

ДРОНСЬКА Х.А.[✉], ЯВДИК Х.М., СТАСИК О.Г., МАТІЙЦІВ Н.П.

Львівській національній університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: kristinadronska@gmail.com, matiysiv@yahoo.com

[✉] kristinadronska@gmail.com, (063) 450-89-17

МОДЕЛЮВАННЯ ХВОРОБИ ПАРКІНСОНА НА *D. MELANOGASTER*: ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС ТА РОЛЬ ІЗОГЕНІЗАЦІЇ ТРАНСГЕННИХ ЛІНІЙ

Мета. Оксидативний стрес (ОС) вважається одним із основних факторів, який призводить до дегенерації дофамінових нейронів під час хвороби Паркінсона (ХП). Метою роботи було перевірити чутливість до умов ОС особин *D. melanogaster* з експресією альфа-синуклеїна людини в нейронах *UAS-SNCA/elavGal4* та встановити роль ізогенізації ліній, одержаних зі стокових колекцій, у ході дослідження цього фенотипу.

Методи. Для ізогенізації лінії ми провели п'ять поколінь послідовних схрещувань особин зі вставкою гена альфа-синуклеїна людини на лінію *w¹¹¹⁸*. Для перевірки чутливості до умов ОС було проведено 4-денний тест із використанням прооксиданта H_2O_2 . **Результати.** Особини з експресією гена альфа-синуклеїна у нейронах характеризувалися статистично достовірною чутливістю до умов ОС, порівняно з контролем. Також виявили достовірну відмінність у ступені чутливості до ОС на другу добу експерименту в особин до та після ізогенізації ефекторної лінії. **Висновки.** Підвищена чутливість до ОС виявлена як специфічний фенотип за умов експресії альфа-синуклеїна людини у нейронах дрозофіли. Встановлено важливість ізогенізації трансгенних ліній для характеристики фенотипу стресостійкості.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, альфа-синуклеїн, оксидативний стрес, ізогенізація.

Нейродегенеративні захворювання включають велику групу неврологічних захворювань. Симптоми зазвичай проявляються з віком і пов'язані з відмиранням нейронів і гліальних клітин у центральній нервовій системі [1]. За даними ВООЗ, у світі нараховується близько 35 мільйонів людей, хворих на нейродегенеративні захворювання, серед яких 7–10 мільйонів – пацієнти з хворобою Паркінсона [2]. Хвороба Паркінсона є другим найбільш поширеним нейродегенеративним захворюванням, за якого взаємодія генетичних факторів і факторів навколи-

шнього середовища призводить до спорадичних та сімейних форм ХП. Хвороба Паркінсона зумовлює моторну і немоторну симптоматику [3, 4], проте видимі ознаки проявляються занадто пізно – перші клінічні симптоми з'являються уже на стадії дегенерації 60–80 % дофамінергічних нейронів, яка є прихованою та триває протягом 20–30 років [5]. Альфа-синуклеїн вважається одним із ключових токсичних факторів в етіології хвороби Паркінсона. Альфа-синуклеїн є важливим фактором сімейних та спорадичних форм ХП [6]. Білок альфа-синуклеїн експресується в мозку і є основним компонентом тілець Леві і невритів Леві у дофамінових нейронах у людей із хворобою Паркінсона [3]. Хоча на сьогодні функція альфа-синуклеїну є не зовсім зрозумілою, вважається, що цей білок відіграє важливу роль у процесі доставки та вивільнення дофаміну у пресинаптичну щілину [7]. Вивчення його ролі у патогенезі хвороби Паркінсона із застосуванням тваринних модельних об'єктів зможе розширити межу розуміння патогенезу, а також відкрити нові можливості для терапії та запобігання хвороби Паркінсона.

Перша ХП модель *D. melanogaster* була створена завдяки спрямованій експресії гена альфа-синуклеїна людини у мозку дрозофіли. Ця модель характеризується ХП-подібною симптоматикою, а також виникненням поодиноких включень, що нагадують тільця Леві [8]. В останні десятиріччя модель ХП на *D. melanogaster* допомогла поглибити знання патогенезу цієї хвороби завдяки потужним генетичним інструментам та ресурсам, доступним на мухах. Незважаючи на те, що геном дрозофіли кодує ортологи всіх генів людини, пов'язаних з ХП, крім гена альфа-синуклеїну, трансгенні мухи, які надекспресують альфа-синуклеїн, також характеризуються втратою дофамінових нейронів з віком і руховими порушеннями, що є двома патологічними симптомами ХП [9].

