

UDC 612.815.1:575.113:612.822.2:595.1

Ген дофамінового рецептора першого типу експресується в механосенсорних нейронах *Caenorhabditis elegans*

В. В. Стадник¹, А. Реґош¹, Х. Я. Майор¹, І. С. Фоменко²,Т. І. Бондарчук², О. Я. Складаров²¹Ойтвош Лоранд Університет
Пл. Університетська, 1-3, Будапешт, Угорщина, 1053²Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Вул. Пекарська, 69, Львів, Україна, 79010

biochemistry@meta.ua

*Результати досліджень експресії дофамінових рецепторів в *C. elegans* наразі залишаються неповними і фрагментарними. Мета роботи полягала у вивченні профілю експресії дофамінового рецептора типу 1 (*dop-1*) в *C. elegans* з використанням промотору розміром 3 тис. п. н., 3'-кінцева послідовність якого розташована перед кодоном АТГ гена *dop-1*. Методи. Культивування штаму *C. elegans*, мутантного за геном *unc-119*, з агаром NGM. Для перевірки паттерну експресії *dop-1* ампліфіковано промотор гена методом ПЛР. Клітини тварин кобобардували плазмідною *rPD95.77dop-1::GFP* та репортерною конструкцією з геном *unc-119*. Результати. Із застосуванням GFP як репортерного білка вдалося повністю охарактеризувати профіль експресії дофамінового рецептора першого типу в *C. elegans*. Висновки. Продемонстровано, що даний білок експресується в механосенсорних нейронах, таких як PLM, PVQR, PVQL, ALNR, ALNL, DVAR і DVC.*

*Ключові слова: дофамінові рецептори, механосенсорні нейрони, *Caenorhabditis elegans*, експресія.*

Вступ. Дофамін – один із найважливіших нейротрансмітерів у багатьох тварин: від круглих червів до ссавців. У людини він бере участь у регуляції локомоторної активності, мислення, емоційного стану тощо [1]. Порушення метаболізму цієї сполуки може спричинити низку широко розповсюджених захворювань людини, таких як шизофренія, хвороба Паркінсона та синдром Туретта [2].

Паразитичну нематоду рослин *C. elegans* використовують як модельний організм уже більш ніж 20 років [3]. Останнім часом її застосування поширюється на моделювання нейродегенеративних патологій і дизайн лікарських засобів [4]. Тому вельми актуальним наразі є детальне вивчення нервової системи, включаючи метаболізм нейромедіаторів та їхніх рецепторів у *C. elegans*.

Відомо чотири типи дофамінових рецепторів, які (за аналогією до людських) поділено на дві родини: D1, до якої належить рецептор типу 1 (*dop-1*), та D2, що включає в себе рецептори типів з 2-го по 4-й (*dop-2–4*) [2].

Попередні дослідження профілю експресії дофамінового рецептора першого типу виявилися досить неоднозначними, оскільки в роботах продемонстровано різні паттерни нейронів, у яких експресується репортерна конструкція. Останнє можна пояснити неоднаковою довжиною та структурою промоторів, використаних у цих роботах [5–7]. Тому було вирішено детальніше проаналізувати профіль експресії *dop-1* в *C. elegans* з використанням промотору розміром 3 тис. п. н., 3'-кінець якого локалізований перед АТГ-кодоном гена *dop-1*. Вибір довжини промотору зумовлено завданням отримати якомога специфічніший паттерн експресії, не за-

лежний від інших регулювальних елементів ДНК, які можуть знаходитися у промоторах більшої довжини і спричиняти експресію репортерного білка в нецільових нейронах.

Матеріали і методи. Штами. Використано штам *C. elegans*, мутантний за геном *unc-119*, який призводить до практично повного паралічу тварин. Штам отримано з Генетичного центру *Caenorhabditis* (США). Культивування проводили на чашках Петрі з NGM-агаром. Джерелом живлення слугували бактерії *Escherichia coli* штаму OP50 (OP50).

Генетичні конструкції. Для перевірки паттерну експресії *dop-1* промотор даного гена розміром 3 тис. п. н. ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із застосуванням протоколу single worm PCR [8]. Після цього промотор гена *dop-1* вбудовували в плазміді *pPD95.77* («Addgene», США) за рестрикційними сайтами *HindIII* і *Sfr9I* для отримання конструкції *pPD95.77dop-1::GFP* (рис. 1).

Генне бомбардування *C. elegans*. Клітини тварин кобомбардували плазмідією *pPD95.77dop-1::GFP* та репортерною конструкцією *pRH21Unc119* (Prof. A. Fire lab, США) з геном *unc-119*, який забезпечує відновлення дикого фенотипу. Бомбардування проводили на приладі PDS-1000/He system («BioRad», США) з тиском у камері 9,3 МПа і 711 мм рт. ст. вакууму.

