

МАТІЙЦІВ Н. П.

Львівський національний університет ім. І. Франка,
Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: nataliya.matiytsiv@lnu.edu.ua, (097) 199-32-93

SWS/NTE-ЗАЛЕЖНА НЕЙРОПАТІЯ – МОДЕЛЬНА СИСТЕМА ВИВЧЕННЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦІЇ

На сьогодні описана велика кількість нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*, які характеризуються розвитком дегенеративних змін у мозку. Одним із таких є мутант за геном *swiss cheese (sws)*. Мутації в цьому гені зумовлюють апоптоз нейронів та гіперогортання їхньої соми гліальними клітинами, вкорочення тривалості життя та зниження рухливості. Ген *sws* є ортологом гена нейротоксичної естерази (*NTE / PNPLA6*) ссавців. *NTE* є нейрональним, трансмембранним білком, який має серинестеразну активність, а також може бути мішенню дії нейротоксичних фосфоорганічних сполук. Мутації у гені *PNPLA6* зумовлюють низку спадкових нейродегенеративних розладів, невиліковних на цей час. Пошук терапевтичних засобів потребує використання модельних об'єктів, через те що дослідження на людині мають як методичні, так і етичні обмеження. Протягом двох останніх десятиліть *D. melanogaster* зарекомендувала себе хорошою моделлю для вивчення нейродегенеративних захворювань. У цьому огляді ми розглядаємо основні характеристики гена *sws D. melanogaster*, наслідки мутацій у ньому, та наводимо докази високої консервативності продукту гена.

Ключові слова: ген *swiss cheese*, нейротоксична естераза, нейродегенерація, мозок, тривалість життя.

Із розвитком медицини у розвинених країнах значно збільшується тривалість життя, проте віковозалежні нейродегенеративні захворювання являють собою складну проблему. Так, хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Гантінгтона, аміотрофічний латеральний склероз належать до категорії невиліковних. Лікування та діагностика нейродегенеративних захворювань значно відстають від прогресу медицини, оскільки основні біологічні причини багатьох цих захворювань погано вивчені. Оскільки дослідження на людях мають як методологічні, так і етичні обмеження, зберігається актуальність дослідження захворювань на модельних об'єктах. Тому важ-

ливо використовувати простий модельний об'єкт для дослідження процесів, які є важливими для збереження здорових і функціональних нейронів протягом життя організму. *Drosophila melanogaster* – чудовий вибір для вивчення нейродегенеративних захворювань із кількох причин. По-перше, більшість генів, які залучені в певних патологіях, мають функціонального ортолога у дрозофіли [1, 2]. Крім того, інші важливі гени, які пов'язані з хворобою і залишаються невідомими, можуть бути ідентифіковані неупередженим чином з використанням прямих генетичних скринінгів, а також, можливо, ідентифікувати фактори, що сприяють цим захворюванням, тобто посилюють або ініціюють нейродегенеративний фенотип. По-друге, мозок дрозофіли досить складний, щоб вивчати взаємодію між нейронами і глією, виявляти нервові ланцюги і процеси, пов'язані зі старінням [3, 4]. По-третє, їхня відносно коротка тривалість життя робить плодових мушок зручною генетичною системою для моделювання хвороб і для розуміння фізіологічних функцій білків *in vivo*.

Сьогодні описано більше двадцяти нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*, які характеризуються розвитком дегенеративних змін у мозку. Для них притаманні вікова дегенерація нейронів та глії, «вакуолізація» тканин нервової системи, апоптоз і вкорочена тривалість життя. Деякі з генів дрозофіли є ортологами генів захворювань людини, і патологічні зміни в структурі мозку схожі з такими ж змінами у хворих людей. Цей огляд ми присвятили одному з найбільш вивчених генів *D. melanogaster*, мутації в якому викликають нейродегенерації – гена *swiss cheese (sws)* та його ортолога людини – гена нейротоксичної естерази (*NTE / PNPLA6*).

Ген *swiss cheese D. melanogaster*

Нейродегенеративний мутант *D. melanogaster* за геном *sws* був отриманий під час скринінгових досліджень із використанням тесту на швидкий фототаксис. Продукт цього гена – тра-

нсмембранний білок ендоплазматичного ретикулу, що відзначається естеразною активністю, задіяний у регулюванні метаболізму фосфатидилхоліну. Мутація в гені *sws* зумовлює надлишкове обгортання нейронів клітинами глії [5].

