

АКТИВИРОВАНИЕ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ JAK/STAT В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК S2 *Drosophila melanogaster*

© 2013 г. А. В. Шапошников*, А. С. Крындушкин, Ю. В. Николенко, В. В. Панов,
Е. Н. Набирочкина, Л. А. Лебедева, Ю. В. Шидловский

Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334

Поступила в редакцию 26.12.2012 г.

Принята к печати 18.01.2013 г.

Сигнальный путь JAK/STAT играет важную роль в различных процессах онтогенеза у высших эукариот. Удобной модельной системой для изучения этого пути является плодовая мушка дрозофила, в которой основные компоненты пути представлены уникальными факторами. В работе описано использование культуры клеток S2 *Drosophila melanogaster* для изучения активации генов-мишеней указанного пути. Нами показано, что в клетках S2 содержится большое количество белка STAT, который при обработке клеток перванатом перемещается в ядро. Под действием перваната белок вместе с другими факторами транскрипции привлекается на регуляторные последовательности генов-мишеней и активирует их транскрипцию.

Ключевые слова: сигнальные пути, JAK/STAT, иммунопреципитация хроматина, культура клеток S2, эукариоты.

ACTIVATION OF JAK/STAT SIGNALING PATHWAY IN S2 *Drosophila melanogaster* CELL CULTURE, by A. V. Shaposhnikov*, A. S. Kryndushkin, J. V. Nikolenko, V. V. Panov, E. N. Nabirochkina, L. A. Lebedeva, Y. V. Shidlovskii (Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia; *e-mail: shaldr23@mail.ru). JAK/STAT signaling pathway plays a critical role in different ontogenesis processes of higher eukaryotes. Fruit fly *Drosophila* is a handy model system used to study this pathway since major components of the pathway are represented by unique factors. This article describes the usage of *Drosophila melanogaster* S2 cells in studies of the pathway's target genes activation. We showed that S2 cells contain plenty of STAT protein which migrates into nucleus under cells treatment with pervanadate. Then we demonstrated that under pervanadate action STAT protein along with other transcription factors is recruited onto regulatory sequences of target genes and activates their transcription.

Keywords: signaling pathways, JAK/STAT, chromatin immunoprecipitation, cell culture S2, eukaryotes.

DOI: 10.7868/S0026898413030142

У всех многоклеточных животных сигнальный путь JAK/STAT консервативен и представляет собой относительно простой каскад реакций [1]. Находящиеся на поверхности клетки рецепторы при связывании лиганда димеризуются и активируют ассоциированные с рецептором молекулы JAK-киназы, которые, в свою очередь, автофосфорилируются (что повышает их каталитическую активность), а также фосфорилируют субъединицы рецептора по остаткам тирозина. На конечном

этапе происходит фосфорилирование основной мишени пути – транскрипционных факторов STAT по консервативному остатку тирозина. Фосфорилированные факторы также образуют димеры и транспортируются в ядро, где они запускают транскрипцию генов-мишеней, связываясь со специфическими последовательностями в геноме (рис. 1).

В клетках многих высших эукариот на каждом этапе сигнального пути задействовано целое се-

Принятые сокращения: JAK (Janus Kinase) – семейство ассоциированных с рецепторами киназ; MO (Moira) – фактор, входящий в состав хроматин-ремоделирующего комплекса Brahma; S2 (Schneider 2 cells) – культура клеток *Drosophila melanogaster*; STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) – активатор транскрипции, участвующий в передаче сигнала; TAF1 (Transcription Activation Factor 1) – субъединица общего фактора транскрипции TFIID; TBP (TATA-Binding Protein) – TATA-связывающий белок; субъединица фактора TFIID. TFIID (Transcription Factor II D) – общий фактор транскрипции.

* Эл. почта: shaldr23@mail.ru

мейство факторов. Например, у млекопитающих известно четыре киназы JAK и семь различных молекул STAT, но у некоторых эукариот, например, у дрозофилы, основные участники представлены единичными и уникальными факторами: рецептором является белок Domeless (DOME), JAK-киназе соответствует белок Hopscotch (HOP), транскрипционному фактору – STAT92E [3]. Более простая система, характерная для дрозофилы, делает ее более удобным объектом для изучения указанного сигнального пути.