Для доставки ДНК використовували золоті наночастинки, покриті лінеаризованою плазмідною ДНК у співвідношенні 3:1 за стандартною методикою [9]. За два дні до бомбардування культуру *C. elegans* синхронізували, а за 1 год до початку дослідження переносили на чашки без бактерій. Після бомбардування тварин культуру інкубували протягом 30 хв за кімнатної температури і розсівали на чашки з агаром NGM і OP50.

Скринінг починали через 3 дні після бомбардування і продовжували упродовж 10 днів з використанням світлового та конфокальних мікроскопів.

Результати і обговорення. При візуалізації експресії GFP під контролем промотору гена *dop-1* виявлено, що експресія цільового білка реєструється переважно в нейронах голови та хвоста (рис. 2, а, б). У хвості дослідних тварин GFP виявлено в нейронах PLM, PVQR, PVQL, ALNR, ALNL, DVAR,

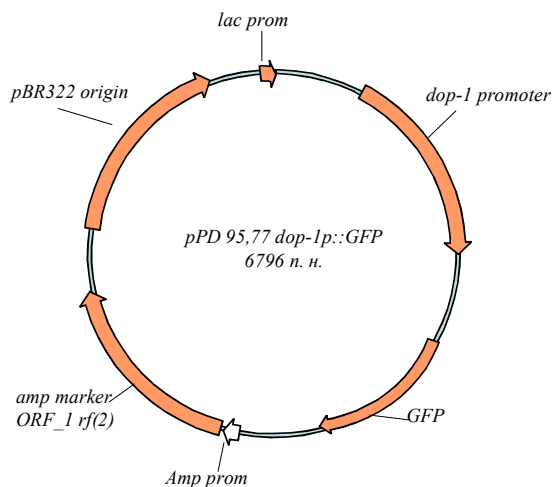


Рис. 1. Схема плазміді *pPD95.77dop-1::GFP*

DVC (рис. 2, а). У голові тварин флуоресценцію GFP детектували в нейронах CEPDL і CEPDR, а також в чисельній групі клітин, що оточують нервове кільце (рис. 2, б), які належать до механосенсорних нейронів, відповідальних за реакцію на м'які дотики. Крім краніального та каудального відділів, GFP експресується у механосенсорних нейронах PVM і AVМ, розташованих у середній ділянці тіла *C. elegans* (рис. 2, а, в).

Оскільки експресію GFP зафіксовано лише в механосенсорних нейронах, можна зробити висновок стосовно того, що дофаміновий рецептор першого типу повинен обумовлювати відповідь на механічні стимули. Це засвідчують попередньо отримані результати про зміни реакції нокаутних за геном *dop-1* тварин на механічні подразники. Але несподіваним стало те, що всі вищезазначені нейрони не є постсинаптичними відносно дофамінергічних клітин *C. elegans*, що може слугувати ще одним підтвердженням гіпотези про нейроендокринний ефект дофаміну у нервовій системі.

Висновки. Охарактеризовано профіль роботи промоторної ділянки гена дофамінового рецептора нематоди *C. elegans* розміром 3 тис. п. н. за використання експресії репортерного гена *gfp*, що дає можливість у подальшому використовувати ці результати при розробці нових методів пошуку засобів для лікування захворювань, пов'язаних з порушенням функціонування дофамінергічної системи передачі нервового імпульсу.

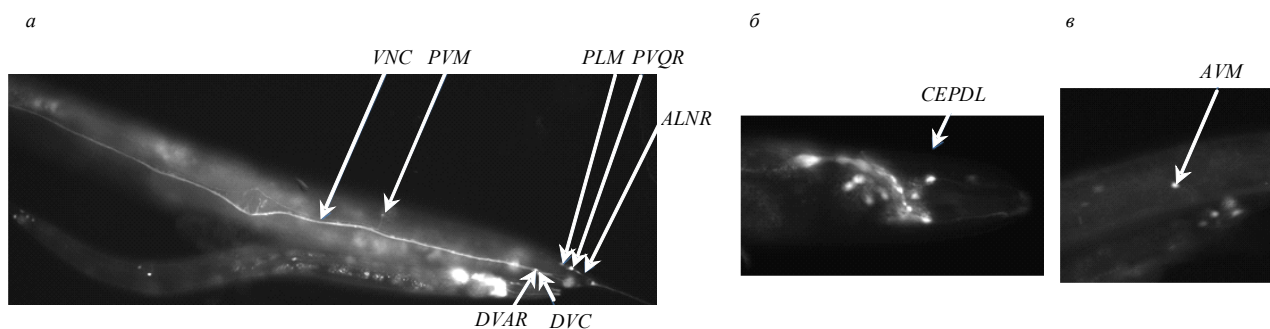


Рис. 2. Экспрессия *dop-1::GFP* у нейронах *C. elegans* (а – хвостовой відділ; б – головний відділ; в – середня частина тіла). *VNC* – вентрикулярний нервовий стовбур