Мухи *sws* характеризуються виражено вкороченою тривалістю життя (порівняно з особинами дикого типу). Мутанти розвиваються нормально, і центральна нервова система на рівні світлової мікроскопії залишається інтактною у молодих мух. Проте вже через 5 днів стадії імаго за 25°C у мозку розпочинається вакуолізація нейропілю, що швидко прогресує із подальшим старінням мутантних особин (рис. 1). Підвищення температури може спричинити розвиток більш інтенсивної дегенерації. Так під час утримання мух за 29°C 7-денні мутанти показують фенотип 20-денних особин за температури 25°C. За допомогою методу імунофлюорисцентної детекції фрагментації ДНК (ApopTag) перші апоптичні зміни у мутантів можуть бути зафіксованими у віці 3–4 днів, а до 20 дня життя імаго майже весь кортекс інтенсивно зафарбовується. В ході електронно-мікроскопічних досліджень тканини мозку старих особин також була зафіксована велика кількість клітин, що підлягають апоптозу.

Дегенерація поширюється не лише на нейрони, але і на гліальні клітини, котрі, відмираючи, інтенсивно забарвлюються толуїдиновим синім кольором на гістологічних зрізах [5].

У ході більш детальних гістологічних досліджень молодих особин за допомогою електронної мікроскопії було виявлено, що навколо 10 % нейронів мозкового кортексу утворюється багаточарове гіперогортання з мембран оточу-

ючої глії [5]. В нормальних умовах, гліальні клітини огортають нейрони одним, зрідка двома шарами. У випадку мутантів частота багаточарових структур у кортексі, а також у нейропілі значно зростає. Ці структури вперше з'являються на стадії пізньої лялечки (задовго до формування вакуолей) та збільшуються в розмірі з віком імаго. Це може свідчити про те, що гіперогортання є наслідком порушень диференціації гліальних клітин, а не відповіддю глії на дегенерацію нейронів. Такий дефект може мати негативний вплив на виживання нейронів, що веде до масової дегенерації в старих мутантних особин. Очевидно, правильне формування гліального огортання є дуже важливим для функціонування і життєздатності нейрональних зв'язків як у хребетних, так і у безхребетних.

Використовуючи низку делеційних ліній дрозофіли, ген *sws* був картований на ділянці хромосоми 7D1 [5, 6]. Наступне секвенування мутантних алелей показало, що у двох ліній мутація утворилася внаслідок однієї амінокислотної заміни, а у третьої, *sws*¹, міссенс-мутація призводить до утворення вкороченого білка. Цей ген утворює три транскрипти, що підлягають альтернативному сплайсингу: два довгі SWS-RA та SWS-RC розміром 5,4 т. п. н. і мінорний SWS-RB транскрипт розміром 1,7 т. п. н. За допомогою NorthernBlot гібридизації було з'ясовано, що довгі транскрипти експресуються у всьому тілі мухи, а короткий – лише у голові [5]. У *sws*¹ було ідентифіковано нуклеотидну заміну в положенні 1616, що утворює amber стоп-кодон на місці серинового кодону.

