

ГОРІНЬ М. Є., МАТІЙЦІВ Н. П. ✉

Львівський національний університет ім. І. Франка,  
Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: [marja.gorn@gmail.com](mailto:marja.gorn@gmail.com),  
[nataliya.matiytsiv@lnu.edu.ua](mailto:nataliya.matiytsiv@lnu.edu.ua)

✉ [nataliya.matiytsiv@lnu.edu.ua](mailto:nataliya.matiytsiv@lnu.edu.ua), (097) 199-32-93

## СТРАТЕГІЯ ПОШУКУ ПОТЕНЦІЙНИХ ГЕНІВ-ПАРТНЕРІВ ГЕНА *SWS DROSOPHILA MELANOGASTER*

**Мета.** Ген *swiss cheese (sws)* дрозофіли є ортологом нейротоксичної естерази (NTE або PNPLA6) ссавців. Цей білок задіяний у функціонуванні нервової системи і є причиною розвитку деяких полінейропатій, механізм яких невідомий. Щоб дослідити, у яких сигнальних шляхах залучений SWS та клітинний механізм формування SWS/NTE-залежної нейропатії, необхідно знайти гени-інтерактори гена *sws*. **Методи.** Пошук здійснено у базі даних про дрозофілу – Flybase, у базі даних NCBI (Gene) для пошуку ортологів, а для ймовірних білкових взаємодій застосовано веб-ресурс String. **Результати.** У Flybase зазначено лише 4 гени-інтерактори, які визначені експериментально. Базуючись на даних зміни експресії 28 генів за умов сайленсингу PNPLA6, проведено теоретичний пошук відповідних ортологів у дрозофіли. Аналіз *in silico* спрогнозував 10 білків, які, ймовірно, функціонують в одному метаболічному шляху. **Висновки.** Застосовані методи дали досить широкий список генів, які можуть взаємодіяти з *sws* на різних рівнях: від зміни експресії до прояву фенотипу. Тому обрано 25 потенційних генів-партнерів для перевірки генетичної взаємодії цих генів *in vivo*.

**Ключові слова:** ген *swiss cheese*, нейротоксична естераза, нейродегенерація, *in silico* аналіз, взаємодія генів, *Drosophila melanogaster*.

Ген *swiss cheese (sws)* кодує білок, який локалізується в ендоплазматичному ретикулумі і виступає як фосфоліпаза, деацитує лізофосфатидилхолін для отримання гліцерофосфохоліну в *Drosophila melanogaster* [1, 2]. У мутантів *sws*<sup>1</sup> внаслідок багатопарового гіперогортання нейронів із мембран навколишньої глії відбуваються апоптичні зміни. Такі зміни в тканині вперше з'являються на стадії пізньої лялечки та збільшуються в розмірі з віком, утворюючи зони дегенерації в усіх частках мозку [3].

Білок SWS має гомологію з відкритими рамками читування у дріжджів, нематод, ссавців з нейротоксичною естеразою хребетних (NTE); він на 39 % гомологічний до SWS/NTE миші (MSWS), який у свою чергу на 96 % ідентичний з NTE людини (кодується геном PNPLA6) [4]. Мутації в PNPLA6 пов'язані зі складними нервовими порушеннями людини, зокрема такими, як спастична параплегія-39, синдром Буше-Нойгойзера та синдром Гордона-Холмса [5, 6, 7, 8]. Вони також можуть викликати дегенерацію сітківки в дитинстві, зокрема синдром Олівера-Макфарлана [9, 10]. Тому мутанти за геном *sws* є експериментальною моделлю для функціональних досліджень консервативної ролі SWS/NTE в розвитку та в підтримці цілісності нервової системи.

Незважаючи на значний прогрес у розумінні функціонування SWS/NTE, залишається невідомим, у які сигнальні шляхи залучені ці білки. У нашій роботі ми описали стратегію пошуку генів-кандидатів, які можуть бути функціональними партнерами для гена *sws* у *D. melanogaster*.

### Матеріали і методи

Було здійснено *in silico* та теоретичний аналіз із застосуванням таких ресурсів: база даних FlyBase ([flybase.org](http://flybase.org)) [11]; онлайн-застосунок String (v.11.0) ([string-db.org](http://string-db.org)) із налаштуваннями 10 вузлів, повної мережі, лише первинна оболонка [12]; підрозділ Gene в базі даних National Center for Biotechnological Information – NCBI [13].

