

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

ВЛИЯНИЕ DNOS4-ТРАНСГЕНА НА ЭКСПРЕССИЮ АПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ *HID* И *GRIM* У *DROSOPHILA MELANOGASTER* В УСЛОВИЯХ ТЕПЛОВОГО СТРЕССА

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

Исследована взаимосвязь между экспрессией апоптоз-регулирующих генов *hid* и *grim* у *Drosophila melanogaster* и синтазой оксида азота в ответ на тепловой шок.

Изучение механизмов программированной клеточной смерти на эволюционно разных многоклеточных организмах демонстрирует консервативность основных путей апоптоза от нематоды до человека [1]. Хорошая изученность и широкая возможность генетических манипуляций, обуславливают исключительность использования *Drosophila* в качестве модельной системы для изучения развития и регуляции апоптотической гибели клеток [2].

Одной из широко известных сигнальных молекул является оксид азота (NO). Оксид азота участвует во многих физиологических и патоло-

гических процессах, в том числе и в апоптозе [3]. Мнения многих исследователей о роли NO в развитии апоптоза весьма противоречивы. Баланс анти- и про-апоптотического эффектов оксида азота зависит от многих факторов, в том числе от количества NO в тканях и взаимодействия его с другими регуляторами апоптоза [4].

В организме NO продуцирует синтаза оксида азота (NOS). У *Drosophila* один NOS-ген кодирует 10 различных транскриптов, которые могут кодировать, как минимум, 7 белков. Среди 10 известных у *Drosophila melanogaster* транскриптов NOS-гена только одна полноразмерная

изоформа DNOS1 энзиматически активна. Остальные в большей или меньшей степени урезаны и не имеют функционально значимых участков NOS. Среди урезанных изоформ обнаружена одна, отличающаяся уникальным пептидом с 21 аминокислотным остатком, получившая название DNOS4. Катализическую активность все NOS осуществляют только в гомодимерной форме. Формирование гетеродимеров, образуемых короткими и полноразмерными белками приводит к энзиматической дисфункции фермента. Транскрипция DNOS4 является доминантно негативным фактором регуляции образования гомодимеров DNOS1, а, следовательно, и синтеза NO в клетках *Drosophila* [5].

Широко известно, что клетки отвечают на различные химические и физиологические виды стрессов путем быстрого синтеза группы высоко консервативных белков известных как белки теплового шока или белки стресса (Hsps). В последнее время появляется много данных, свидетельствующих о том, что белки теплового шока, особенно Hsp70 и Hsp90 выступают в роли антиапоптотических факторов, препятствуя программируемой гибели клеток [6, 7].

Известно, что реализация программируемой клеточной гибели у *Drosophila melanogaster* требует экспрессии специфических генов-регуляторов апоптоза, действующих как интеграторы: *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*), and *grim* [1, 2]. Эти гены способны индуцировать апоптоз независимо друг от друга и на уровне транскрипции активируются разными факторами [8]. В то же время их функции и белок-белковые взаимодействия с другими клеточными компонентами, принимающими участие в апоптозе остаются мало изученными.

Таким образом, целью нашего исследования явилось изучение взаимодействия между экспрессией генов *dNOS*, *hsp70* и апоптоз-регулирующими генами *hid* и *grim* у *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась на личинках *Drosophila melanogaster* III возраста, содержащихся на стандартной питательной среде при 25°C. Были использованы дикая линия *Oregon R* в качестве контроля и трансгенные линии, содержащие дополнительные копии гена синтазы оксида азота

дрозофилы, транскрибирующиеся в усеченный нефункциональный транскрипт DNOS4:

1. *HS dNOS4* – в III хромосоме несет часть гена NOS дрозофилы с HS-промотором, транскрибирующуюся в усеченный нефункциональный транскрипт. X-хромосома маркирована мутацией *white apricot*;

2. *wGMR dNOS4* – содержит в X-хромосоме часть гена NOS дрозофилы с GMR-промотором, транскрибирующуюся в усеченный нефункциональный транскрипт. II и III хромосомы заменены балансерами. II хромосома маркирована мутацией *Curly* (*Cy* – закрученные вверх крылья), III хромосома – мутацией *Stuble* (*Sb* – короткие щетинки).