Оксидативний стрес вважається одним із

© ДРОНСЬКА Х.А., ЯВДИК Х.М., СТАСИК О.Г., МАТІЙЦІВ Н.П.

основних факторів, який призводить до дегенерації дофамінових нейронів за ХП. Оксидативний стрес може викликати неправильний фолдинг та агрегацію альфа-синуклеїну у людей з ХП [10]. Тому нашою метою було перевірити чутливість до умов оксидативного стресу в особин *D. melanogaster* з експресією альфа-синуклеїну людини у нейронах до та після ізогенізації ефекторної лінії *UAS-SNCA.J* на контрольну лінію w^{1118} .

Матеріали і методи

У роботі використані лінії, одержані з Bloomington Drosophila Stock Center (США): w^{1118} ; *P{UAS-SNCA.J}/TM3,Sb¹* (№ 51376), які містять вставку гена альфа-синуклеїну людини, експресію якого створювали в нейронах за допомогою драйвера *P{GawB}elav^{C155}* (№458). Культури утримували на стандартному середовищі за температури 25 °С.

Ізогенізацію ефекторної лінії $w^{1118}; P\{UAS-SNCA.J\}/TM3,Sb^1$ на лабораторну лінію w^{1118} проводили шляхом послідовних п'яти поколінь схрещувань самок w^{1118} із самцями, що містять вставку *P{UAS-SNCA.J}*. Після проведення циклу схрещувань ізогенізації ми схрестили самок, що мали вставку *P{UAS-SNCA.J}*, із самцями, які містили балансерну хромосому *TM3,Sb¹* і також пройшли ізогенізацію на лінію w^{1118} .

Тест на стійкість до умов ОС проводили за методикою Ландера [11] з деякими модифікаціями [12]. Для дослідів відбирали по 100 самців чотирьохденного денного віку відповідного генотипу, які утримувалися на стандартному поживному середовищі. Перед закладенням дослідів самців поміщали у порожні пробірки на 3 години для голодування. Потім групами по 10 мухи поміщались у пробірки із шаром агарози та фільтрувальним папером, змоченим прооксидантом або контрольним розчином. Як проксидант ми використали 5 % перексид водню, як контрольний – 10 % розчин сахарози. Живі мухи фіксувалися на 24-ту, 48-му, 72-гу та 96-ту години. Тест на стійкість до умов оксидативного стресу проводився до та після ізогенізації.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення «Excel». Достовірність отриманих результатів перевіряли за допомогою критеріїв Пірсона або Стьюдента. Позначали (***) – достовірну різницю при рівні значущості $p \leq 0,001$; (**) – $p \leq 0,01$; (*) – $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Трансгенні лінії дрозофіли конструюються на основі лінії w^{1118} , яка повинна бути використана як основа контрольного генотипу у всіх дослідженнях. Однак тривале утримання в різних колекціях за різних умов може спричинити накопичення спонтанних мутацій, які можуть створювати різний фенотиповий фон у дослідної та контрольної ліній. Особливо важливим цей фактор є під час дослідження таких фізіологічних показників, як виживання або стійкість до стресових умов. Ми провели ізогенізацію трансгенної ефекторної лінії *P{UAS-SNCA.J}* на контрольну лінію w^{1118} і порівняння показників життєздатності та чутливості до ОС особин до та після ізогенізації.

Як контроль ми використовували мух, отриманих у результаті схрещування особин лінії w^{1118} з особинами драйверної лінії ($w^{1118}/elavGal4$), оскільки внесок драйверної лінії може зумовлювати неспецифічний фенотип, який необхідно врахувати. На контрольному розчині 10 % сахарози ми не виявили відмінностей у виживанні особин дрозофіли всіх досліджуваних генотипів (рис. 1). Отже, за стандартних умов у молодих особин експресія альфа-синуклеїну людини не має впливу на виживання самців дрозофіли.

