УДК 575.167:575.23:577.24

[1]О. ШАМРО, [2]Л. БОДНАР, [2]С. ГОРБУЛІНСЬКА, [1]М. КРИЖАНОВСЬКА, [2]О. ЩЕРБАКОВА

[1]Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
вул.М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027
[2]Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського 4, Львів, 79005

ЗАЛЕЖНІСТЬ ТРИВАЛОСТІ ЖИТТЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ВІД НАДЕКСПРЕСІЇ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНОГО НОКАУТУ ГЕНА *dNOS* У НЕЙРОНАХ

У результаті проведених досліджень побудовано криві виживання особин з додатковою копією гена *dNos* та його функціональним нокаутом. Найнижчі показники середньої і максимальної тривалості життя виявлено в особин з функціональним нокаутом гена *dNos*, що підтверджує важливу роль NO у процесах життєдіяльності і старіння дрозофіли. Зафіксовано достовірне зниження тривалості життя також в особин з надекспресією гена *dNos*.

Ключові слова: Drosophila melanogaster, синтаза оксиду азоту, тривалість життя, UAS-GAL4 трансгенна система

Оксид азоту (NO) є ключовим регулятором різноманітних біологічних процесів, серед яких проліферація клітин [11], формування синапсів [8], імунна відповідь [2], поведінкові реакції [5], формування пам'яті [3]. В організмі тварин він продукується ферментом синтазою оксиду азоту (NOS). Аналіз функції NOS у ссавців ускладнюється наявністю 3 генів NOS і великою кількістю продуктів альтернативного сплайсингу. Миші з делетованим одним геном NOS є життєздатними, з двома делетованими генами – мають знижену життєздатність, а тварин з трьома делетованими генами досі не вдалося отримати [8]. Дрозофіла слугує зручним об'єктом для досліджень функції NO і NOS у організмі, оскільки в геномі дрозофіли виявлено лише один ген (*dNos*).

Довгий час відбувалася наукова дискусія про роль NO в процесах розвитку і життєдіяльності дрозофіли. В 1995 р. Регульскі і Тулі [6] дослідили будову гена *dNOS,* а пізніше припустили, що NO та NOS беруть участь в процесах метаморфозу [9]. Вони описали мутацію в консервативній ділянці гену, яка повністю інактивувала фермент NOS, і повідомили, що вона спричиняє летальність. У 2010 р. Якубович та ін. висловили думку, що NOS не є життєво важливою для розвитку дрозофіли [10]. Вони, в свою чергу, стверджували, що ця летальність могла бути пов'язаною з додатковою мутацією у іншому гені, а не ушкодженням самого гену *dNos*. Регульскі та ін. змогли довести летальність тільки для одного з 17 алелів [7]. У 2011 р. Касерес та ін. показали, що делеція *dNos* в основній ендокринній тканині личинок, проторакальній залозі, ушкоджує процес продукції екдизону, що є попередником гормону линьки [1]. Вони вважали, що NOS залучена до контролю метаморфозу комах. Мухи з функціональним нокаутом гена *dNos* у проторакальній залозі їли гірше, росли повільніше і частина з них гинула на стадії лялечки. Зважаючи на велику кількість важливих функцій, які виконує NO, цілком логічно було б очікувати, що делеція гена *dNOS* в дрозофіли буде летальною в процесі розвитку. Проте роль NO у життєдіяльності дрозофіли досі залишається неоднозначною.

Матеріал і методи досліджень

У роботі використовували трансгенні лінії *UAS-dNos* (характеризується наявністю додаткової копії гену *dNos*) та *UAS-RNAi-dNos* (експресується інтерферуюча РНК до *dNos* транскрипту), отримані з Bloomington Drosophila Stock Center. Для активації трансгенних конструктів особин цих ліній схрещували з особинами лінії *elav-Gal4*. Відповідно активація конструктів відбувалася в нащадків F1 саме у нейрональних клітинах. Лінія дикого типу *Oregon* слугувала контролем у схрещуваннях. Також перевіряли тривалість життя особин трансгенних ліній без

активації конструктів (♀ *UAS-dNos* х ♂ *UAS-dNos*; ♀ *UAS-RNAi-dNos* х ♂ *UAS-RNAi-dNos*; ♀ *elav-GAL4* х ♂ *elav-GAL4*).

