

Э. М. ХУСАИНОВА, З. А. БУЛЕНТАЕВА, Б. О. БЕКМАНОВ,
Л. Б. ДЖАНСУГУРОВА, Р. И. БЕРСИМБАЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРА ЭКСПРЕССИИ АПОПТОЗНОГО ГЕНА *hid* В DNOS1-ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* В УСЛОВИЯХ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

Исследована экспрессия апоптоз-регулирующего гена *hid* и его продукта в ответ на тепловой шок в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster*, выступающих в роли доноров оксида азота.

Проблема программированной клеточной смерти (апоптоза), относится к числу фундаментальных проблем современной генетики. Необходимость изучения регуляции апоптоза определяется его важной ролью в нормальном функционировании клетки и организма в целом. Нарушения апоптоза лежат в основе раковых, сердечно-сосудистых, аутоиммунных и других заболеваний человека [1, 2]. Моделирование патологических процессов с использованием *Drosophila* является распространенным подходом к изучению регуляции генов в развитии и функционированию организма человека [3]. В настоящее время важная сигнальная молекула организма – оксид азота и белки теплового шока, в частности Hsp70 рассматриваются в качестве особых регуляторов апоптоза [4, 5].

В настоящей работе предпринята попытка выяснить характер экспрессии апоптозного гена *hid* и его продукта в ответ на тепловой шок в *dNOS1*-трансгенных линиях *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы дикая линия *Oregon R* в качестве контроля и трансгенные линии, содержащие дополнительные копии гена синтазы оксида азота дрозофилы, транскрибирующиеся в полноразмерный функциональный транскрипт DNOS1: *HS dNOS1* и *HS dNOS1 Flag*.

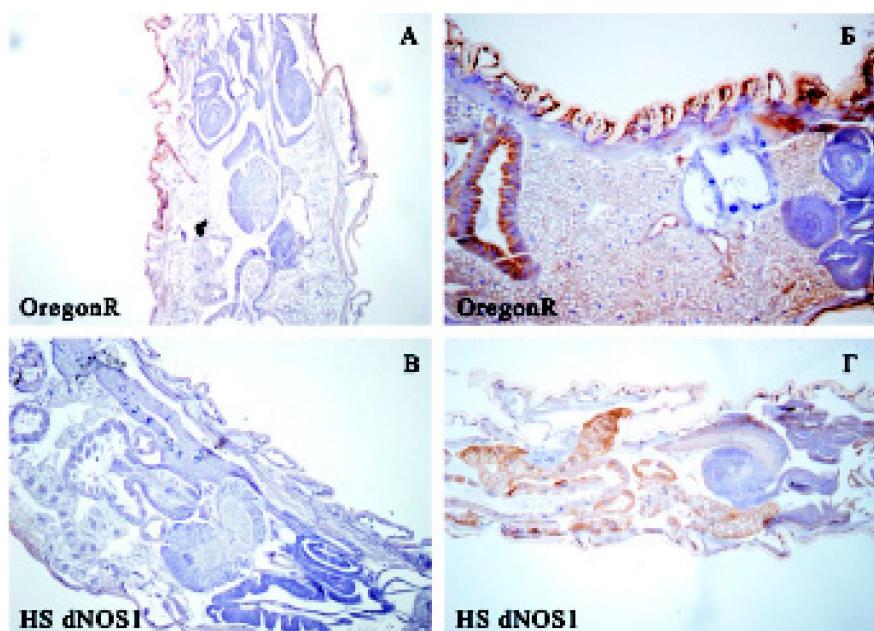
Основные методы, используемые в данном исследовании, описаны в ранее опубликованных работах [6].

Иммуногистохимический метод. Для иммуногистохимического анализа использовали гистологические препараты личинок III возраста *D. melanogaster* (личинок фиксировали в фиксаторе Карнуга в течение 1 часа. Срезы инкубировались в первичном антителе HSP-70 (SantaCruz, CA, USA) в разведении 1:400. Визуализацию проводили с использованием стрептавидина,

конъюгированного с пероксидазой (Dako, USA) и диаминобензидина (Dako, USA) в качестве субстрата. Срезы были контрокрашены гематоксилином.

Результаты и их обсуждение. В нашей работе были использованы личинки трансгенных линий *HS dNOS1 Flag* и *HS dNOS1*, в которых происходит дополнительный синтез оксида азота. Дополнительные копии *dNOS*-гена находятся под HS-промотором, который необходимо активировать с помощью повышенной температуры. В наших предыдущих исследованиях с использованием данных трансгенных линий было установлено, что сразу после активирования HS-промотора уровень экспрессии гена *dNOS* значительно возрастает, а через 2–3 часа начинает падать, но до исходного значения не доходит [6].