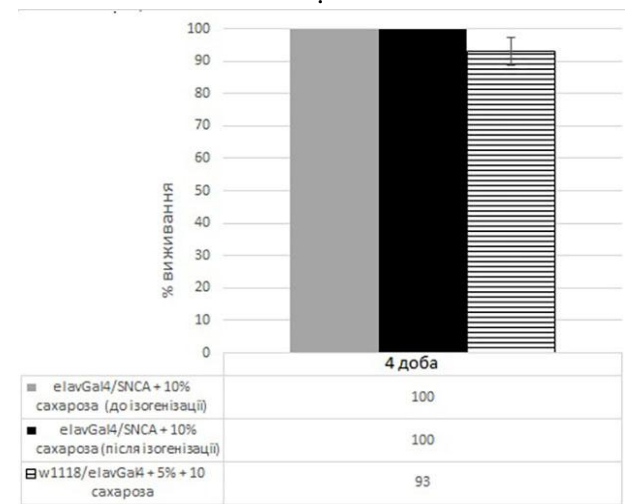


Рис. 1. Виживання особин *D. melanogaster* на 10 % сахарозі.

Центральним механізмом прогресування ХП вважається ОС, хоча його зв'язок із токсичністю альфа-синуклеїну залишається відкритим. Саме підвищена чутливість до ОС особин із альфа-синуклеїном людини може бути тестерним фенотипом для підтвердження функціону-

вання гетерологічного білка в нейронах дрозофіли. У нашій роботі ми індукували ОС 5 % розчином пероксиду водню. Контрольні особини $w^{1118}/elavGal4$ не проявляли чутливості до дії прооксиданта (рис. 2). В особин з експресією гена альфа-синуклеїну в нейронах $UAS-SNCA/elavGal4$ за дії прооксиданта відсоток виживання статистично достовірно знижувався вже з першого дня (рис. 2). Підвищена чутливість була виявлена в особин, одержаних до та після ізогенізації ефекторної лінії.

Порівнюючи виживання дослідних особин $UAS-SNCA/elavGal4$ до та після ізогенізації,

ми виявили достовірну відмінність цього показника на 48 годину дії прооксиданта. Так, виживання особин до ізогенізації становило 38,3 % (± 12 %), а після – 81,5 % ($\pm 7,4$ %), $P \leq 0,03$ (рис. 2). Таким чином, ми з'ясували важливість застосування ізогенізації за роботи з трансгенними лініями, зокрема, під час оцінки фенотипу виживання за дії оксидативного стресу. Очевидно, що значуща відмінність у стійкості до ОС особин із альфа-синуклеїном в нейронах зумовлена різними невідомими мутаціями та поліморфізмами, що накопичилися за час утримання ліній у музях.

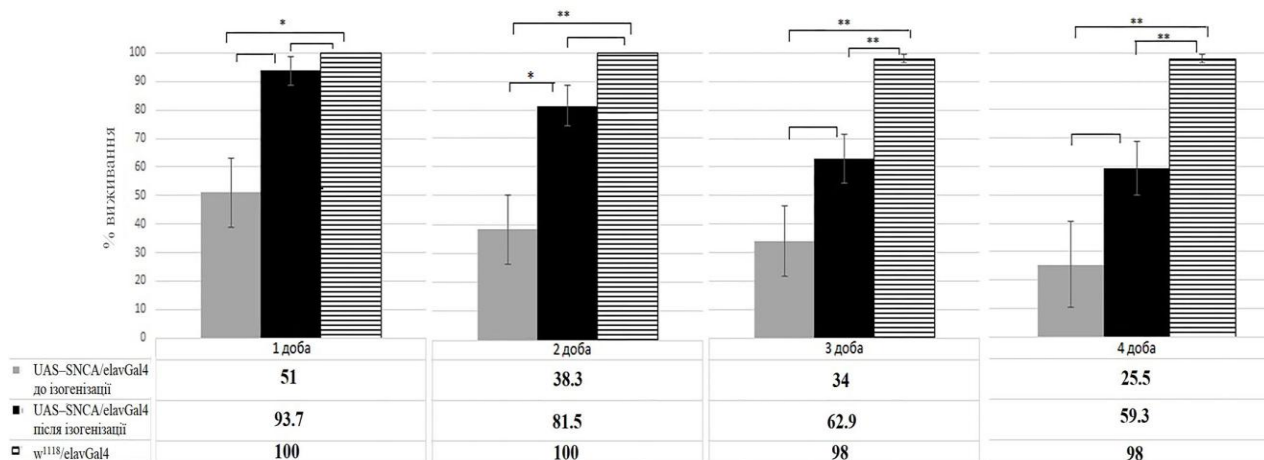


Рис. 2. Виживання особин *D. melanogaster* за умов оксидативного стресу. Розраховували виживання дослідних особин у %; ** – різниця за рівня значущості $P \leq 0,01$; * – $P \leq 0,05$, розрахована на основі критерію Стьюдента.