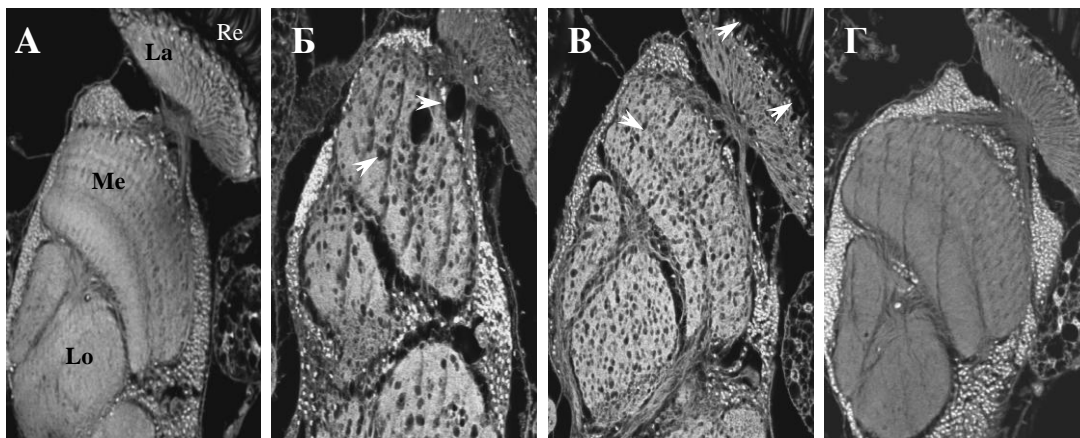


Рис. 1. Гістологічні 7 μm зрізи оптичної частки мозку 20-денних особин *D. melanogaster*: А – самці лінії дикого типу *Oregon-R*; Б – гемізіготні мутантні самці *sws*¹; В – гемізіготні мутантні самці *sws*⁷⁶⁻¹⁵; Г – гетерозиготні самці *sws*¹/*Oregon*. Re –retina, La-lamina, Me-medula, Lo-lobula [6].

Внаслідок цього білок SWS в такого мутанта є вкороченим до $\frac{1}{4}$ його нормального розміру, що призводить до втрати функціональності. В *sws*⁵ відбувається заміна аргініну на гліцин в положенні 2431, в *sws*⁴ в положенні 3357 аспарагіну на гліцин [5], а в мутанта *sws*⁷⁶⁻¹⁵ виявлено точкову мутацію, що спричиняє амінокислотну заміну в С-кінцевому домені білка SWS [6]. Функціональні зміни у мутанта 76–15 пов'язані із патологією цитоскелету аксонів мозку.

Окрім вкороченої тривалості життя та змін у тканині мозку, мутантам за геном *sws* характерне значне зниження рухової активності із старінням особин [7, 8]. Знижена рухливість виявлялася після 12 дня життя, та виражалася як у «climbing» тесті, так і в експерименті у «відкритому полі». Порушення поведінкових реакцій за неродегенеративних змін мозку є ще одним підтвердженням консервативності фетотипових проявів за цього типу патологій у людини та дрозофіли.

Для встановлення необхідності білка SWS за функціонування нейронів чи глії рекомбінантний *Dsws* транскрипт вибірково експресували в мутантних мух, використовуючи бінарну GAL4-UAS систему. Індукція нейрональної експресії генетичної конструкції *Dsws* у всьому нейропілі дорослої мухи супресувала лише вакуолізацію нервової тканини, але не мала ефекту на гліальні гіперогортання і наступну їх дегенерацію [9]. Так само, експресія *Dsws* в гліальних клітинах рятує лише гліальний фенотип, у той час як вакуолізація від дегенерації нейронів залишалася незмінною. Ці дані підтверджують клітинно-автономні потреби в SWS білку як нейронів ЦНС, так і кортикальної глії. Причому ця потреба є постійною і не може бути задоволена періодичною чи тимчасовою експресією гена [9].

За останніми дослідженнями ген *sws* активно експресується практично в усьому тілі дрозофіли. Під час онтогенезу рівень експресії гена є найвищим на стадіях раннього ембріона та пізньої лялечки, а також у дорослих особин. *In situ* гібридизація, а також імуногістохімічне фарбування горизонтальних кріосекцій мозку молодих імаго підтвердили експресію *sws* у всьому кортексі та клітинах поверхневої глії, які локалізуються між кортексом і нейропілем [10].

Під час ультраструктурного дослідження нейронів *sws*¹ мутантів видно чіткі порушення мембранних структур ER, що прогресують із

віком. Водночас мітохондрії та інші органели клітини залишаються інтактними як в молодих, так і в старих особин, що свідчить про те, що білок SWS має вирішальне значення для життєдіяльності ендоплазматичного ретикулуму [9, 10]. Втрата функції білка SWS призводить до підвищення рівня лізофосфатидилхоліну (LPC) і фосфатидилхоліну (PC), такий дисбаланс мембранних ліпідів активує стресову відповідь ER шляхом інгібування сарко/ER Ca²⁺ АТФ-ази (SERCA) [9, 11]. Доказом активації стресу ER у мутантів *sws*¹ слугує підвищення рівня шаперонного комплексу GRP78 / BiP [12]. Припускається, що саме стрес ER, індукований ліпідним дисбалансом, лежить в основі нейродегенеративних змін за порушення функції гена *sws*.