В организме дрозофилы JAK/STAT-путь активируется далеко не во всех клетках [2], что создает дополнительные сложности в работах, требующих значительного количества биологического материала. Поэтому более целесообразно для исследования этого сигнального пути использовать культуру клеток дрозофилы. Одна из таких культур – эмбриональная линия клеток Schneider (S2), относящаяся к клеткам гемопоэтического ряда [4].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа с культурой клеток S2. Клеточную линию *Drosophila* Schneider cell line 2 (S2) выращивали при температуре 25°C в специальной среде для этих клеток (“Sigma”, США), содержащей 10% FBS (“HyClone”, США). Для активирования клеток готовили свежий 10мМ раствор перваната, получаемый при смешении раствора ортованата натрия до конечной концентрации 10 мМ и перекиси водорода – до 20 мМ. Раствор перваната затем обрабатывали каталазой (200 мкг/мл) для удаления избытка перекиси.

Антитела к белкам STAT, ТВР [6], TAF1 [6], MOR [7] и РНК-полимеразе II [8] получали при иммунизации кроликов [5]. Антитела к β-тубулину (получены М. Климовски (M Klumkowsky)) и к ламину Dm0 (получены А. Фишером (A. Fisher)) приобретены в Developmental Studies Hybridoma Bank (США).

Выделение РНК и количественная ПЦР. Тотальную клеточную РНК выделяли при помощи тризола (“Invitrogen”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для количественной ПЦР использовали ранее опубликованные наборы праймеров [5].

Окрашивание клеток проводили по методике, описанной ранее [6].

Иммунопреципитацию хроматина проводили, как описано ранее [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание фактора STAT в клетках S2

Ранее показано, что гены, кодирующие компоненты пути (гены рецептора *dome*, киназы *hop* и

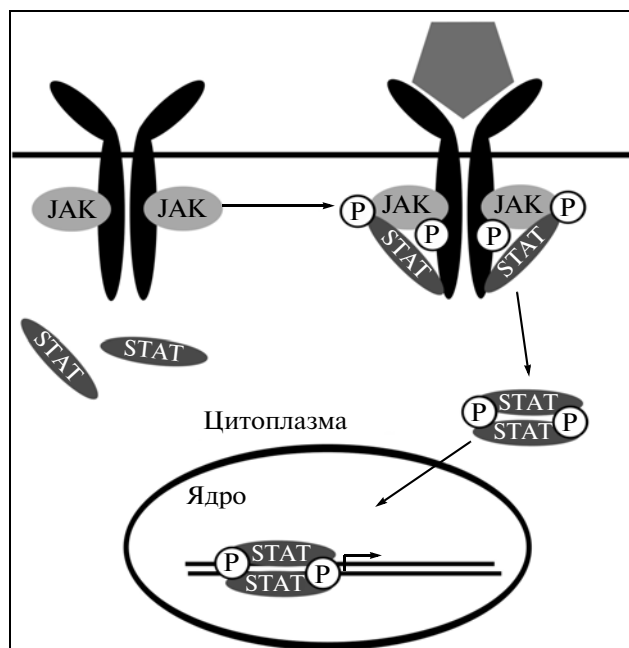


Рис. 1. Схема активации сигнального пути JAK/STAT у дрозофилы [2].

транскрипционного фактора *stat*), экспрессируются в клетках S2 [10]. Мы подтвердили эти данные, определяя белок STAT в клетках при помощи вестерн-блот анализа (рис. 2). В клеточном лизате детектируется белок STAT, идентичный по подвижности белку STAT тканей эмбрионов дрозофилы. Сравнение содержания STAT, β-тубулина и TATA-связывающего белка ТВР в клеточном лизате S2 и в общем белковом экстракте эмбрионов позволяет сделать вывод, что относительный уровень STAT в клетках очень высок и превышает относительный уровень в общем эмбриональном экстракте, несмотря на то, что именно на стадии

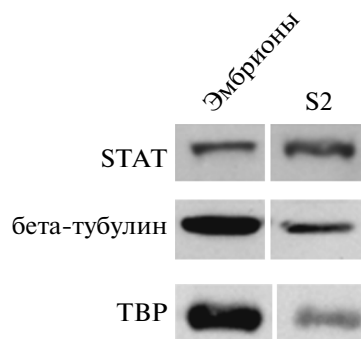


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ содержания фактора STAT и контрольных белков в общем белковом экстракте эмбрионов дрозофилы и лизате клеток S2.