### Результати та обговорення

Ген PNPLA6 експресується в різних тканинах людини, що свідчить про багатофункціональність його продукту – білка NTE. Проте достеменно відомо, що як PNPLA6 людини, так і ген *sws* дрозофіли, є критичними для функціо-

нування нервової системи. Однак роль цих білків у нервовій системі багатогранна: мутації в *PNPLA6* зумовлюють виникнення нейродегенеративних змін [14], а також порушення функції NTE можна спостерігати в оргонофосфат-індукованій повільній невропатії [15]. Скринінг генів-інтеракторів *in vivo* може допомогти зрозуміти генетичні мережі, що лежать в основі захворювань та фенотипових варіацій. Пошук генів-кандидатів слід починати методом *in silico* аналізу, виявляючи гени, які теоретично можуть взаємодіяти з геном *sws*. Для цього було застосовано кілька підходів.

У першу чергу ми звернулися до бази даних FlyBase. Це головна база даних, де зібрана інформація про всі гени дрозофіли та їхні алельні форми з описом відомих біологічних функцій та фенотипового прояву; всі наявні генетичні конструкти; лінії, які є доступними у різних колекціях; крім того, є і така базова інформація, як номенклатура запису генотипів дрозофіли, основні методика роботи з дрозофілою та ін. FlyBase пропонує різні інструменти для запиту, а також містить перехресну інформацію з іншими відомими базами даних. Проте пошук взаємодій гена *sws* показав лише 4 партнери *sws* (рис.). Ці дані були отримані експериментально з описом імовірного характеру взаємодії. Зокрема, *App1* (*β amyloid protein precursor-like*), *per* (*period*), *mys* (*mysospheroid*) відображають генетичну взаємодію [16, 17, 18 19], а *Pka-C3* (*Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic subunit 3*) ще й фізичну взаємодію [19]. Це дає підставу для дослідження впливу зазначених генів саме у формуванні *sws*-специфічного фенотипу.

Під час пошуку імовірних генів-партнерів важливо використовувати інструменти прогнозування, які зможуть дати хоч малий, але достовірний перелік кандидатів для подальшого експериментального тестування. Тому для передбачення білок-білкових взаємодій було застосовано веб-ресурс String, який здатний прогнозувати прямі (фізичні) та непрямі (функціональні) асоціації обчислювальними методами, імпортом інформації з інших баз даних та з наукової літератури. Пошук для гена *sws* видав результат із 10 генів з оцінкою достовірності >0.9 та з середнім значенням кластеризації 0,915, що свідчить про високу ймовірність існування зв'язку на

одній метаболічній карті в базі даних KEGG (табл. 1). Усі виявлені гени залучені у метаболізм гліцерофосфоліпідів, проте вони здатні виконувати й інші функції.

Оскільки пошук у базі даних та *in silico* дали невеликий перелік генів, було здійснено теоретичний пошук у науковій літературі щодо можливих інтеракторів білка людини NTE (*PNPLA6*). Ми застосували дані з експерименту Паміс [Pamies et al., 2014] [20]. У досліді за умови сайленсингу гена *PNPLA6* у клітинах людини лінії hNT2 методом мікроматричного аналізу виявлено гени зі зміненою експресією. В першу добу «мовчання» гена *PNPLA6* змінили експресію 28 генів людини, які пов'язані з функціонуванням розвитку нервової та кровоносної систем. Нами був здійснений пошук відповідних ортологів цих генів у дрозофіли із застосуванням бази даних NCBI в розділі Gene [13].

Застосовані підходи дозволили отримати перелік 24 генів, які потенційно можуть взаємодіяти з геном *sws* (табл. 2).