SWS ортолог NTE людини

У ході первинних досліджень у 1997 році SWS був охарактеризований як новий невідомий досі білок, проте рік по тому було виявлено ортолог ссавців, білок NTE (neuropathy target esterase). Під час порівняння SWS дрозофіли (DSWS) з NTE виявилось, що він на 39 % гомологічний до мишачого SWS/NTE (MSWS), який у свою чергу на 96 % ідентичний з NTE людини. Вони також є функціональними ортологами, оскільки експресія *Msws* транскрипту в мутантів *sws*¹ в нейропілі та гліальній тканині була такою ж ефективною для порятунку мутантного фенотипу, як і експресія дрозофільного *Dsws* [13, 14]. Для SWS/NTE характерна наявність чотирьох основних доменів: три нуклеотидзв'язуючих (NBD), які забезпечують зв'язування каталітичної субодиниці протеїнази Pka-C3, таким чином регулюючи її кіназну активність; та один естеразний домен (EST), який розщеплює фосфорорганічні сполуки. Використовуючи програмне забезпечення SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), та Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) ми зробили порівняльну ілюстрацію імовірної доменної структури білків SWS дрозофіли та NTE людини (рис. 2).

NTE ссавців є нейрональним, трансмембранним білком, який відзначається серинестеразною активністю [9, 14] та активністю лізофосфоліпази В. Цей домен здійснює детерифікацію фосфатидилхоліну, що є основним компонентом біологічних мембран, на його складові (жирні кислоти і гліцерофосфохолін). Отже, NTE, як і SWS, забезпечує гомеостаз мембранних ліпідів.

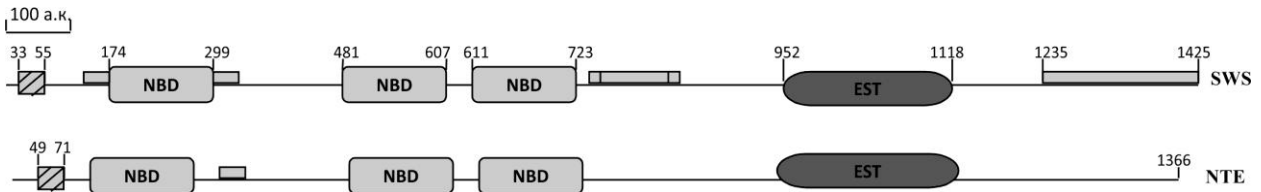


Рис. 2. Імовірна доменна структура білків SWS *D. melanogaster* NTE людини: смугасті прямокутники – трансмембранний домен; сірі малі прямокутники – домени з невідомою функцією; NBD – нуклеотидзв’язуючі домени; EST – естеразний домен.

Крім того, і NTE, і SWS містять ділянку, яка гомологічна регуляторній субодиниці цАМФ залежної протеїнкінази (Pka-C3). Можна припустити, що SWS діє, як неканонічна регуляторна субодиниця, що інгібує каталітичну активність Pka-C3, і порушення цього інгібування веде до неконтрольованого вивільнення активної ПКА-C3, що є шкідливим для ЦНС [10]. Взаємодія між NTE/SWS та Pka-C3 має подвійну функцію: регуляція кіназної активності Pka-C3 та естеразної активності NTE/SWS.

