a *Drosophila* model of congenital muscular dystrophy // *J. Neurosci.*–2008.–**28**, N 14.–P. 3781–3789.
40. Haines N., Seabrooke S., Stewart B. A. Dystroglycan and protein O-mannosyltransferases 1 and 2 are required to maintain integrity of *Drosophila* larval muscles // *Mol. Biol. Cell.*–2007.–**18**, N 12.–P. 4721–4730.
41. Takeuchi K., Nakano Y., Kato U., Kaneda M., Aizu M., Awano W., Yonemura S., Kiyonaka S., Mori Y., Yamamoto D., Umeda M. Changes in temperature preferences and energy homeostasis in dystroglycan mutants // *Science.*–2009.–**323**, N 5922.–P. 1740–1743.
42. Rishko V., Poberezhnyk O., Kucherenko M., Holub N., Maksymiv D., Chernyk Ya. The influence of *Dad* and *tkv* genes on dystrophin-deficient phenotype in *Drosophila melanogaster* // *Visnyk of Lviv Univ. Biology series.*–2009.–**51**.–P. 55–62.
43. Christoforou C. P., Greer C. E., Challoner B. R., Charizanos D., Ray R. P. The detached locus encodes *Drosophila* Dystrophin, which acts with other components of the Dystrophin Associated Protein Complex to influence intercellular signalling in developing wing veins // *Dev. Biol.*–2008.–**313**, N 2.–P. 519–532.
44. Kucherenko M. M., Pantoja M., Yatsenko A. S., Shcherbata H. R., Fischer K. A., Maksymiv D. V., Chernyk Y. I., Ruohola-Baker H. Genetic modifier screens reveal new components that interact with the *Drosophila* dystroglycan-dystrophin complex // *PLoS One.*–2008.–**3**, N 6.–e2418.
45. Kucherenko M., Yatsenko A., Ruohola-Baker H., Maksymiv D., Chernyk Ya. *Drosophila melanogaster* as a model system for searching of the Dystrophin-Dystroglycan Complex modifiers // *Visnyk of Lviv Univ. Biology series.*–2008.–**46**.–P. 71–77.
46. Bridges C. B., Brehme K. F. The mutants of *Drosophila melanogaster*.–Washington: Carnegie Inst. Publ., 1944.–Vol. 552.–257 p.
47. Sturtevant M. A., Bier E. Analysis of the genetic hierarchy guiding wing vein development in *Drosophila* // *Development.*–1995.–**121**, N 3.–P. 785–801.
48. Zhan Y., Melian N. Y., Pantoja M., Haines N., Ruohola-Baker H., Bourque C. W., Rao Y., Carbonetto S. Dystroglycan and mitochondrial ribosomal protein l34 regulate differentiation in the *Drosophila* eye // *PLoS One.*–2010.–**5**, N 5.–e10488.

UDC 595.773.4:575'113'224.4:591.139

Received 18.07.11