Индукция теплового шока. Индукцию теплового шока проводили в течение 1 часа, путем нагревания личинок в водяном термостате до 37°C. После индукции стресса проводили сбор личинок III возраста в следующих временных интервалах: сразу после теплового шока; спустя 2-3 часа и 5-6 часов после температурного стресса. В контрольных экспериментах использовали личинок, не подвергавшихся действию повышенной температуры.

Выделение РНК из личинок. Выделение тотальной мРНК из личинок проводили с использованием реагента RNA STAT-60 (Tel-Test inc., TX, США) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрация РНК определялась измерениями оптической плотности при длине волн 260 и 280 нм на спектрофотометре.

Синтез кДНК. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора для проведения обратной транскрипции («Силекс», Россия) согласно методике производителя. Реакция проводилась в 25 мl реакционной смеси, содержащей 2 мг тотальной РНК.

ПЦР анализ. ПЦР реакция проводилась в 20 мl реакционной смеси, содержащей 0,3 мМ каждого праймера и 0,5 мl кДНК. В качестве внутреннего контроля использовали амплификацию гена β -*actin*. Продукты реакции амплификации визуализировали в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия в проходящем УФ-свете.

Иммуноблоттинг. 20 мг белка разделяли в 8% SDS-PAGE геле путем электрофореза, затем белки переносили на PVDF мембранны (Immobilon-P, Millipore Corporation, MA, США). Первич-

ное антитело Hsp-70 (SantaCruz, CA, USA) использовали в разведении 1:4000 в блокирующем буфере. Результаты иммуноблоттинга анализировали с помощью компьютерной программы ImageJ.

Результаты и их обсуждение

Для анализа экспрессии дополнительных копий гена *dNOS* в трансгенных линиях *HS dNOS4* и *wGMR dNOS4* мы провели ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров. Данные линии трансформированы DNOS4-изоформой *NOS*-гена и выступают в роли ингибиторов синтеза оксида азота. Как видно по рис. 1, появление транскрипта *dNOS4* в линии *wGMR dNOS4* регистрируется в интактных образцах, а сразу после теплового стресса количество данного транскрипта уменьшается. Через 2-3 часа наблюдается незначительное увеличение, однако даже спустя 5-6 часов после стресса количество мРНК *dNOS4* не достигает исходного уровня. Напротив, в линии *HS dNOS4*, уровень экспрессии *dNOS4* после теплового шока слегка повышается, а через 2-3 часа достигает пика.

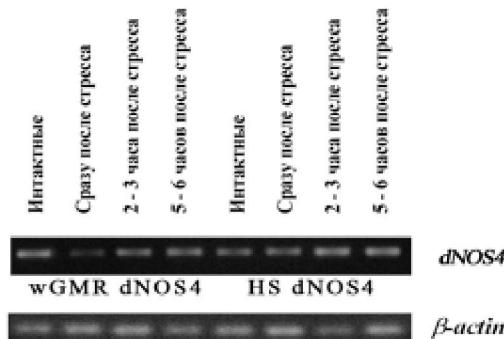


Рис. 1. Электрофорерограмма продуктов амплификации *dNOS4*-трансгена

Это объясняется тем, что в линии *HS dNOS4* дополнительные копии гена *dNOS* контролируются HS-промотором, следовательно, после включения промотора тепловой обработкой происходит повышенная экспрессия гена *dNOS4*. В то время как в линии *wGMR dNOS4* экспрессия дополнительных копий гена *dNOS4* контролируется тканеспецифическим GMR-промотором, который обеспечивает синтез DNOS4-изоформ в развивающихся структурах глаза и не требует включения с помощью тепловой обработки. Более того, обнаружено, что тепловой стресс негативно

влияет на работу GMR-промотора: сразу после тепловой обработки уровень экспрессии гена *dNOS4* резко снижается и начинает восстанавливаться только через 2-3 часа после стресса. Таким образом, тепловой стресс, как и многие другие виды клеточного стресса, вызывает изменения активности генов, что в свою очередь приводит к резким изменениям в синтезе белков.