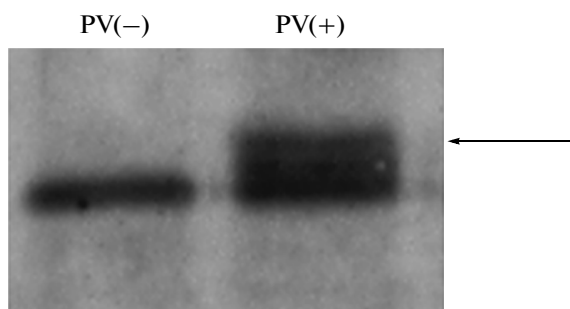


Рис. 3. Вестерн-блот-анализ белка STAT в суммарных лизатах клеток S2 до обработки перванадатом (PV(-)) и после обработки (PV(+)). Стрелкой показано положение фосфорилированной формы STAT.

развития эмбриона наблюдается один из основных пиков активности гена *stat* [11].

Фосфорилирование STAT при обработке клеток S2 перванадатом

Транскрипционная активность белка STAT путем его фосфорилирования по остатку тирозина может быть стимулирована перванадатом [12, 13]. Обработка клеток этим реагентом приводит к увеличению доли белка-STAT, фосфорилированного по остатку тирозина [13], причем при низких концентрациях перванадата (50–100 мкМ) увеличения общего уровня фосфорилирования тирозина в клетке не происходит [14]. Вестерн-блот анализ показал, что при обработке клеток перванадатом в концентрации 100 мкМ (2 ч) накапливается белок STAT с меньшей подвижностью (рис. 3), который, по литературным данным [13], соответствует его фосфорилированной форме.

Перенос STAT в ядро при обработке клеток S2 перванадатом

При активации сигнального пути фосфорилированная форма STAT направляется в ядро, где запускает транскрипцию соответствующих генов-мишеней. Мы изучили распределение в клетке белка STAT до и после обработки клеток перванадатом (100 мкМ, 2 ч). До обработки белок обнаруживается и в ядре, и в цитоплазме, причем — в сравнимых количествах. Обработка перванадатом приводит к заметному накоплению STAT в ядре, что может свидетельствовать об активировании сигнального пути (рис. 4).

В ядре клеток может быть локализована как фосфорилированная форма STAT (благодаря наличию эндогенной киназной активности НОР в клетках), так и нефосфорилированная форма, выполняющая специфические функции в поддержании структуры гетерохроматина [12]. Для доказательства того, что после обработки перванадатом белок проявляет специфическую транскрипционную активность, требуется измерение уровня экспрессии его генов-мишеней.

Подбор нормировочных генов для измерения уровня экспрессии генов-мишеней JAK/STAT-пути

Для измерения уровня экспрессии генов-мишеней сигнального пути необходимо выбрать нормировочные гены, активность которых не изменяется при обработке перванадатом. Мы определяли уровень экспрессии генов актина 5С, гистона H1, *ras2* при различных концентрациях перванадата (100, 300 и 500 мкМ) в зависимости от времени обработки (2, 4, 6 ч). Уровень экспрессии первых двух генов не изменяется по отношению к общему количеству РНК, а уровень экспрессии *ras2* непосто-