Анализ литературы говорит о том, что белок теплового шока Hsp70 способен ингибировать стресс-индукционный апоптоз и выступать в роли строгого антиапоптотического фактора [7, 8]. Иммуногистохимический анализ выявил, что сразу после теплового шока уровень экспрессии гена *hsp70* и его продукта – белка Hsp70 как в контрольной, так и в трансгенных линиях резко повышается: в интактных группах всех исследуемых линий данный белок присутствует в очень небольшом количестве, преимущественно в покровах, кишечном тракте и в жировом теле; сразу после теплового стресса и на протяжении 2–3 часов Hsp70 появляется в больших количествах в слюнных железах, глазо-антенных, крыловых и ножных имагинальных дисках (рис. 1). Характер и тканеспецифичность экспрессии гена *hsp70* и его продукта при действии теплового шока ранее были выявлены нами с помощью методов RT-PCR и Вестерн-блотт анализа [6]. Наблюдаемый эффект теплового воздействия на дикую линию *Oregon R* и *dNOS1*-трансгенне



линии *D. melanogaster* хорошо согласуется с литературными данными [9-11].

Для изучения влияния теплового шока и оксида азота на экспрессию апоптоз-регулирующего гена *hid* в личинках *D. melanogaster* мы провели ПЦР-амплификацию на основе кДНК с использованием специфических праймеров к данному гену. Результаты анализа регистрируют экспрессию гена *hid* в интактных образцах всех исследуемых линий (рис. 2), что свидетельствует о запуске апоптоза, связанного с характерным для данной стадии развития естественным метаморфозом личинок *Drosophila*. К тому же известно, что в отличие от апоптоз-регулирующих генов *grim* и *rpr* экспрессия гена *hid* идет постоянно, т.е. не только в клетках, вступивших на путь апоптоза, но и в нормально-функционирующих клетках [12].

Однако в образцах, подвергшихся температурной обработке, выявляется заметная разница

между контрольной и опытной линиями. Видно, что в контрольной линии Oregon R уровень экспрессии гена *hid* резко падает сразу после теплового шока, через 2–3 часа слегка начинает повышаться и достигает пика на 5–6 часов. В то время как в трансгенной линии HS dNOS1 Flag снижения уровня экспрессии апоптоз-регулирующего гена *hid* не происходит, а в линии HSdNOS1, напротив, наблюдается повышение экспрессии данного гена по сравнению с интактными образцами. Уровень экспрессии гена *hid* начинает снижаться спустя 2–3 часа после теплового стресса (рис. 2). Результаты RT-PCR анализа были подтверждены анализом накопления белка Hid с помощью Вестерн-блоттинга (рис. 3).

Сравнивая характер экспрессии гена *hsp 70* с экспрессией гена-индуктора апоптоза *hid*, можно отметить, что в дикой линии Oregon R запуск синтеза продукта гена *hsp 70* (белка теплового шока) включает защитную программу и приостанавливает процесс программирующей клеточной смерти – апоптоза. После снижения уровня экспрессии гена *hsp 70*, клетки вновь вступают на путь апоптоза.

Поскольку характер экспрессии гена *hsp 70* в обеих линиях одинаков, повышение уровня экспрессии апоптоз-индуцирующего гена *hid* в опытных линиях можно объяснить повышенной концентрацией оксида азота, обусловленной *dNOS1*-трансгенами. Так как количество оксида азота после температурной обработки резко увеличивается, защитная реакция белков тепло-

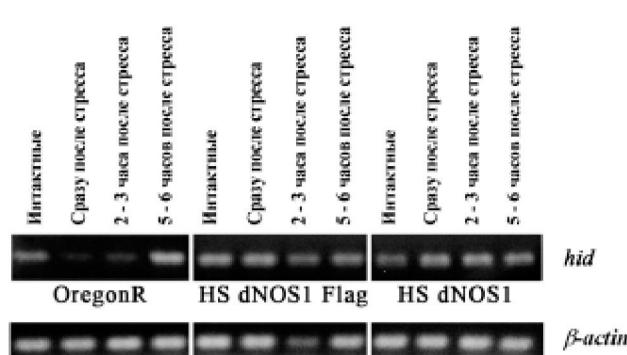


Рис. 2. Электрофорограмма продуктов амплификации апоптоз-регулирующего гена *hid*