Отримані результати показали, що трансгенні мухи з експресією альфа-синуклеїну людини характеризувалися статистично достовірною підвищеною чутливістю до прооксиданту як до, так і після проведення ізогенізації лінії. Результати нашого дослідження підтверджують концепцію, що вільні радикали можуть підвищувати токсичність альфа-синуклеїну [13]. Отже, прооксидант-експонована модель ХП на дрозофілі, яка включає й експресію альфа-синуклеїну, і вплив вільних радикалів, є хорошою моделлю для вивчення можливої взаємодії патогенних шляхів у прогресуванні ХП. Крім того, така модель патології може бути використана для пошуку терапевтичних засобів як загальної, так і специфічної дії.

Висновки

Ми виявили відмінність у чутливості до умов оксидативного стресу між особинами $UAS-SNCA/elavGal4$ до та після ізогенізації на 2 добу експерименту. Отже, ізогенізація на контрольну лінію є важливим етапом у роботі з трансгенними лініями у випадку дослідження фенотипу стресостійкості. Особини *D. melanogaster* з експресією альфа-синуклеїна у нейронах характеризувалися чутливістю до умов оксидативного стресу. Підвищена чутливість до прооксидантів може використовуватися як маркерний фенотип у подальших дослідженнях із експресією альфа-синуклеїна людини в нейронах дрозофіли.

Робота виконана в рамках теми за рахунок коштів Державного бюджету України, № державної реєстрації 0117U001226.

Література

1. Thomas B., Beal M.F. Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2007. Vol. 16. p. 183–194. doi: 10.1093/hmg/ddm159.
2. Parkinson's News Today. Parkinson's Disease Statistics. URL: <https://parkinsonsnewstoday.com/parkinsons-disease-statistics/> (дата звернення: 28.02.2018).
3. Chaudhuri K.R., Yates L., Martinez-Martin P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2005. Vol. 5. P. 275–283.
4. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008. Vol. 79 (4). P. 368–376. doi: 10.1136/jnnp.2007.131045.
5. Pan T., Kondo S., Le W., Jankovic J. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain.* 2009. Vol. 131. P. 1969–1978. doi: 10.1093/brain/awm318.
6. Ibanez P. et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet.* 2004. Vol. 364. p. 1169–1171. doi: 10.1016/s0140-6736(04)17104-3.
7. Venda L.L., Cragg S.J., Buchman V.L., Wade-Martins R. ̢-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2010. Vol. 33 (12). P. 559–568. doi: 10.1016/j.tins.2010.09.004.
8. Feany M.B., Bender W.W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature.* 2000. Vol. 404. P. 394–398. doi: 10.1038/35006074
9. Botella J.A., Bayersdorfer F., Gmeiner F., Schneuwly S. Modelling Parkinson's Disease in *Drosophila*. *Neuromol Med.* 2009. Vol. 12. p. 268–280. doi: 10.1007/s12017-009-8098-6.
10. Malkus K.A., Tsika E., Ischiropoulos H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. *Mol. Neurodegener.* 2009. Vol. 4. P. 4–24. doi: 10.1186/1750-1326-4-24.
11. Sharma S.K., Babitch J.A. Application of Bradford's protein assay to chick brain subcellular Fractions. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1980. Vol. 2 (4). P. 247–250.
12. Могіляк І.І., Матійців Н.П., Грунік Н.І., Черник Я.І. Чутливість нейродегенеративних мутантів *Drosophila melanogaster* групи *Swiss cheese* до умов оксидативного стресу. *Біополімери і клітина.* 2011. Т. 27, № 6. С. 453–458.
13. Jahromi S.R., Haddadi M., Shivanandappa T., Ramesh S.R. Attenuation of neuromotor deficits by natural antioxidants of *Decalepis hamiltonii* in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2015. Vol. 7 (293). P. 136–150. doi: 10.1016/j.neuroscience.