Для визначення тривалості життя використовували 1-денних самців, нащадків схрещувань досліджуваних ліній. Їх утримували за температури 24-25°С і кожні 2 дні пересипали на свіже середовище без дріжджів, фіксуючи кількість живих і загиблих особин. У досліді використано не менше 100 особин для кожного схрещування, для статистичної достовірності дослід повторено тричі.

Результати досліджень та їх обговорення

За результатами досліджень тривалості життя нащадків F1 будували криві виживання та визначали середню тривалість життя (СТЖ) і максимальну тривалість життя (МТЖ). Показники СТЖ визначали за наступними параметрами: S_{75} – термін (у добах), на котрий залишається живими 75% мух; S_{50} – термін, на котрий залишається живими 50% мух; S_{25} – термін, на котрий залишається живими 25% мух.

Тривалість життя особин контрольної лінії *Oregon* характеризувалася поступовою загибеллю мух, що проявлялася у вигляді плато на їх кривій виживання (рис.1). Подібне плато також спостерігали в нащадків контрольних схрещувань, але не в F1 схрещувань ♀ *elav-GAL4* х ♂ *UAS-dNos* чи ♀ *elav-GAL4* х ♂ *UAS-RNAi-dNos*. Мухи з надекспресією гена *dNos* (♀ *elav-GAL4* х ♂ *UAS-dNos*) або його функціональним нокаутом (♀ *elav-GAL4* х ♂ *UAS-RNAi-dNos*) гинули, починаючи з 5-го дня життя імаго і характеризувалися достовірно нижчими показниками СТЖ і МТЖ (табл. 1).

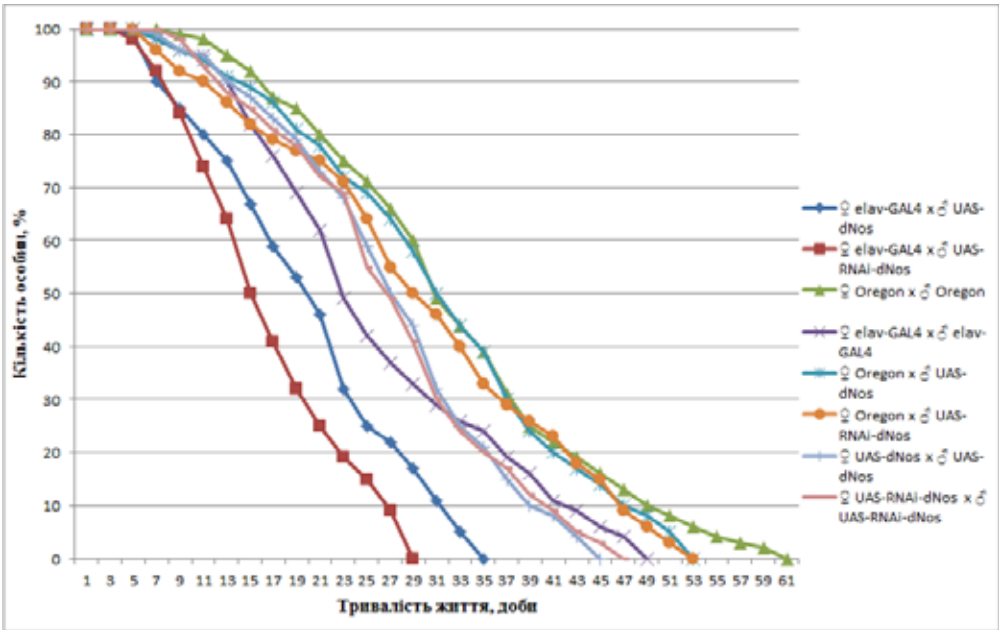

Рис.1. Тривалість життя нащадків схрещувань досліджуваних ліній

Найвищі рівні СТЖ і МТЖ були зафіксовані для контрольної лінії *Oregon*, найнижчі – для нащадків ♀ *elav-GAL4* х ♂ *UAS-RNAi-dNos* і ♀ *elav-GAL4* х ♂ *UAS-dNos*. У особин з функціональним нокаутом гена *dNos* СТЖ і МТЖ була знижена вдвічі, порівняно з контролем. Значне зниження тривалості життя у цих мух ще раз підтверджує важливу роль NO у процесах життєдіяльності дрозофіли.