Для анализа экспрессии гена *hsp70* мы индуцировали тепловой стресс у личинок дрозофилы. Результаты данного эксперимента свидетельствуют о том, что в обеих линиях, как в дикой линии *Oregon R*, так и в трансгенных линиях *HS dNOS4* и *wGMR dNOS4* после индукции теплового шока происходит увеличение экспрессии гена *hsp70*, с той лишь разницей, что в контрольной линии наблюдается резкое увеличение экспрессии сразу после стресса, в то время как в опытных линиях пик экспрессии гена *hsp70* приходится на 2-3 часа по окончании тепловой обработки (рис. 2).

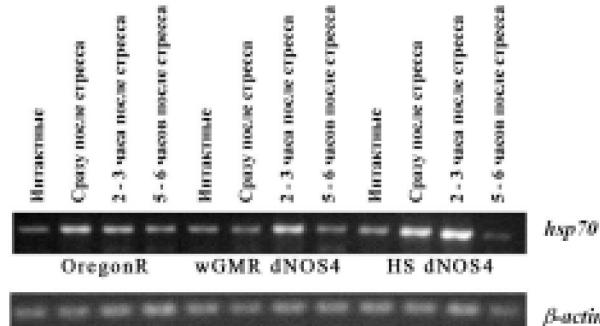


Рис. 2. Электрофорерограмма продуктов амплификации гена *hsp70*

Результаты Вестерн-блот анализа также свидетельствуют о резком повышении уровня белка Hsp70 сразу после теплового стресса во всех исследуемых линиях (рис. 3). Однако полученные нами данные свидетельствуют о том, что в личинках, не подвергавшихся тепловому стрессу, экспрессируется мРНК, кодирующая белок теплового шока Hsp70, в то время как появление белкового продукта в данных образцах не выявлено.

Согласно данным *J. Velazquez* и др. у *Drosophila* в нормальном развитии экспрессии белка Hsp70 не обнаружено, однако мРНК, хоть и в небольших количествах, но присутствовала в клетках при нормальной для организма температуре [9]. Так, например, Лозовская Е. Р. и др.

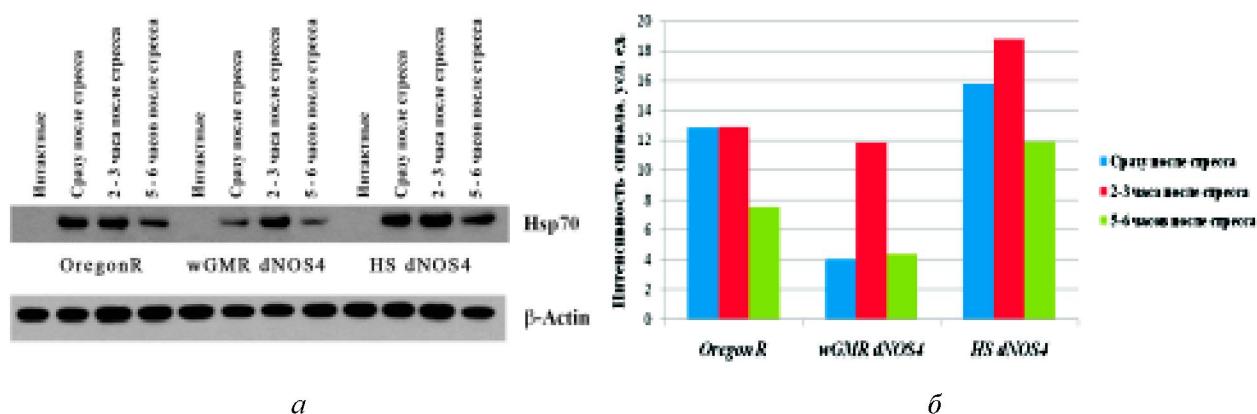


Рис. 3. Полуколичественный анализ содержания белка Hsp70 в личинках *Drosophila*:
а – Вестерн-блот анализ; б – данные сканирования блота