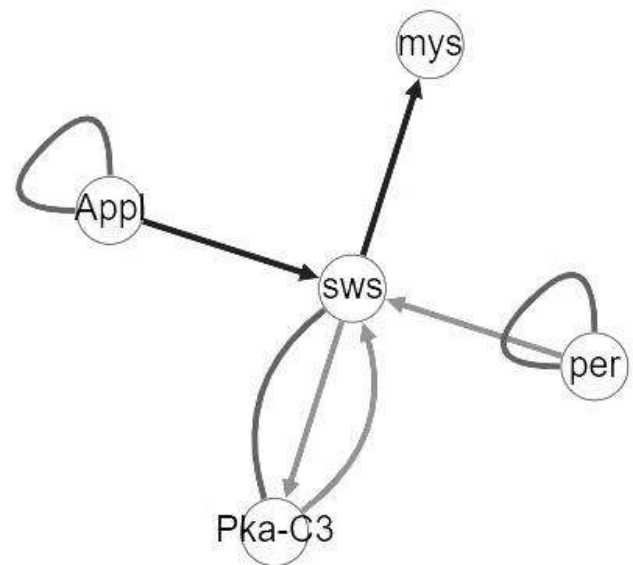


Рис. Взаємодії *sws*, зазначені у базі даних FlyBase: темна стрілка – супресія, світла – посилений вплив (внаслідок генетичних взаємодій); дуга – фізична взаємодія.

Таблиця 1. Імовірні білкові взаємодії з білком SWS, спрогнозовані у застосунку String

Передбачувані функціональні партнери	сусідство	злиття генів	філогенетична поява	гомологія	ко-експресія	експериментальне доведення	анотації з баз даних	літературні дані	Оцінка достовірності
<i>CG14507</i>	0	0	0	0	0	0	0.900	0.273	<b>0.924</b>
<i>CG18858</i>	0	0	0	0	0.050	0	0.800	0.532	<b>0.903</b>
<i>CG2818</i>	0.043	0	0	0	0.054	0	0.900	0.407	<b>0.939</b>
<i>CG31683</i>	0	0	0	0	0.050	0	0.800	0.532	<b>0.903</b>
<i>CG32699</i>	0.044	0	0	0	0.053	0	0.900	0.049	<b>0.902</b>
<i>GIII<math>\text{spla}2</math></i>	0	0	0	0	0	0	0.900	0.595	<b>0.957</b>
<i>GXIV<math>\text{sPLA}2</math></i>	0	0	0	0	0.053	0	0.900	0.556	<b>0.954</b>
<i>iPLA2-VIA</i>	0	0	0	0	0.094	0	0.900	0.615	<b>0.962</b>
<i>nes</i>	0	0	0	0	0.053	0	0.900	0.115	<b>0.908</b>
<i>sPLA2</i>	0	0	0	0	0	0	0.900	0.395	<b>0.936</b>

Таблиця 2. Перелік імовірних генів-інтеракторів гена *sws Drosophila melanogaster*

Ідентифікатор FlyBase	Ген	Продукт гена
1	2	3
FBgn0000108	<i><math>\beta</math> amyloid protein precursor-like (Appl)</i>	бета-амілоїдний подібний білок
FBgn0004657	<i>myspheroid (mys)</i>	$\beta$ субодиниця димеру інтегрину
FBgn0000489	<i>Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic subunit 3 (Pka-C3)</i>	каталітична субодиниця цАМФ-залежної протеїнкінази
FBgn0003068	<i>period (per)</i>	транскрипційний репресор, залучений у циркадних ритмах
FBgn0026630	<i>nessy (nes)</i>	лізофосфоліпід ацилтрансфераза 5
FBgn0036545	<i>GXIV<math>\text{sPLA}2</math> (GXIV<math>\text{sPLA}2</math>)</i>	кальцій-залежна фосфоліпаза A2
FBgn0036053	<i>iPLA2-VIA calcium-independent phospholipase A2 VIA (iPLA2-VIA)</i>	кальцій-незалежна фосфоліпаза A2 VIA,
FBgn0042175	<i>CG18858</i>	нехарактеризований білок, ізоформа A; Активність O-ацилтрансферази.
FBgn0000464	<i>Leukocyte-antigen-related-like(Lar)</i>	трансмембранний рецептор тирозин фосфатази
FBgn0000578	<i>enabled (ena)</i>	єдиний член <i>Drosophila</i> сім'ї Ena / VASP. Виступає як полімераза;
FBgn0014163	<i>failed axon connections (fax)</i>	рецептор родини FAX
FBgn0025740	<i>Plexin B (PlexB)</i>	трансмембранний рецептор для лігандів, що включають семафорини
Bgn0000711	<i>flapwing (flw)</i>	ізоформа серин /треонін протеїнофосфатази 1
FBgn0000463	<i>Delta (Dl)</i>	трансмембранний білок родини EGF і один з двох лігандів сигнального шляху Notch

Продовження табл.