Таблиця 1

Показники середньої і максимальної тривалості життя серед нащадків схрещувань досліджуваних ліній

Нащадки від схрещувань	СТЖ, доби			МТЖ, доби; M ± m
	S_{75} , M ± m	S_{50}, M ± m	S_{25} , M ± m	
♀ *elav-GAL4* x ♂ *UAS-dNos*	13,2 ± 1,8	20,1 ± 1,2	25,4 ± 1,7	34,1 ± 1,1
♀ *elav-GAL4* x ♂ *UAS-RNAi-dNos*	10,7 ± 2,1	15,3 ± 1,3	21,4 ± 1,1	28,5 ± 1,5
♀ *Oregon* x ♂ *Oregon*	23,1 ± 1,6	30,7 ± 2,1	39,5 ± 2,8	59,2 ± 1,2
♀ *UAS-dNos* x ♂ *UAS-dNos*	20,3 ± 2,2	27,2 ± 1,5	33,4 ± 1,2	43,3 ± 2
♀ *UAS-RNAi-dNos* x ♂ *UAS-RNAi-dNos*	20,1 ± 1,8	26,3 ± 1,7	32,5 ±2,1	46,8 ± 1,9
♀ *elav-GAL4* x ♂ *elav-GAL4*	16,2 ± 2,3	22,1 ± 1,3	34,2 ± 1,7	47,4 ± 1,7
♀ *Oregon* x ♂ *UAS-dNos*	22,3 ± 1,9	31,4 ± 1,6	38,5 ± 2	51,3 ± 1,2
♀ *Oregon* x ♂ *UAS-RNAi-dNos*	21,4 ± 1,5	29,2 ± 2,1	40,5 ± 1,5	51,2 ± 1,8

Негативний вплив NO може опосередковуватися його участю в процесах ексайтотоксичності та нітрозилюванні білків [4]. Процеси ексайтотоксичності пов'язані з надмірною стимуляцією іонних каналів і зростанням концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+}, що веде до подальшої загибелі клітин. Нітрозилювання білків спостерігається в нейронах пацієнтів з хворобою Паркінсона. Ще одним шляхом негативної дії NO в дрозофіли є розвиток нейродегенерації внаслідок активації гена *dFoxo,* продукт якого є важливим транскрипційним фактором. Кожен з цих механізмів може бути причиною зниженої тривалості життя мух з додатковою копією гена *dNos*, активованою в нейронах.

Висновки

Отже, залежно від ситуації, NO може проявляти нейротоксичну або нейропротекторну дію. В наших дослідженнях, і збільшення дози гена *dNOS*, і його функціональний нокаут у нейронах мали негативний ефект на тривалість життя мух. Проте відсутність активності NOS за функціонального нокауту гена проявлялася у нижчій тривалості життя мух, аніж наявність додаткової копії гена.

1. *Caceres L.* Nitric oxide coordinates metabolism, growth and development via the nuclear receptor E75 / L. Caceres, A.S. Nesakov, C. Schwartz // Genes and Dev. — 2011. — Vol. 25. — P. 1476—1485.
2. *Foley E.* Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in Drosophila / E. Foley, P.H. O'Farrell // Genes and Dev. — 2002. — Vol. 17. — P. 115—125.
3. *Gage S.L.* The role of nitric oxide in memory is modulated by diurnal time / S.L. Gage, A. Nighorn // Front. in Sys. Neuscience. — 2014. — Vol. 8. — P. 1—8.
4. *Ischiropoulos H.* Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect or association? / H. Ischiropoulos, J.S. Beckman // Journal of Clinical Investigation. — 2003. — Vol. 111. — P. 163—169.
5. *Rabinovich D.* Nitric oxide as a switching mechanism between axon degeneration and regrowth during developmental remodeling / D. Rabinovich, S.P. Yaniv, I. Alyagor // Cell. — 2016. — Vol. 164. — P. 170—182.
6. *Regulski M.* Molecular and biochemical characterization of dNOS: a Drosophila Ca^{2+}/calmodulin — dependent nitric oxide synthase / M. Regulski, T. Tully // The Proc. of the Nat. Acad. of Sciences of the USA. — 1995. — Vol. 92. — P. 9072—9076.
7. *Regulski M.* Essential function of nitric oxide synthase in Drosophila / M. Regulski, Y. Stasiv, T. Tully, G. Enikolopov // Curr. Biol. — 2004. — Vol.14(20). — P. 881—882.
8. *Robinson S.W.* Endogenous nitric oxide synthase activity regulates synaptic transmitter release / S.W. Robinson, M.G. Olmo, M. Martin, T.M. Smith // Opera Med Physiol. — 2017. — Vol. 3(2). — P. 31—38.
9. *Stasiv Y.* The *Drosophila* nitric-oxide synthase gene (*dNOS*) encodes a family of proteins that can modulate NOS activity by acting as dominant negative regulators / Y. Stasiv, M. Regulski, T. Tully, G. Enikolopov // J. of Biol.Chem. — 2001. — Vol. 276 (45). — P. 42241—42251.
10. *Yakubovich N.* Nitric oxide synthase is not essential for Drosophila development / N. Yakubovich, E.A. Silva, P. O'Farrell // Curr. Biol. — 2010. — Vol. 20(4). — P. 141—143.
11. *Yamanaka N.* Nitric oxide directly regulates gene expression during Drosophila development: need some gas to drive into metamorphosis? / N. Yamanaka, M.B. O'Connor // Genes and Dev. — 2011. — Vol. 25. — P. 1459—1463.

