

Генетичен скрининг за модификатори на гена *dfmr1* (*fragile x mental retardation 1*) в *Drosophila melanogaster*

Димитрина Георгиева, Анета Михайлова, Гинка Генова

Genetic screening for gene *dfmr1* modifiers (*fragile X mental retardation 1*) in *Drosophila melanogaster*: *Fragile X syndrome (FraX)*, caused by the loss-of-function of the gene *fmr1*, is the most common heritable cause of mental retardation in human. To develop any *FraX* intervention strategies, it is essential to find out other unknown proteins interacting with *FMRP* and to identify the mechanism of *FMRP* pathway. In this study we obtained EMS-induced mutations in genes, involved in *dFMRP* function. We used the *Drosophila* UAS/GAL4 system for targeted gene expression and performed a genetic screen for modifiers enhancing or suppressing the "rough eye" phenotype and the abnormal wing. In our ongoing experiments we obtained 195 mutations in modifiers of this gene. By means of genetic methods we determined the chromosome localization of these mutations. 11 of them are X-chromosome modifiers with recessive lethal phenotypes.

Key words: *Drosophila*; genetic screen; *fragile X syndrome*; X-chromosome modifiers of *dfmr1*.

ВЪВЕДЕНИЕ

Синдромът на чупливата X хромозома (*fragile X syndrome*) е най-разпространената форма на наследствена и умствена изостаналост при човека. Заболяването се дължи на многократно амплификация на тринуклеотидния повтор GGC, разположен в 5' – нетрансрируемия район на гена *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*) (7; 4; 14; 23).

Генът *fmr1* кодира белтък - *FMRP*, който има РНК – свързваща активност (1; 17; 19). Беше показано, че *FMRP* се свързва с активно транскрибиращите се полирибозоми (18; 9; 1; 23), взема участие в пътя на микроРНК(miRNA) и интерфериращите РНК (RNAi) (9; 3; 15), негативно регулира разклоняването на невритите (5; 11), участва в развитието на синапсите (10; 23) и в поведението на организмите.(23; 5; 13;)

За разлика от всички гръбначни животни, *Drosophila melanogaster* има само един ортолог на *FMRP* – *dFMRP*, кодиран от един единствен ген *dfmr1* (*Drosophila fragile X mental retardation 1*) (19). Дрозофилният *dFMRP* е силно хомоложен на бозайниковия по отношение на структура, РНК-свързване, тъканна и субклетъчна локализация (19).

ИЗЛОЖЕНИЕ

Целта на настоящото изследване е да се получат химически индуцирани мутации в гени-модификатори на гена *dfmr1* (*fragile X mental retardation 1*) при *Drosophila melanogaster*.

Нашата хипотеза е, че тъй като неговият продукт е РНК-свързващ белтък със сложни биологични функции и наличие на белтък-свързващ домен в неговата структура, той може да взаимодейства с много други белтъци директно или индиректно – чрез общи РНК-мишени. Именно такива гени, чиито транскрипти или белтъчни продукти взаимодействат с *dFMRP*, ние очакваме да намерим в нашия мутационен скрининг за модификатори на *dfmr1*.

Методи и материали:

Дрозофилни линии

w^[1118]; P{w^[+mc] = UAS - Fmr.Z}3

w^[*]; P{w^[+mC] = GAL4-ninaE.GMR}12

w^[*]; P{w^[+m] = GAL4-vg.M}2; TM2/TB6B, Tb[1]

w^[1118];

Всички линии ни бяха любезно предоставени от дрозифилният център в Bloomington, САЩ и бяха отглеждани върху дрозифилна среда със стафида при температура 25°С.

GAL4/UAS - система за насочена генна експресия

Всяка *GAL4/UAS* система се състои от две части, които са представени в отделни трансгенни линии дрозифили. *GAL4*-линията осигурява тъканно-специфична експресия на дрождения активатор на транскрипцията *GAL4*. А *UAS*-линията съдържа клониран ген, чиято експресия искаме да индуцираме downstream от активиращата *UAS* -последователност. При кръстосването на тези две линии в поколението F1 се осигурява насочена от активатора *GAL4* експресия на интересувания ни ген именно в тази тъкан, където се експресира този активатор (4).

На фона на ектопично експресирани/свърхекспресирани ген и неговия фенотип в лесна за наблюдаване тъкан, в която промяната в експресията не уврежда жизнеспособността на организма, могат да се търсят гени, мутациите в които модифицират съответния фенотип.

В нашата работа ние използвахме като подобен фон два отделни фенотипа: "груби очи"(очен фенотип) и абнормална крилова морфология (крилов фенотип).