сообщают, что в ответ на тепловой шок в разных клетках дрозофилы транскрибируются одинаковые РНК и часть этих транскриптов в небольших количествах присутствует и в контрольных клетках, не подвергавшихся тепловой обработке. Предполагают, что во время теплового шока интенсивно транскрибируются как мРНК, кодирующие Hsp70, так и РНК, не участвующие в трансляции белка теплового шока [10]. Многие авторы сходятся во мнении, что синтез белков теплового шока, а именно Hsp70 и Hsp64 в разных клетках *Drosophila* может регулироваться независимо на всех уровнях от транскрипционного до посттрансляционного с использованием различных механизмов [11, 12].

По сведениям *E. Schmitt* и др. в отличие от белка Hsp90, который обильно экспрессируется в клетках в конститутивной форме, экспрессия белков Hsp70 и Hsp27 стимулируется различными видами стресса и при нормальных условиях в разных организмах либо вовсе отсутствует, либо происходит на низком уровне [13]. Следует от-

метить, что образование Hsp70 у *Drosophila* при нормальной температуре оказывает ингибирующее воздействие на клеточное деление и рост [14].

Для изучения влияния теплового шока и оксида азота на экспрессию апоптоз-регулирующих генов *hid* и *grim* в личинках *D. melanogaster* мы провели ПЦР-амплификацию на основе кДНК с использованием специфических праймеров к данным генам. Как видно на рис. 4, экспрессия ключевых апоптоз-регулирующих генов *hid* и *grim* обнаружена в интактных образцах всех исследуемых линий. Это свидетельствует о запуске программы апоптоза, связанного с метаморфозом личинок и является естественным процессом на данной стадии развития *Drosophila*. К тому же известно, что в отличие от апоптоз-регулирующего гена *grim*, экспрессия гена *hid* происходит постоянно, т.е. не только в клетках, вступивших на путь апоптоза, но и в нормально-функционирующих клетках [8].

В то же время в образцах, подвергшихся тепловому шоку, выявляется заметная разница

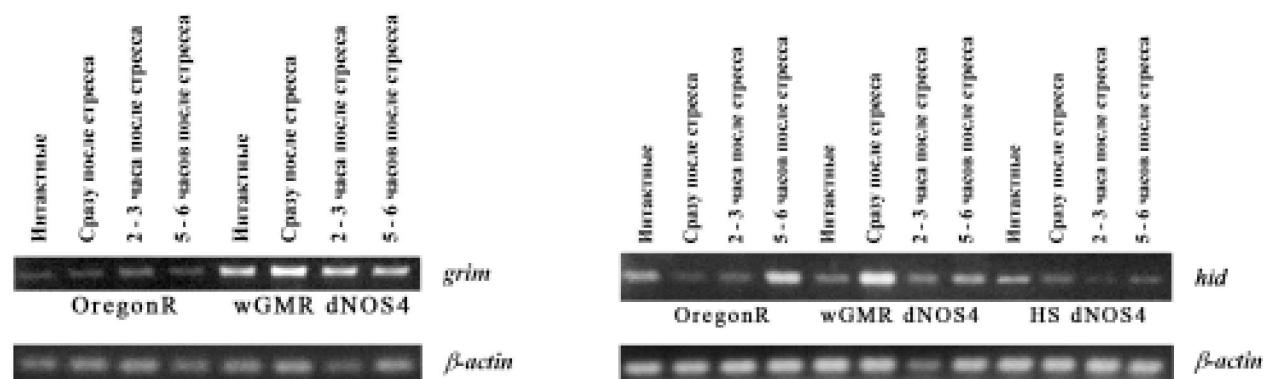


Рис. 4. Электрофорограмма продуктов амплификации апоптоз-регулирующих генов *grim* и *hid*