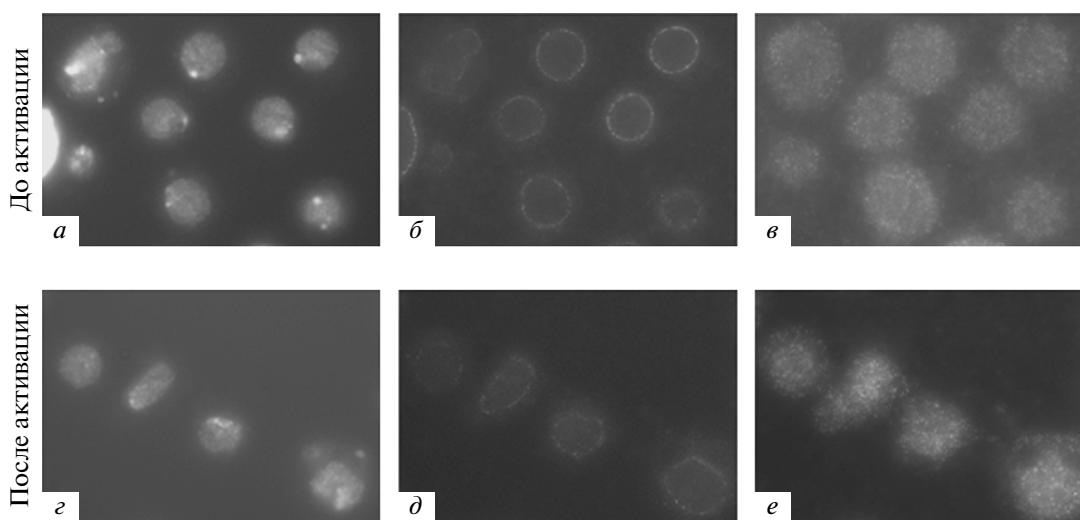


Рис. 4. Микроскопия клеток S2 до и после обработки перванадатом. Окрашивание ядра красителем DAPI (а, е), ядерной оболочки антителами к ламину (б, д) и антителами к STAT (в, е).

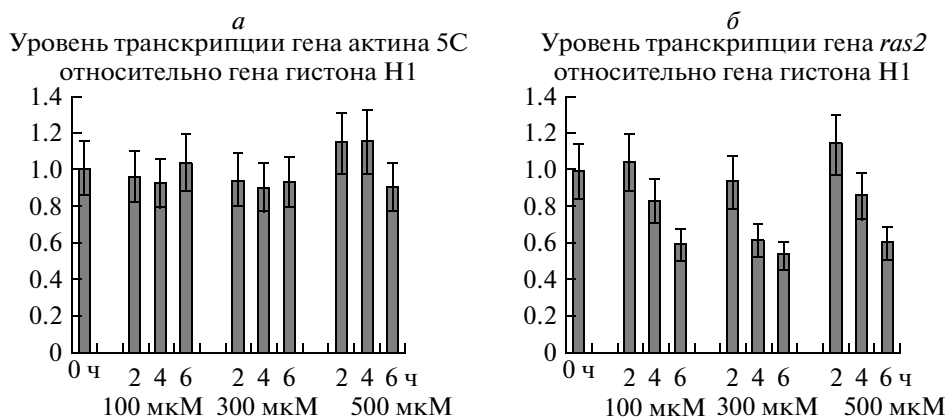


Рис. 5. Уровень экспрессии нормировочных генов друг относительно друга в присутствии перванадата. Количество транскриптов измеряли при помощи количественной ПЦР и затем рассчитывали их соотношение. *a* – Соотношение уровня транскрипции генов актина 5С и гистона Н1; *б* – генов *ras2* и гистона Н1. За единицу принято соотношение в клетках до обработки (точка 0 ч).

янен (данные не приведены). Подсчет соотношения активности генов актина 5С, гистона Н1 и *ras2* показал, что уровень экспрессии первых двух стабилен друг относительно друга при обработке перванадатом, в то время как уровень *ras2* значительно изменяется (рис. 5). Можно сделать вывод, что гены актина 5С и гистона Н1 подходят для нормировки в изучаемой системе. В дальнейшей работе в качестве нормирующего использовали уровень экспрессии гена актина 5С.

изменяется активность генов *mog* и *Taf1*, продукты которых участвуют в активации транскрипции. Белок MOR входит в состав основного хроматин-ремоделирующего Brahma-комплекса [22], а TAF1 является субъединицей общего фактора транскрипции TFIID [23]. Можно сделать вывод, что наблюдаемая активация STAT-зависимых генов специфична и определяется эндогенным белком STAT, который фосфорилируется после обработки перванадатом.