Химична мутагенеза с етил-метансулфонат (EMS)

Нашите опити по химична мутагенеза с EMS провеждахме по метода на Люис и Бечър (12), с модификации (16). Използвахме 0 - 48 часови мъжки дрозифили от линия $w^{1118}; P\{w\{+mC\}=UAS-fmr1.Z\}3.$, които оставяхме да гладуват 12 часа. Група от 20 мухи поставяхме в епруветка с парче кухненска хартия, върху което накапвахме 25 mM EMS в 1% захароза и захранвахме мухите 12 часа. След 3 часа мутагенизираните мъжки дрозифили кръстосвахме индивидуално с женски индивиди от линии $w\{*\}; P\{w\{+mC\}=GAL4-ninaE.GMR\}12$ и $w\{*\}; P\{w\{+m\}=GAL4-vg.M\}2; TM2/TB6B, Tb\{1\}$ и оставяхме да снасят в продължение на 3-4 дни. Този интервал от време позволява отчетане на мутации в мъжките полови клетки, намиращи се в момента на прилагането на мутагена на стадий зрели сперматозоиди.

В полученото поколение на всеки мутагенизиран мъжки за наличието на доминантни модификатори на мутантния очен/крилов фенотип, ние съдихме по появата на отделни индивиди с усилен или отслабен мутантен фенотип в сравнение с този на останалите индивиди. Мутация, усилваща контролния мутантен фенотип класифицирахме като енхансер. Мутация, поправяща този фенотип, определяхме като супресор. В нашият скрининг търсехме предимно редки мутанти от женски пол, за които предполагахме, че носят доминантна мутация по ген-модификатор в X-хромозомата, тъй като в литературата липсват данни именно за X-хромозомни модификатори (21).

Тези мутантни женски мухи бяха кръстосани с мъжки индивиди от линия w^{1118}/Y с цел проверка на това дали тези мутанти с доминантен енхансерен фенотип унаследяват наблюдавания фенотип, т.е., дали не са "фалшиви сигнали". С генетични методи проверихме кои от получените мутации имат рецесивен летален фенотип. При положителен отговор на тази проверка намерената мутация следва да се въведе в балансирана линия ($w^{mut}/FM7c$). Схема за кръстоски, подобна на горната, прилагаме и когато сме използвали крилов фенотип и сме намерили гени-модификатори на този фенотип.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ:

В нашата работа ние първоначално анализирахме как се наблюдава ектопично индуцираният очен и крилов мутантен фенотип при различни температури.

В табл.1 е показан очният фенотип на F₁-поколение с генотип *Gal4- nina E.GMR /+; UAS-Fmr1/+* при различни температури.

Таблица 1. Очен фенотип на поколението F₁ от кръстоската на трансгенните линии *Gal4-ninaE.GMR* и *UAS-Fmr1* при различни температура.

| Транс- генни линии | Очен фенотип | | | | |
|---|---|--|---|---|---------------------|
| | Температура | | | | |
| | 18° | 21,5° | 23° | 25° | 27° |
| <i>GAL4-ninaE.GMR</i> x <i>UAS-Fmr1.Z</i> | Преживелите индивиди от двата пола имат средно "груби очи" и депигментация на ретината. | Преживелите индивиди от двата пола имат по-"груби" очи, депигментация на ретината и некроза. | Преживелите индивиди (повече женски) имат "груби" депигментирани очи. | Преживяват женските индивиди, които са със смачкано тяло и криле. Силно "груби" очи . | Няма излюпени мухи. |

От таблица 1 се вижда, че при кръстосването на линии *Gal4-ninaE.GMR* и *UAS-Fmr1.Z* в поколението се наблюдават дефекти в ретината на очите, които са по-силно изразени при по-високи температури.

Данните от анализа на криловия фенотип, получен при свръхекспресия на гена *dfmr1* при различни температури, са показани в табл. 2.

Таблица 2. Крилов фенотип на поколение F₁, получено от кръстоската на трансгенните линии *Gal4-vg.M* и *UAS-Fmr1* при различни температури

| Транс- генни линии | Крилов фенотип | | | | |
|--|---|---|---|---|---|
| | Температура | | | | |
| | 18° | 21,5° | 23° | 25° | 27° |
| <i>GAL4-vg.M</i> x <i>UAS-Fmr1.Z</i> | Почти без изрезки по крилата и за двата пола. | Всички мъжки мухи са с изрезки на крилата (пълна пенетрантност) | Всички мъжки и част от женските с изрезки (непълна пенетрантност в женския пол) | Всички мъжки и част от женските мухи с изрезки (непълна пенетрантност в женския пол). | Всички мъжки и женски мухи с изрезки (пълна пенетрантност при двата пола) |

Както се вижда от таблицата, мутантният крилов фенотип - резултат от свръхекспресия на *dfmr1* в клетките на криловия диск, показва пълна пенетрантност в индивидите от мъжки пол при 21,5°, а при 27° - пълна пенетрантност и за женския пол.