между контрольной линией и опытными линиями, выступающими в роли ингибиторов оксида азота. Видно, что в дикой линии *Oregon R* сразу после теплового шока уровень экспрессии апоптоз-регулирующих генов начинает падать, а через 2–3 часа слегка повышается и через 5–6 часов достигает уровня нормы (рис. 4).

В трансгенной же линии *wGMR dNOS4*, наоборот, сразу после теплового шока наблюдается резкое повышение экспрессии генов *hid* и *grim*, а затем вновь уровень экспрессии снижается практически до исходного (рис. 4).

Исследования, проведенные на другой трансгенной линии, также выступающей в роли ингибитора оксида азота – *HS dNOS4* – показывают иной результат. Во-первых, в данной линии не обнаружено экспрессии исследуемого фрагмента апоптоз-регулирующего гена *grim*. Во-вторых, картина экспрессии гена *hid* в данной линии представлена иначе, чем в линии *wGMR dNOS4*: видно, что сразу после теплового шока уровень экспрессии данного гена начинает падать, подобно тому, как это происходит в контрольной линии *Oregon R*. Однако через 2–3 часа уровень экспрессии гена *hid* сильно снижается и начинает повышаться только через 5–6 часов после теплового шока (рис. 4).

Как было отмечено ранее, разница между двумя трансгенными линиями, несущими дополнительные копии гена *dNOS4*, заключается в использованных для создания трансгенной конструкции промоторах. Очевидно, что тепловой стресс приводит к торможению работы GMR-промотора. Это является причиной снижения экспрессии *dNOS4*-трансгена и соответственно уменьшению ингибиторного эффекта на продукцию NO. В отличие от GMR-промотора, промотор HS в линии *HS dNOS4*, наоборот, включается с при тепловом шоке и запускает экспрессию *dNOS4*-трансгена. Это приводит к накоплению его белковых продуктов *dNOS4*-трансгена – усеченных полипептидов, которые образуют гетеродимеры, связываясь с полноразмерными пептидами DNOS1. Гетеродимерная форма не функциональна в отношении продукции NO, образование гетеродимеров снижает количество функциональных NOS-ферментов, в результате чего выработка оксида азота резко снижается.

Мы наблюдаем, что в линии *wGMR dNOS4* при нормальной температуре *dNOS4*-трансген

экспрессируется на высоком уровне, а также наблюдается средняя экспрессия апоптоз-регулирующих генов *hid* и *grim*. Но сразу после теплового шока отмечается резкое снижение экспрессии гена *dNOS4* и резкое усиление экспрессии генов *hid* и *grim*, что свидетельствует об усилении интенсивности апоптоза вопреки повышенному уровню экспрессии гена *hsp70*, имеющего антиапоптотическое действие. Затем через 2–3 часа после индукции теплового шока экспрессия гена *hsp70* и его продукта белка теплового шока Hsp70 достигала высокого пика, экспрессия *dNO4* гена слегка повышалась, что свидетельствовало о постепенном накоплении усеченных полипептидов DNOS4 и снижении выработки оксида азота. Результатом этих событий может быть затухание процессов апоптоза, что объясняется наблюдаемым нами снижением экспрессии генов *hid* и *grim*.