Оптимальные условия активирования JAK/STAT-пути

Далее подбирали оптимальные условия для активирования JAK/STAT-пути. Определяя его активность, мы измеряли уровень транскрипции одного из основных генов-мишеней данного пути – гена *socs36E* [15]. Варьировали концентрацию перванадата (100, 300 и 500 мкМ) и время инкубации (0.5, 1 и 2 ч) (рис. 6). Во избежание вторичных эффектов при активации сигнального пути, которые могли бы повлиять на результаты, инкубацию более 2 ч не проводили. Анализ активности гена *socs36E* показал, что оптимум активации JAK/STAT-пути достигается при обработке перванадатом в концентрации 100 мкМ в течение 2 ч.

Специфическое активирование JAK/STAT-пути при обработке клеток перванадатом

Мы определяли, изменяется ли активность нескольких STAT-зависимых [16–21] генов при обработке клеток перванадатом в концентрации 100 мкМ в течение 2 ч (рис. 7). Действительно, экспрессия большинства изучавшихся генов возрастает в несколько раз, при том что активность самого гена *stat* не изменяется. Также не

Привлечение факторов транскрипции на промоторы STAT-зависимых генов при обработке клеток перванадатом

Для подтверждения того, что STAT-зависимые гены взаимодействуют с фактором STAT и другими факторами транскрипции, поставлены опыты

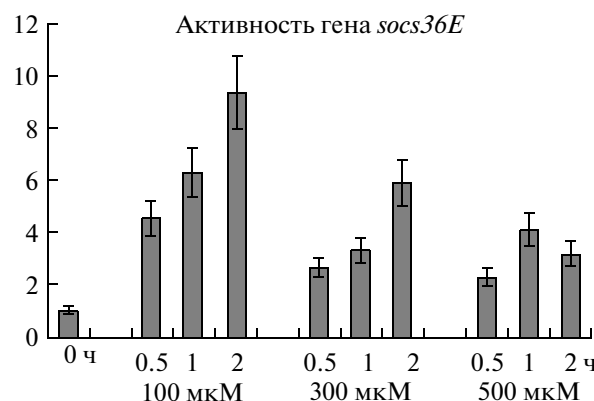


Рис. 6. Анализ активности гена-мишени JAK/STAT-пути *socs36E* при разных условиях обработки клеток S2 перванадатом. Нормировка – на уровень транскрипции гена актина 5С; за единицу принята активность гена в клетках до обработки (точка 0 ч).

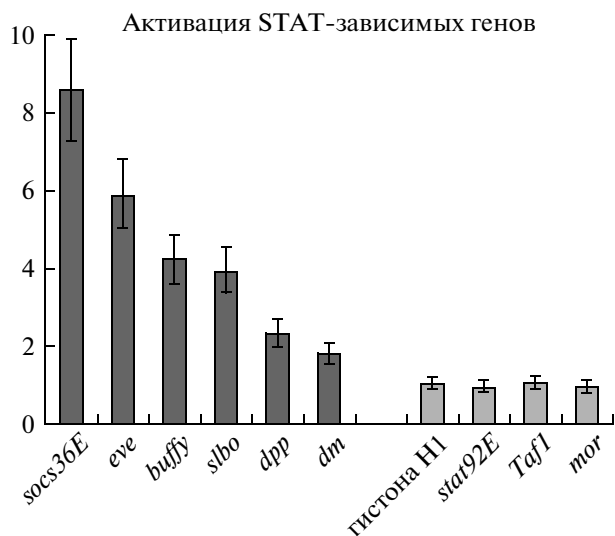


Рис. 7. Изменение активности STAT-зависимых (темные столбцы) и STAT-независимых (светлые столбцы) генов. Дано соотношение активности генов после и до обработки перванатом.