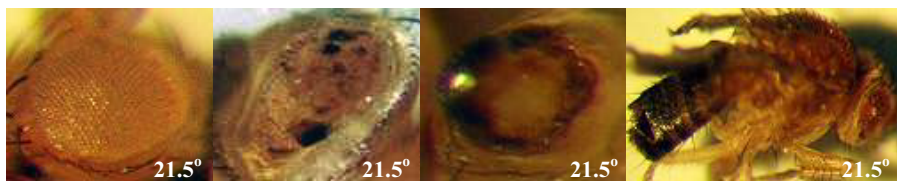
В наше предишно изследване ние оценихме специфичността на ектопично индуцирания очен и крилов фенотип (6).

От получените в настоящата работа резултати за индуциране на мутантен фенотип като резултат от свръхекспресия на *dfmr1* ние установихме, че не само очният, но и криловият фенотип могат да се използват като удобен, лесно идентифициращ се фон за скрининг на мутации. Проявлението и на двата фенотипа се оказва в силна степен температуро-чувствително. След анализирването на всички данни, за улеснение на техническото изпълнение на експеримента ние решихме да се ограничим със скрининг на енхансери и супресори на двата фенотипа-очен и крилов феноти при една и съща температура 21,5°. При нея очкавахме да откриваме с много по-голяма вероятност енхансерни, а не супресорни мутации на анализирания фенотипове. За откриване на енхансери на очния фенотип най-подходяща се оказа температура от 18°, а за откриване на супресорни мутации най-подходящо би било да използваме по-високи температури. Мутантният крилов фенотип е дори по-подходящ за работа, защото в по-малка степен снижава

жизнеспособността на мухите. Удобни за скрининг на енхансерни мутации, както и при очния фенотип, се оказаха ниските температури, а за скрининг на супресорни мутации по-високите.

В експеримента с очен фенотип анализирахме общо 61860 какавиди, от които се излюпиха 18900 (30%). Намерихме 94 женски мухи със силно изрязани груби очи и 16 мъжки мухи със същият фенотип – кандидат енхансери на очния фенотип. Освен нарушения в морфологията на очите в много от тези предполагаеми мутанти се наблюдаваха и аномалии в други органи - смачкани или недоразвити криле. Намерихме също 5 женски и 3 мъжки мухи с почти нормални очи – кандидат-супресори. Общият брой на получените предполагаеми модификатори е 110, така че общата честота на тяхното възникване е приблизително 0,6%.

На **фиг. 3** е показан енхансерен и супресорен очен фенотип.



Фиг.3 Енхансерен и супресорен очен фенотип: А) фонов очен фенотип; Б) и В) енхансерен фенотип при температура 21,5°; Г) енхансерен фенотип с нарушения в крилата при 21,5°;

В експеримента с крилов фенотип анализирахме общо 16196 какавиди, от които се излюпиха 12176, т.е., 76 % се развиха до имаго. Сред тях намерихме 59 женски мухи със силно изрязани крила и 26 мъжки мухи със същият фенотип. Общата честота на намерените от нас мутации, модифициращи криловия фенотип, е около 0,7%, и е близка до тази на мутациите, модифициращи очния фенотип.

Енхансерен крилов фенотип е илюстриран на **фиг.4**



Фиг.4 Енхансерен крилов фенотип : А – нормална експресия на *dfmr1*; Б – ектопична експресия на *dfmr1* при температура 21,5° (женски индивид); В - ектопична експресия на *dfmr1* при температура 21,5° (мъжки индивид)

Намерените от нас мутанти – енхансери и супресори, кръстосахме с индивиди от линия w^{1118} с цел проверка на това дали тези мутанти с доминантен енхансерен/супресорен фенотип унаследяват стабилно наблюдавания фенотип и дали имат рецесивен летален фенотип.

Данните от тези експерименти показаха, че практически всички анализирани до тук мутанти унаследяват първоначално идентифицирания фенотип.

Проверката за наличие на рецесивен летален фенотип на тези доминантни модификатори показа, че 7 от енхансерите на очния фенотип и 4 от енхансерите за крилов фенотип имат рецесивен летален ефект. Предстои тяхното рекомбинационно картиране и идентифициране на гена модификатор на *dfmr1*.

Ние предполагаме, че получените в нашите експерименти енхансери и супресори възникват в локуси, които кодират потенциални функционални партньори на гена *dfmr1*. Част от тях ще взаимодействат на ниво белтък при осъществяване на сложните функции на dFMRP в невроните. Други мутации ще засягат гени, контролиращи самото развитие на очите и крилата, които са извън интереса на нашият скрининг. Нашите усилия са насочени предимно към идентифициране на X-хромозомни модификатори на *dfmr1*, тъй като, доколкото ни е известно, данни за такива липсват в литературата (21).