Мутації в гені *PNPLA6*, який кодує NTE у людей, викликають різноманітні неврологічні розлади людини, включаючи спадкову спастичну параплегію (HSP), спадкову атаксію, синдром Гордон-Холмса, синдром Буше-Нойхаузера, синдром Лоуренс Мун, синдром Олівер-Макфарлейн і сліпоту Лебера. Більшість виявлених мутацій згруповані в межах короткої ділянки із 5100 амінокислотних залишків у домені EST [15]. Спадкова спастична параплегія (ССП) належить до спадково зумовленої патології з ураженням переважно пірамідних шляхів. СПП характеризується значною аксональною двобічною дегенерацією пірамідних трактів бокових стовбурів спинного мозку. Клінічні симптоми СПП зазвичай прогресують повільно. У дитячому віці можуть спостерігатися затримування моторного розвитку, незграбна хода, ноги при цьому нагадують ножиці [16]. У більш старшому віці спостерігається стомлюваність, скутість ніг, особливо під час бігу, стрибків, підйому сходами, виконання звичайного фізичного навантаження, тобто проявляється зниження рухової активності. Обмеження руху нижніх кінцівок пов’язують із тяжкістю тильного згинання стоп та слабкістю згиначів стегон. На С-кінці домену EST, другий кластер мутацій, розташований між залишками Ser1031-Pro1122, які викликають мозочкову атаксію і/або гіпогонадізм (синдром Буше-Нойхаузера, синдром Гордона-Холмса, спастична атаксія) [15]. Синдром Буше-

Нойхаузера характеризується відсутністю або неповним статевим розвитком, низькими рівнями лютеїнізуючого гормону (ЛГ), фолікостимулюючого гормону (ФСГ), тестостерону і естрадіолу, ознаками спинно-мозочкової атаксії і дистрофією судинного сплетення сітківки.

Синдром Буше-Нойхаузера схожий із мозочковою атаксією Холмса. Це рідкісна форма спадкової (успадковується за аутосомно-домінантним типом) атаксії мозочка. Спостерігається захворювання в осіб за 40 років, потім повільно прогресує (20 років і більше), єдиним симптомом на початковій стадії розвитку хвороби є нестійкість під час ходьби. Надалі спостерігається мозочкова дизартрія, помірні порушення в координації рухів [15, 16].

Інший кластер мутацій, розташований у CNB1 і 2 доменах (p.Val263Ile, p.Gly578Trp), ставить під загрозу здатність одного або обох регулюючих CNB1/2 доменів зв’язувати циклічні нуклеотид-монофосфати (сNMPs). Ці домени нездатні до конформаційних змін у відповідь на зміни внутрішньоклітинної концентрації сNMPs. Таким чином, домен EST перебуває в авто-загальмованому стані, що також викликає зазначені вище патології.

Висновки

Коли три десятиліття тому були описані перші нейродегенеративні мутанти *D. melanogaster*, серед яких і мутанти за геном *sws*, лише декілька ініціативних дослідницьких груп вірили у їх значення в розкритті механізмів нейродегенерації. Однак вже за кілька років накопичилося достатньо знань, які стали поштовхом для нових відкриттів у роботі на ссавцях, а згодом і у людини. Так, опис гена *sws* дрозофіли звернув увагу на його ортолог у людини *PNPLA6*, що сприяло відкриттю генетичної основи декількох рідкісних спадкових патологій. Саме дослідження природи SWS/NTE-залежної нейродегенерації вперше створило

підґрунтя для розуміння ролі гомеостазу ліпідів та стресу ендоплазматичного ретикулу в розвитку нейродегенеративних змін. На жаль, в описі цих механізмів усе ще залишаються білі

плями, тому зберігається актуальність продовжувати вивчення із використанням модельного об'єкта *D. melanogaster*.