по иммунопреципитации хроматина. Фоновый уровень оценивали по количеству осажденной рибосомной ДНК (рис. 8). Содержание фактора STAT, РНК-полимеразы II, а также белков MOR и TAF1, значительно увеличивается на промоторах

генов после обработки перванатом в концентрации 100 мкМ в течение 30 мин. На промоторах контрольного гена актина 5С белок STAT не детектируется ни до, ни после обработки перванатом. Не наблюдается также увеличения количества РНК-полимеразы II, белков MOR и TAF1 на этом гене. Это свидетельствует о специфичности наблюдаемых эффектов.

Приведенные данные подтверждают вывод, что в клетках S2 присутствуют компоненты JAK/STAT-пути, которые создают определенный уровень активности соответствующих генов-мишеней. При обработке перванатом в концентрации 100 мкМ наблюдается дополнительная специфическая стимуляция STAT-зависимых генов, что может оказаться полезным при изучении молекулярных механизмов активации указанного сигнального пути в клетках.

Работа получила финансовую поддержку Программы президиума Российской академии наук "Молекулярная и клеточная биология", а также Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение 8052) и Российского фонда фундаментальных исследований (13-04-00368).

В работе использовали оборудование ЦКП ИБГ РАН при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.552.11.7067).

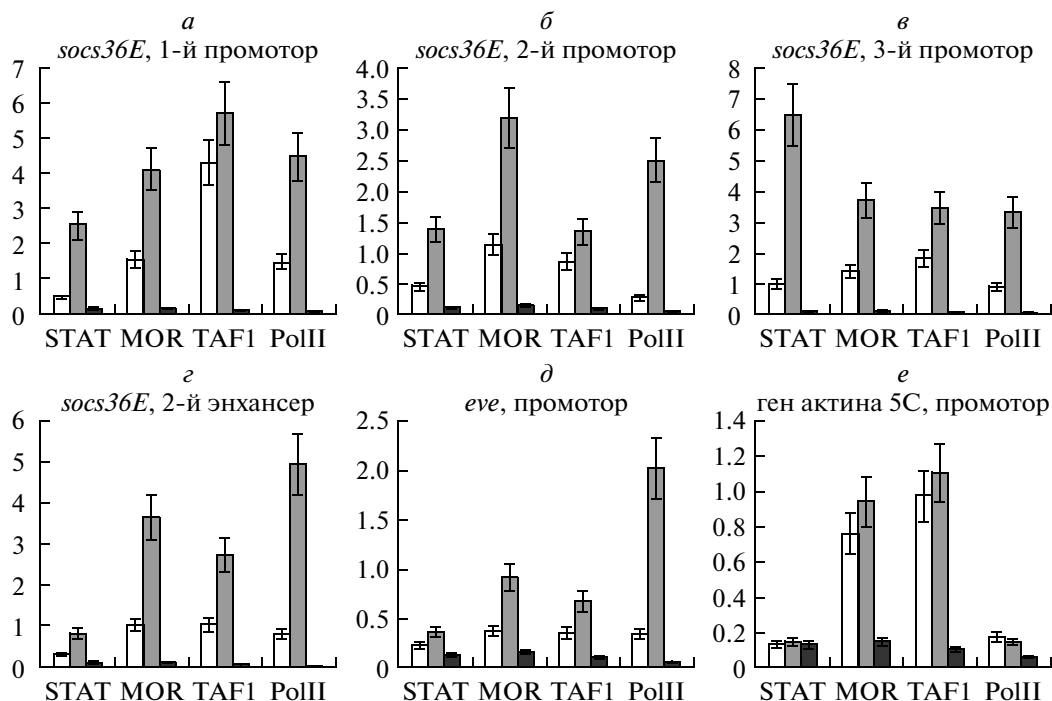


Рис. 8. Анализ взаимодействия факторов транскрипции с промоторными областями генов *socs36E* (а–г – первый и второй промоторы, а также первый и второй энхансеры гена), *eve* (д), актина 5С (е). Иммунопреципитация хроматина, дана доля (в %) исходного материала. Белые столбцы иллюстрируют привлечение факторов в клетках до активации; светло-серые – после активации; темно-серые – фоновый уровень на рибосомной ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kisseleva T., Bhattacharya S., Braunstein J., Schindler C.W. 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. **285**, 1–24.
2. Arbouzova N.I., Zeidler M.P. 2006. JAK/STAT signaling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development*. **133**, 2605–2616.
3. Levy D.E., Darnell J.E., Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 651–662.
4. Cherbas L., Willingham A., Zhang D., Yang L., et al. 2011. The transcriptional diversity of 25 *Drosophila* cell lines. *Genome Res.* **21**, 301–314.
5. Panov V.V., Kuzmina J.L., Doronin S.A., Kopantseva M.R., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Vorobyeva N.E., Shidlovskii Y.V. 2012. Transcription co-activator SAYP mediates the action of STAT activator. *Nucl. Acids Res.* **40**, 2445–2453.
6. Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Nikolenko J.V., Kuzmina J.L., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. 2009. Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIID into a single supercomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 11049–11054.