ИЗВОДИ

1. Получени са химически индуцирани с EMS доминантни мутации в гени модификатори – енхансери и супресори на гена *dfmr1* при *Drosophila melanogaster*
2. Анализиранияте мутанти унаследяват стабилно първоначално идентифицирания фенотип
3. Установено е наличието на рецесивен летален фенотип на 11 от доминантните модификатори на гена *dfmr1* (*fragile X mental retardation1*) при *Drosophila melanogaster*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение бихме искали да отбележим, че резултатите от тези изследвания ще дадат ценна информация за нови гени, чиито продукти взаимодействат с тези на гена *fragile X mental retardation1* при *Drosophila melanogaster*. Данните ще имат практическо значение, тъй като могат да бъдат екстраполирани върху човека и ще добавят нещо ново към изясняване патогенезата на синдрома на чупливата X-хромозома (*fragile X syndrome*).

ЛИТЕРАТУРА:

- [1]. Ashley et al, 1993; FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding, *Science*. 262(5133):563-6.
- [2]. Brand and Perrimon, 1993; Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse, *Exp Cell Res*. 258(1):162-70
- [3]. Caudy et al, 2002; Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery, *Genes Dev*. 16(19):2491-6
- [4]. De Vries et al., 1998; The fragile X syndrome, 1998, *J Med Genet*.35(7):579-89
- [5]. Dockendorff et al, 2002; *Drosophila* lacking *dfmr1* activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest. *Neuron* 34: 973-984
- [6]. Georgieva D, Narov K., Genova G., 2007, *Medicine III*, Stara Zagora, OBTAINING OF MUTATIONS IN GENES INTERACTING WITH THE GENE *dfmr1* (*fragile X mental retardation 1*) IN THE MODEL *DROSOPHILA MELANOGASTER*
- [7]. Hagerman, 1991; Physical and behavioral phenotype In: Hagerman RJ, Silverman AC eds. *Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment and research*, Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press, pp. 3-88
- [8]. Hagerman, 1996; *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research*, The John Hopkins University Press, Baltimore, p.3
- [9]. Ishizuka et al, 2002; A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev*. 16: 2497-2508
- [10]. Koh et al, 2000; *Drosophila* larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity., *Microsc Res Tech*. 49(1):14-25
- [11]. Lee et al, 2003; Control of dendritic development by the *Drosophila* fragile X-related gene involves the small GTPase Rac1., *Development* 130(22):5543-52.

- [12]. Lewis and Bacher, 1968, "Method of feeding ethyl methane-sulfonate (EMS) to drosophila males" ,Drosophila Inform. Serv. 43 : 193
- [13]. Morales et al, 2002; Drosophila fragile X protein, DFXR, regulates neuronal morphology and function in the brain, Neuron. 34(6):961-72.
- [14]. O'Donnell and Warren, 2002, A decade of molecular studies of fragile X syndrome. Annu.Rev. Neurosci 25: 315-338
- [15]. Okamura et al, 2004, Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways, Genes Dev. 18(14):1655-66.
- [16]. Onishi, 1977, Spontaneous and ethyl methane-sulfonate – induced mutations controlling viability in Drosophila melanogaster. Recessive lethal mutations", Genetics 87: 519-527
- [17]. Siomi, et al, 1994; Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome., Cell;77 (1):33-9.
- [18]. Tamanini et al, 1996, FMRP is associated to the ribosomes via RNA. Hum. Mol.Genet. 5: 809-813.
- [19]. Wan et al, 2000; Characterization of dFMR1, a Drosophila melanogaster homolog of the fragile X mental retardation protein. Mol Cell Bio:8536-47.
- [20]. Weiler et al., 1997. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation., Proc.Nat.Acad.Sci USA. 94(10):5395-400.
- [21]. Zarnescu DC, Jin P, Betschinger J, Nakamoto M, Wang Y, Dockendorff TC, Feng Y, Jongens TA, Sisson JC, Knoblich JA, Warren ST, Moses K., 2005, Fragile X protein functions with Igl and the par complex in flies and mice., Dev Cell. 8(1):43-52.
- [22]. Zhang and Broadie 2005, Fathoming fragile X in fruit flies, Trends in Genet 21(1): 37-45
- [23]. Zhang et al, 2001, Drosophila fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function, Cell. 107(5):591-603.

За контакти:

Доц. д-р Гинка Генова, СУ „Св. Кл. Охридски“, Катедра Генетика, 02/8167248, genova@biofac.uni-sofia.bg

Димитрина Георгиева, докторант СУ” Св.Кл. Охридски”, Катедра Генетика, 02/8167238, dgeorgieva@biofac.uni-sofia.bg

Докладът е рецензиран.