1	2	3
FBgn0004647	<i>Notch (N)</i>	трансмембранний білок, один з двох лігандів сигнального шляху Notch
FBgn0041100	<i>parkin (park)</i>	Е3 убіквітин лігаза з RING/Ubox подібним доменом білка типу цинкового пальця
FBgn0004516	<i>Glutamic acid decarboxylase 1 (Gad1)</i>	декарбоксилаза глютамінової кислоти
FBgn0050011	<i>gemini (gem)</i>	належить до родини інших ДНК-зв'язуючих транскрипційних факторі
FBgn0024326	<i>MAP kinase kinase (Mkk4)</i>	MAP кінза кінза 4; MAP кінзні каскади
FBgn0003256	<i>rolled (rl)</i>	мітоген-активований білок, основний компонент шляху RAS / MAPK
FBgn0010909	<i>misshapen (msn)</i>	стерильна 20 MAP кінз кінзи кінза
FBgn0001291	<i>Jun-related antigen (Jra)</i>	транскрипційний фактор
FBgn0029891	<i>PTEN-induced putative kinase 1 (Pink1)</i>	мітохондріально спрямована Ser-Thr кінза
FBgn0263395	<i>happyhour (hppy)</i>	ортолог MAP4K3, родина Ser/Thr-кінзи
FBgn0261456	<i>hippo (hpo)</i>	кінза на шляху Сальвадор-Вартс-Хіппо

### Висновки

Отже, застосована нами стратегія дозволила здійснити широкий, однак досить специфічний пошук генів-кандидатів, які теоретично здатні взаємодіяти із геном *sws* або його продуктом – білком SWS. Наступне дослідження полягатиме у з'ясуванні взаємозв'язку експериментальним методом шляхом схрещування двох особин з окремими мутаціями гена *sws* і ймовірного гена-інтерактора. Скринінг буде здійснен-

но за *sws*-специфічними фенотиповими проявами – утворення вакуоль у мозку, виживання за стресових умов та ін. Достовірною зміною фенотипу свідчитиме про генетичну взаємодію. Таке дослідження розширить розуміння взаємозв'язку між генотипом і фенотипом за зміни функції гена *sws*, а також можливі механізми функціональної компенсації. Всі одержані дані можна буде екстраполювати і для розуміння функціональності NTE людини.

### References

- van Tienhoven M., Atkins J., Li Y., Glynn P. Human neuropathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids. *J Biol Chem.* 2002. Vol. 277 (23). P. 20942–20948. doi: 10.1074/jbc.M200330200.
- Glynn P. Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation. *Biochim Biophys Acta.* 2005. Vol. 1736 (2). P. 87–93. doi: 10.1016/j.bbalip.2005.08.002.
- Matiytsiv N.P., Mohylyak I.I., Chernik Y.I. Screening for genes that cause neurodegenerative phenotype in *Drosophila melanogaster* mutants by X-chromosome. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology.* 2011. Vol. 57. P. 111–116. [in Ukrainian]
- 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. *Biochem J.* 1998. Vol. 332 (Pt 1). P. 1–4. doi: 10.1042/bj3320001.
- Koh K., Kobayashi F., Miwa M., et al. Novel mutations in the *PNPLA6* gene in Boucher-Neuhäuser syndrome. *J Hum Genet.* 2015. Vol. 60 (4). P. 217–220. doi: 10.1038/jhg.2015.3.
- Rainier S., Bui M., Mark E., et al. *Neuropathy target esterase* gene mutations cause motor neuron disease. *Am J Hum Genet.* 2008. Vol. 82 (3). P. 780–785. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.12.018.
- Topaloglu A.K., Lomniczi A., Kretzschmar D. et al. Loss-of-function mutations in *PNPLA6* encoding neuropathy target esterase underlie pubertal failure and neurological deficits in Gordon Holmes syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014. Vol. 99 (10). P. 2067–2075. doi: 10.1210/jc.2014-1836.
- Synofzik M., Gonzalez M.A., Lourenco C.M., et al. *PNPLA6* mutations cause Boucher-Neuhauser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum. *Brain.* 2014. Vol. 137 (Pt 1). P. 69–77. doi: 10.1093/brain/awt326.
- Hufnagel R.B., Arno G., Hein N.D., et al. Neuropathy target esterase impairments cause Oliver-McFarlane and Laurence-Moon syndromes. *J Med Genet.* 2015. Vol. 52 (2). P. 85–94. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102856.