7. Kal A.J., Mahmoudi T., Zak N.B., Verrijzer C.P. 2000. The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev.* **14**, 1058–1071.
8. Georgieva S., Kirschner D.B., Jagla T., et al. 2000. Two novel *Drosophila* TAF(II)s have homology with human TAF(II)30 and are differentially regulated during development. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1639–1648.
9. Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., Gurskiy D.Y., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Shidlovskii Y.V., Georgieva, S.G. 2010. Multifunctional factor ENY2 is associated with the THO complex and promotes its recruitment onto nascent mRNA. *Genes Dev.* **24**, 86–96.
10. McQuilton P., St Pierre S.E., Thurmond J. 2012. FlyBase 101—the basics of navigating FlyBase. *Nucl. Acids Res.* **40**, D706–714.
11. Daines B., Wang H., Wang L., Li Y., et al. 2011. The *Drosophila melanogaster* transcriptome by paired-end RNA sequencing. *Genome Res.* **21**, 315–324.
12. Shi S., Larson K., Guo D., Lim S.J., Dutta P., Yan S.J., Li W.X. 2008. *Drosophila* STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. *Nat. Cell. Biol.* **10**, 489–496.
13. Sweitzer S.M., Calvo S., Kraus M.H., Finbloom D.S., Lerner A.C. 1995. Characterization of a Stat-like DNA binding activity in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **270**, 16510–16513.
14. Park J., Liu A.Y. 2000. Pervanadate induces the hyperphosphorylation but not the activation of human heat shock factor 1. *J. Cell. Physiol.* **185**, 348–357.
15. Baeg G.H., Zhou R., Perrimon N. 2005. Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in *Drosophila*. *Genes Dev.* **19**, 1861–1870.
16. Weber-Nordt R.M., Egen C., Wehinger J., Ludwig W., Gouilleux-Gruart V., Mertelsmann R., Finke J. 1996. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*. **88**, 809–816.
17. Starz-Gaiano M., Melani M., Meinhardt H., Montell D. 2009. Interpretation of the UPD/JAK/STAT morphogen gradient in *Drosophila* follicle cells. *Cell Cycle*. **8**, 2917–2925.
18. Karsten P., Hader S., Zeidler M.P. 2002. Cloning and expression of *Drosophila* SOCS36E and its potential regulation by the JAK/STAT pathway. *Mech. Dev.* **117**, 343–346.
19. Harrison D.A., McCoon P.E., Binari R., Gilman M., Perrimon N. 1998. *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev.* **12**, 3252–3263.
20. Lopez-Onieva L., Fernandez-Minan A., Gonzalez-Reyes A. 2008. Jak/Stat signalling in niche support cells regulates dpp transcription to control germline stem cell maintenance in the *Drosophila* ovary. *Development*. **135**, 533–540.
21. Reed J.C., Nowell P.C., Hoover R.G. 1985. Regulation of c-myc mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 4221–4224.
22. Nakamura K., Ida H., Yamaguchi M. 2008. Transcriptional regulation of the *Drosophila moira* and *osa* genes by the DREF pathway. *Nucl. Acids Res.* **36**, 3905–3915.
23. Metcalf C.E., Wassarman D.A. 2006. DNA binding properties of TAF1 isoforms with two AT-hooks. *J. Biol. Chem.* **281**, 30015–30023.