О. Шамро, Л. Боднар, С. Горбулинская, М. Крыжановская, О. Щербакова
Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка
Львовский национальный университет имени І. Франка

ЗАВИСИМОСТЬ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ОТ НАДЭКСПРЕСИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НОКАУТА ГЕНА *dNOS* В НЕЙРОНАХ

В результате проведенных исследований построены кривые выживания особей с дополнительной копией гена *dNos* и его функциональным нокаутом. Самые низкие показатели средней и максимальной продолжительности жизни выявлены у особей с функциональным нокаутом гена *dNos*, что подтверждает важную роль NO в процессах жизнедеятельности и старения дрозофилы. Зафиксировано достоверное снижение продолжительности жизни также у особей с надэкспрессией гена *dNos*.

Ключевые слова: Drosophila melanogaster, синтаза оксида азота, продолжительность жизни, UAS-GAL4 трансгенная система

O. Shamro, L. Bodnar, S Gorbulinska, M. Kryzhanovska, O. Shcherbakova
Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University, Ukraine
Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine

DEPENDENCE OF DROSOPHILA MELANOGASTER LIFESPAN ON OVEREXPRESSION AND FUNCTIONAL KNOCK-OUT OF THE *dNOS* GENE IN NEURONS

In this work we used transgenic lines *UAS-dNos* (characterized by the presence of an additional copy of the *dNos* gene) and *UAS-RNAi-dNos* (expressed interfering RNA to *dNos* transcript) derived from the Bloomington Drosophila Stock Center. Individuals of these lines were crossed with individuals of the *elav-Gal4* line. Accordingly, the activation of constructs took place in the first progeny precisely in neuronal cells. The wild-type *Oregon* line was used as control in crosses. Also, the lifespan of individuals of transgenic lines without activating constructs was checked (♀ *UAS-dNos x* ♂ *UAS-dNos;* ♀ *UAS-RNAi-dNos x* ♂ *UAS-RNAi-dNos;* ♀ *elav-GAL4 x* ♂ *eliv-GAL4*). According to the lifespan of flies from the first generation, survival curves were constructed and the rates of average and maximum lifespan were determined. Progeny with overexpression of the *dNos* gene (♀ *elav-GAL4 x* ♂ *UAS-dNos*) or its functional knockout *(*♀ *elav-GAL4 x* ♂ *UAS-RNAi-dNos*) died from the 5th day of imago's life and were characterized by significantly lower rates of average and maximum lifespan. The highest rates of lifespan were determined for the *Oregon* control line. In flies with functional knockout of the *dNos* gene the average and maximum lifespan were reduced by 50%. The decreased lifespan of progeny with functional knockout of the *dNos* gene confirms the important role of NO in drosophila physiology and aging. A significant decrease in lifespan was also recorded in individuals with additional copy of the *dNos* gene. The negative effect of NO can be mediated by its participation in the processes of excitotoxicity and nitrosylation of proteins. Excitotoxicity is associated with excessive stimulation of the ion channels and an increase of intracellular calcium concentration, which leads to further death of cells. Nitrosylation of proteins is observed in the neurons of patients with Parkinson's disease and it is thought to have a deleterious effect on brain cells. Another negative action of NO in the *Drosophila* is the development of neurodegeneration through the activation of the *dFoxo* gene, the product of which is an important transcription factor. Each of these mechanisms can be the reason of reduced lifespan of flies with *dNos* overexpression, but to determine the real causes additional research is necessary.

Key words: Drosophila melanogaster, nitric oxide synthase, lifespan, UAS-GAL4 transgenic system

Рекомендує до друку
В. В. Грубінко

Надійшла 12.03.2018