V. V. Stadnyk, A. Regosh, C. Y. Mayor, I. S. Fomenko¹,
T. I. Bondarchuk¹, O. Y. Sklyarov¹

Dopamine receptor type 1 of *Caenorhabditis elegans* expressing
in mechanosensory neurons

Eotvos Lorand University
Egyetem ter 1-3, Budapest, Hungary, 1053

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University
69, Pekarska Str., Lviv, Ukraine, 79010

Summary

Until now the results on profiling dopamine receptors in *C. elegans* have been incomplete and fragmentary. The aim of this study was to investigate the expression profile of *dop-1* gene in *C. elegans* using 3 kb promoter with 3'-end locating before ATG of *dop-1* gene. **Methods.** The strain of *C. elegans* with mutant *unc-119* gene was used. To check a pattern of the *dop-1* expression, the promoter of this gene was amplified using PCR. The animals were co-bombarded with plasmid pPD95.77 *dop-1::GFP* and reporter construct containing *unc-119* gene. **Results.** Using GFP as a reporter protein, we built a whole picture of expression of dopamine receptor type 1 in *C. elegans* and found that this protein could be detected only in mechanosensory neurons such as PLM, PVQR, PVQL, ALNR, ALNL, DVAR, DVC.

Keywords: dopamine receptors, mechanosensory neurons, *Caenorhabditis elegans*, expression.

V. В. Стадник, А. Регош, Х. Я. Майор, И. С. Фоменко,
Т. И. Бондарчук, А. Я. Скляров

Ген дофаминового рецептора первого типа экспрессируется в
механосенсорных нейронах *Caenorhabditis elegans*

Резюме

До настоящего времени результаты исследований экспрессии дофаминовых рецепторов в *C. elegans* остаются неполными и фрагментарными. Цель работы состояла в изучении профиля экспрессии дофаминового рецептора первого типа (*dop-1*) в *C. elegans* с использованием промотора размером 3 тыс. п. н., 3'-концевая последовательность которого расположена перед кодоном ATG гена *dop-1*. **Методы.** Культивирование штамма *C. elegans*, мутантного по гену *unc-119*, с агаром NGM. Для проверки паттерна экс-

прессии *dop-1* амплифицировали промотор гена методом ПЛП. Клетки животных кобомбардировали плазмидой pPD95.77 *dop-1::GFP* и репортерной конструкцией с геном *unc-119*. **Результаты.** С использованием GFP в качестве репортерного белка удалось полностью охарактеризовать профиль экспрессии дофаминового рецептора первого типа в *C. elegans*. **Выводы.** Продемонстрировано, что данный белок детектируется в механосенсорных нейронах, таких как PLM, PVQR, PVQL, ALNR, ALNL, DVAR и DVC.

Ключевые слова: дофаминовые рецепторы, механосенсорные нейроны, *Caenorhabditis elegans*, экспрессия.

REFERENCES

1. Missale C., Nash S. R., Robinson S. W., Jaber M., Caron M. G. Dopamine receptors: from structure to function // *Physiol. Rev.*–1998.–**78**, N 1.–P. 189–225.
2. Suo S., Ishiura S., Van Tol H. H. Dopamine receptors in *C. elegans* // *Eur. J. Pharmacol.*–2004.–**500**, N 1–3.–P. 159–166.
3. Jorgensen E. M., Mango S. E. The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans* // *Nat. Rev. Genet.*–2002.–**3**, N 5.–P. 356–369.
4. Boyd W. A., McBride S. J., Rice J. R., Snyder D. W., Freedman J. H. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*–2010.–**245**, N2.–P. 153–159.
5. Chase D. L., Pepper J. S., Koelle M. R. Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans* // *Nat. Neurosci.*–2004.–**7**, N 10.–P. 1096–1103.
6. Sanyal S., Wintle R. F., Kindt K. S., Nuttle W. M., Arvan R., Fitzmaurice P., Bigras E., Merz D. C., Hebert T. E., van der Kooy D., Schafer W. R., Culotti J. G., Van Tol H. H. Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans* // *EMBO J.*–2004.–**23**, N 2.–P. 473–482.
7. Tsalik E. L., Niacaris T., Wenick A. S., Pau K., Avery L., Hobert O. LIM homeobox gene-dependent expression of biogenic amine receptors in restricted regions of the *C. elegans* nervous system // *Dev. Biol.*–2003.–**263**, N 1.–P. 81–102.
8. Brindley P. J., Heath S., Waters A. P., McCutchan T. F., Sher A. Characterization of a programmed alteration in an 18S ribosomal gene that accompanies the experimental induction of drug resistance in *Schistosoma mansoni* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*–1991.–**88**, N 17.–P. 7754–7758.
9. Berezikov E., Bargmann C. I., Plasterk R. H. Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation // *Nucleic Acids Res.*–2004.–**32**, N 4.–e. 40.

Received 09.06.11