В трансгенной линии *HS dNOS4* экспрессия трансгена *dNOS4* и гена *hsp70* повышалась спустя 2–3 часа после теплового шока. В этот же отрезок времени мы наблюдали снижение экспрессии апоптоз-регулирующего гена *hid*. Отсутствие экспрессии другого регулятора апоптоза – гена *grim* может быть связано с возможной мутацией в данном гене именно у исследуемой трансгенной линии. Однако, как известно, для реализации программируемой клеточной гибели у *Drosophila* достаточно активной экспрессии хотя бы одного из трех ключевых апоптоз-индуцирующих генов (*hid*, *grim*, *reaper*). Из литературных данных известно, что у *Drosophila* характер экспрессии гена *grim* подобен характеру экспрессии другого гена – *rpr*. В то же время продукты данных генов функционируют независимо друг от друга, и клеточная гибель с участием активности Grim, не требует дополнительной экспрессии *Rpr* и наоборот [8, 15]. Но до сих пор о регуляции и работе гена *grim* мало известно в отличие, например, от двух других ключевых апоптоз-регулирующих генов *Drosophila* – *rpr* и *hid*.

Ранее нами получено доказательство того, что повышенный уровень оксида азота может стимулировать экспрессию гена *grim* [16]. В данной работе показано, что понижение уровня выработки оксида азота ведет к снижению экспрессии генов-регуляторов апоптоза *hid* и *grim*.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что уровень эндогенного NO, являющегося продуктом синтазы оксида

азота, может быть важным регулятором активности основных индуцирующих апоптоз генов – *hid* и *grim* у *Drosophila*. Причем, по видимому, в отношении регуляции апоптотических процессов оксид азота вступает в конкурирующие взаимоотношения с Hsp70 и способен подавлять его антиапоптотическое действие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kornbluth S., White K. Apoptosis in drosophila: neither fish nor fowl (nor man, nor worm) // J. of Cell Science. 2005. V. 118. P. 1779-1787.
2. 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.
3. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. М.: ИД Медпрактика-М, 2004. 180 с.
4. Kim P. K., Zamora R., Petrosko P., Billiar T. R. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis // Int. Immunopharmacol. 2001. V. 1. P. 1421-1441.
5. Stasiv Y., Kuzin B., Regulski M., Tully T., Enikolopov G. Regulation of multimers via truncated isoforms: a novel mechanism to control nitric-oxide signaling // Genes & Dev. 2004. V. 18. P. 1812-1823.
6. Arya R., Mallik M., Lakhota S. C. Heat shock genes – integrating cell survival and death // J. Biosci. 2007. V. 32. P. 595-610.
7. Хлебодарова Т.М. Как клетки защищаются от стресса? // Генетика. 2002. Т. 38, № 4. С. 437-452.
8. 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.
9. Velazquez J., Sonoda S., Bugaisky G., Lindquist S. Is the major Drosophila heat shock protein present in cells that have not been heat shocked? // J. Cell Biol. 1983. V. 96. P. 286-290.
10. Лозовская Е.Р., Левин А.В., Евгеньев М.Б. Тепловой шок у дрозофилы и регуляция активности генома // Генетика. 1982. Т. 18, № 11. С. 1749-1762.
11. Morimoto R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators // Genes Dev. 1998. V. 12. P. 3788-3796.
12. Lakhotia S. C., Srivastava P., Prasantha 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, № 4. P. 347-356.
13. 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.
14. 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.
15. Justin V., McCarthy, Vishva M. Apoptosis Induced by Drosophila Reaper and Grim in a Human System // The journal of biological chemistry. 1998. V. 273, № 37. P. 24009-24015.
16. Khussainova E., Bulentayeva Z., Bekmanov B., Djansugurova 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, № 3. P. 194-199.

Резюме

Drosophila melanogaster шыбынында апоптоз процесін реттеуші *hid* және *grim* гендерінің экспрессиясы мен азот төткіры синтаза ферментінің байланысы жылу шоғына еректесі зерттелді.

Summary

In the current study we investigated the relationship between the expression of apoptosis-regulating genes *hid* and *grim* in *Drosophila melanogaster* and nitric oxide synthase in response to heat shock.