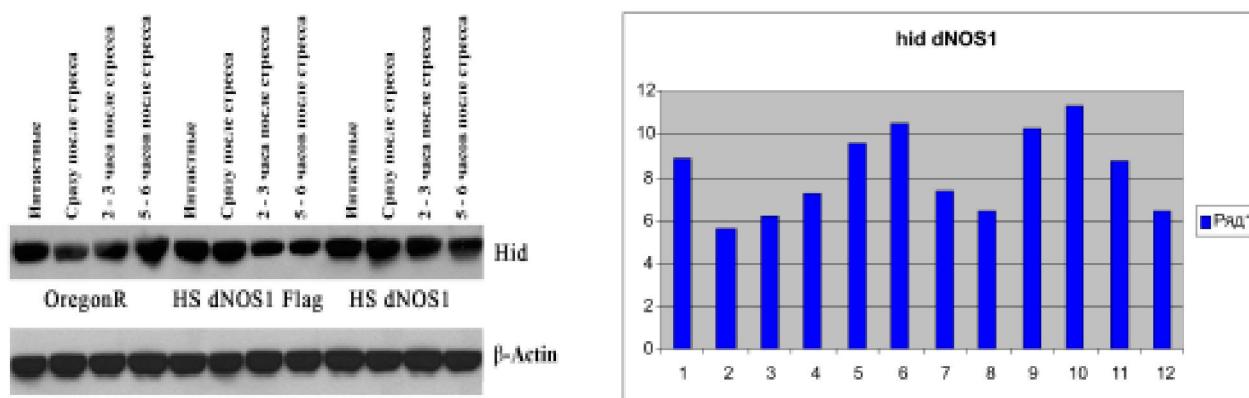


Рис. 3. Полуколичественный анализ содержания белка Hid в личинках *Drosophila*.
А – Вестерн-блот анализ, Б – данные сканирования блота

вого шока становится неконкурентноспособной и программа апоптоза продолжает выполняться посредством регуляции продуктом гена *hid*. Однако молекула оксида азота короткоживущая и быстро распадается на нитраты и нитриты, следовательно, уровень NO после индукции тепловым стрессом быстро снижается, в то время как белка Hsp70 в клетках остается много, что приводит к замедлению процесса апоптоза.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что антиапоптотическое действие Hsp70 у личинок *Drosophila melanogaster* осуществляется путем снижения экспрессии гена-индуктора апоптоза *hid*. Напротив, резкое повышение уровня оксида азота в клетках способно подавлять антиапоптотические функции Hsp70 и стимулировать повышение экспрессии апоптозиндуцирующего гена *hid*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide // Science. 1995. V. 267. P. 1445-1449.
2. Fadeel B., Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease // Journal of internal medicine. 2005. V. 258. P. 479-517.
3. Richardson H., Kumar S. Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death // J. of Immunological Methods. 2002. V. 265. P. 21-38.
4. Julian G. Kiang. Inducible heat shock protein 70 kD and inducible nitric oxide synthase in hemorrhage/resuscitation-induced injury // Cell Research. 2004. V. 14(6). P. 450-459.
5. Manucha W., Valles P. Hsp70/nitric oxide relationship in apoptotic modulation during obstructive nephropathy // Cell Stress and Chaperones. 2008. V. 13. P. 413-420.
6. Khussainova E., Bulentayeva Z., Bekmanov B., Djangsugurova L., Bersimbayev R. Interaction between nitric oxide

synthase DNOS1, Hsp70 and apoptosis regulatory gene *grim* in *Drosophila melanogaster* after heat stress induction // Biopolymers and Cell. 2010. V. 26, N 3. P. 194-199.

7. Arya R., Mallik M., Lakhota S. C. Heat shock genes – integrating cell survival and death // J. Biosci. 2007. V. 32. P. 595-610.

8. Хлебодарова Т.М. Как клетки защищаются от стресса? // Генетика. 2002. Т. 38, № 4. С. 437-452.

9. Lakhota S. C., Srivastava P., Prasanth K. V. Regulation of heat shock proteins, Hsp70 and Hsp64, in heat-shocked Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster* larvae // Cell Stress & Chaperones. 2002. V. 7, N 4. P. 347-356.

10. Schmitt E., Gehrmann M., Brunet M., Multhoff G., Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy // J. of leukocyte biology. 2007. V. 81. P. 15-27.

11. Feder J., Rossi J., Solomon J., Solomon N., Lindquist S. The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures // Genes Dev. 1992. V.6. P.1402-1413.

12. Bangs P., Franc N., White K. Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila* // Cell Death and Differentiation. 2000. V. 7. P. 1027-1034.

Резюме

Азот тотығының доноры ретінде жұмыс атқаратын апоптоз процесін реттеуши *hid* генінің және оның өнімдерінің жылу шок белогына жауабы *Drosophila melanogaster* шыбынының трансгенді линияларындағы экспрессиясы зерттелді.

Summary

In the current study we investigated the expression of apoptosis-regulating gene *hid* and its protein product in response to heat shock in transgenic strains of *Drosophila melanogaster*, used as donors of nitric oxide.

УДК 575.113:577.2

Институт общей генетики
и цитологии КН МОН РК,
г. Алматы

Поступила 10.09.10г.