References

1. Reiter L., Potocki L., Chien S., Gribskov M., Bier E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 2001. Vol. 11. P. 1114–1125.
2. Pandey U., Nichols C. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews.* 2011. Vol. 63, № 2. P. 411–436.
3. Partridge L. Some highlights of research on aging with invertebrates. *Aging Cell.* 2009. Vol. 8. P. 509–513.
4. Mohylyak I., Chernyk Ya. Functioning of glia and neurodegeneration in *Drosophila melanogaster*. *Cytology and Genetics.* 2017. Vol. 51. P. 202–213.
5. Kretzschmar D., Hasan G., Sharma S., Heisenberg M., Benzer S. The *swiss cheese* mutant cause glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17. P. 7425–7432.
6. Ryabova E., Matiytsiv N., Trush O., Mohylyak I., Kislik G., Melentev P., Sarantseva S. Swiss Cheese, *Drosophila* ortholog of hereditary spastic paraplegia gene NTE, maintains neuromuscular junction development and microtubule network; in Perveen F.K. (eds): *Drosophila melanogaster – Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*, *InTech*, 2018. doi: 10.5772/intechopen.73077.
7. Matiytsiv N.P., Mohylyak I.I., Truhs O.I., Chernik Y.I. Motor activity of *Drosophila melanogaster* neurodegenerative mutants. *Visnyk of the Odessa University. Series Biology.* 2013. Vol. 18. P. 70–76. [in Ukrainian] / Матійців Н.П., Могиляк І.І., Труш О.І., Черник Я.І. Рухова активність нейродегенеративних мутантів *Drosophila melanogaster*. *Вісник Одеського університету. Серія біологічна.* 2013. Т. 18. С. 70–76.
8. Dutta S., Rieche F., Eckl N., Duch C., Kretzschmar D. Glial expression of Swiss cheese (SWS), the *Drosophila* orthologue of neuropathy target esterase (NTE), is required for neuronal ensheathment and function. *Dis. Model Mech.* 2016. Vol. 9. P. 283–94. doi: 10.1242/dmm.022236.
9. Mühlhlig-Versen M., da Cruz A.B., Tschäpe J. et al. Loss of Swiss cheese/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult *Drosophila*. *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25. P. 2865–2873.
10. da Cruz B., Wentzell J., Kretzschmar D. Swiss Cheese, a protein involved in progressive neurodegeneration, acts as a non-canonical regulatory subunit for PKA-C3. *J. Neuroscience.* 2008. Vol. 28. P. 10885–10892.
11. Read D., Li Y., Chao M., Cavanagh J., Glynn P. Neuropathy Target Esterase Is Required for Adult Vertebrate Axon Maintenance. *J. Neuroscience.* 2009. Vol. 29, № 37. P. 11594–11600. doi: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3007-09.2009>.
12. Sunderhaus E.R., Law A.D., Kretzschmar D. ER responses play a key role in Swiss-Cheese/Neuropathy Target Esterase-associated neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2019. Vol. 130. P. 104520. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104520.
13. Lush M.J., Li Y., Read D.J., Willis A.C., Glynn P. Neuropathy target esterase and a homologous *Drosophila* neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man. *J. Biochem.* 1998. Vol. 332. P. 1–4.
14. Glynn P. Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation. *Biochim Biophys Acta.* 2005. Vol. 1736. P. 87–93.
15. Synofzik M., Gonzalez M. A., Lourenco C. M., Coutelier M. et al. PNPLA6 mutations cause Boucher-Neuhauser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum. *J. of Neurology Brain.* 2014. Vol. 137. P. 69–77. doi: 10.1093/brain/awt326.
16. Rainier S., Bui M., Mark E., Thomas D., Tokarz D. et al. Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neurodegeneration. *Am J Hum Genet.* 2008. Vol. 82. P. 780–785. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.12.018.

MATIYTSIV N.P.

Ivan Franko National University of Lviv,

Ukraine, 79005, Lviv, Hrushevskiyi str., 4, e-mail: nataliya.matiytsiv@lnu.edu.ua

SWS/NTE-DEPENDENT NEUROPATHY IS THE MODEL SYSTEM TO STUDY NEURODEGENERATION

Today there is many described neurodegenerative *D. melanogaster* mutants, which characterized by development of degenerative changes in brain. One of them are a *swiss cheese* (*sws*) gene mutants. Mutations in this gene causes apoptosis of neurons and hyperwrapping of their somas by the glial cells, reducing of life expectancy and decrease of locomotion. The *sws* gene is the ortholog of mammal's neuropathy target esterase (*NTE* / *PNPLA6*). *NTE* is a neuronal, transmembrane protein, that possesses serinesterase activity, and can be the target for neurotoxic organophosphorus compounds activity. Mutations in *PNPLA6* gene cause number hereditary neurodegenerative disorders, which nowadays are incurable. The search for therapeutic agents require use of model objects because researches on humans have both methodical and ethical limitations. During two last decades *D. melanogaster* has proven itself as a good model for study of neurodegenerative diseases. In this review, we described general characteristics of *D. melanogaster* gene *sws*, consequences of its mutations and provided evidences of high conservatism of gene product.

Keywords: gene *swiss cheese*, neuropathy target esterase, neurodegeneration, brain, life span.