References

1. Thomas B., Beal M.F. Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2007. Vol. 16. p.183–194. doi: 10.1093/hmg/ddm159.
2. Parkinson's News Today. Parkinson's Disease Statistics. URL: <https://parkinsonsnewstoday.com/parkinsons-disease-statistics/> (дата звернення: 28.02.2018).
3. Chaudhuri K.R., Yates L., Martinez-Martin P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2005. Vol. 5. P. 275–283.
4. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008. Vol. 79 (4). P. 368–376. doi: 10.1136/jnnp.2007.131045.
5. Pan T., Kondo S., Le W., Jankovic J. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain.* 2009. Vol. 131. P. 1969–1978. doi: 10.1093/brain/awm318.
6. Ibanez P. et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet.* 2004. Vol. 364. p. 1169–1171. doi: 10.1016/s0140-6736(04)17104-3.
7. Venda L.L., Cragg S.J., Buchman V.L., Wade-Martins R. ̢-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2010. Vol. 33 (12). P. 559–568. doi: 10.1016/j.tins.2010.09.004.
8. Feany M.B., Bender W.W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature.* 2000. Vol. 404. P. 394–398. doi: 10.1038/35006074
9. Botella J.A., Bayersdorfer F., Gmeiner F., Schneuwly S. Modelling Parkinson's Disease in *Drosophila*. *Neuromol Med.* 2009. Vol. 12. p. 268–280. doi: 10.1007/s12017-009-8098-6.
10. Malkus K.A., Tsika E., Ischiropoulos H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. *Mol. Neurodegener.* 2009. Vol. 4. P. 4–24. doi: 10.1186/1750-1326-4-24.
11. Sharma S.K., Babitch J.A. Application of Bradford's protein assay to chick brain subcellular Fractions. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1980. Vol. 2 (4). P. 247–250.
12. Mohylyak I.I., Matiutiv N.P., Hrunyk N.I., Chernyk Ya.I. Sensitivity of neurodegenerative mutants of *Drosophila melanogaster* from Swiss cheese group to the oxidative stress conditions. URL: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000117> (Last accessed: 28.02.2018).
13. Jahromi S.R., Haddadi M., Shivanandappa T., Ramesh S.R. Attenuation of neuromotor deficits by natural antioxidants of *Decalepis hamiltonii* in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2015. Vol. 7 (293). P. 136–150. doi: 10.1016/j.neuroscience.

DRONSKA K.A., YAVDYK K.M., STASYK O.H., MATIYTSIV N.P.

Ivan Franko National University of Lviv,

Ukraine, 79005, Lviv, Hrushevskiyi str., 4, e-mail: kristinadronska@gmail.com, matiytsiv@yahoo.com

MODELING OF PARKINSON'S DISEASE ON *D. MELANOGASTER*: OXIDATIVE STRESS AND THE ROLE OF ISOGENIZATION OF TRANSGENIC LINES

Aim. Oxidative stress (OS) is considered one of the main factors that leads to the degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease (PD). The purpose of the work was to test sensitivity to the conditions of the OS of *D. melanogaster* individuals with expression of human alpha-synuclein in neurons *UAS-SNCA/elavGal4*; and establish the role of the isogenization of the lines derived from stock collections in the study of this phenotype. **Methods.** For the isogenization of the line, we conducted five generations of sequential crossings of individuals with insertion of human alpha synuclein gene into the *w¹¹¹⁸* line. A 4-day test using H₂O₂ as prooxidant was used to test the sensitivity to OS conditions. **Results.** Individuals with expression of alpha-synuclein gene in neurons were characterized by statistically significant sensitivity to OS conditions, compared with controls. Also, there was a significant difference in the degree of sensitivity to the OS in the second day of the experiment in individuals before and after the isogenization of the effector line. **Conclusions.** Hypersensitivity to the OS is detected as a specific phenotype under conditions of expression of human alpha-synuclein in *Drosophila* neurons. The importance of the isogenization of transgenic lines for the characterization of the stress susceptibility phenotype is established.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, alpha-synuclein, oxidative stress, isogenization.