10. Kmoch S., Majewski J., Ramamurthy V., et al. Mutations in *PNPLA6* are linked to photoreceptor degeneration and various forms of childhood blindness. *Nat Commun.* 2015. Vol. 6. P. 5614. doi: 10.1038/ncomms6614.
11. *FlyBase*: a database for drosophila genetics and molecular biology. Retrieved from: <https://flybase.org/reports/FBgn0003656>.
12. STRING is a database of known and predicted protein-protein interactions Retrieved from: [http://string-db.org/cgi/input.pl?sessionId=gWkAWZkt86IH&input\\_page\\_show\\_search=on](http://string-db.org/cgi/input.pl?sessionId=gWkAWZkt86IH&input_page_show_search=on).
13. Gene//National Center for Biotechnology Information. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
14. Sunderhaus E.R., Law A.D., Kretschmar D. Disease-associated *PNPLA6* mutations maintain partial functions when analyzed in *Drosophila*. *Front Neurosci.* 2019. Vol. 13. P. 1207. doi: 10.3389/fnins.2019.01207.
15. Richardson R.J., Hein N.D., Wijeyesakere S.J., Fink J.K., Makhaeva G.F. Neuropathy target esterase (NTE): overview and future. *Chem Biol Interact.* 2013. Vol. 203 (1). P. 238–244. doi: 10.1016/j.cbi.2012.10.024.
16. Ayyub C., Paranjape J. Genetic interactions provide evidence for the role of integrins in specifying normal olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet.* 2002. Vol. 16 (3). P. 165–174. doi: 10.1080/01677060215308.
17. Krishnan N., Rakshit K., Chow E.S., Wentzell J.S., Kretschmar D., Giebultowicz J.M. Loss of circadian clock accelerates aging in neurodegeneration-prone mutants. *Neurobiol Dis.* 2012. Vol. 45 (3). P. 1129–1135. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.034.
18. Wentzell J.S., Bolkan B.J., Carmine-Simmen K., Swanson T.L., Musashe D.T., Kretschmar D. Amyloid precursor proteins are protective in *Drosophila* models of progressive neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2012. Vol. 46 (1). P. 78–87. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.047.
19. Bettencourt da Cruz A., Wentzell J., Kretschmar D. Swiss Cheese, a protein involved in progressive neurodegeneration, acts as a noncanonical regulatory subunit for PKA-C3. *J Neurosci.* 2008. Vol. 28 (43). P. 10885–10892. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3015-08.2008.
20. Pamies D., Bal-Price A., Fabbri M., et al. Silencing of *PNPLA6*, the neuropathy target esterase (NTE) codifying gene, alters neurodifferentiation of human embryonal carcinoma stem cells (NT2). *Neuroscience.* 2014. Vol. 281. P. 54–67. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.031.

**HORIN M.Ye., MATIYTSIV N.P.**

Ivan Franko National University of Lviv,

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

**STRATEGY FOR SEARCHING POTENTIAL PARTNER GENES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* SWS GENE**

**Aim.** The *Drosophila swiss cheese (sws)* gene is a mammalian ortholog of neuropathy target esterase (NTE or PNPLA6). This protein is involved in the functioning of the nervous system and causes some kinds of polyneuropathy with the mechanism unknown. Genes-interactors of the *sws* gene should be found to investigate the cellular mechanism of SWS/NTE-dependent neuropathy formation and to find out what signaling pathways SWS is involved in. **Methods.** The search was done in the *Drosophila* database – Flybase, in the NCBI (Gene) database to search for orthologs, and the String web resource was used in the case of potential protein interactions. **Results.** Only four experimentally identified genes-interactors were listed in the Flybase. Based on the expression changes data of 28 genes at *PNPLA6* silencing, a theoretical search for the corresponding orthologs in *Drosophila* was done. The *in silico* assay predicted 10 proteins that are probably functioning within one metabolic pathway. **Conclusions.** The methods applied gave us a wide list of genes that can interact with *sws* at different levels: from the expression pattern to the phenotype. Therefore, 25 potentially partner genes were selected to verify the genetic interaction of these genes *in vivo*.

**Keywords:** gene *swiss cheese*, neuropathy target esterase, neurodegeneration, *in silico* analysis, genes interaction, *Drosophila melanogaster*.