

УДК 575.1/2: 577.1/2

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА АЗОТА НА ЭКСПРЕССИЮ АПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ И HSP70 У ДРОЗОФИЛЫ

© 2011 г. Л. Б. Джансугурова

Институт общей генетики и цитологии
050060 Алматы, пр. аль-Фараби, д. 75А
E-mail: leylad@mail.ru

Поступила в редакцию 20.08.2010 г.
Окончательный вариант получен 10.12.2010 г.

Данные об участии оксида азота в апоптозе противоречивы. Баланс между анти- и проапоптотическим действием оксида азота зависит от многих факторов, включая его концентрацию в ткани и взаимодействие с другими регуляторами апоптоза. В работе представлены результаты серии экспериментов по изучению влияния доноров и ингибиторов оксида азота, *dNOS1*- и *dNOS4*-трансгенов на апоптоз *Lobe^{RSV}*-мутантных линий дрозофилы и дикой линии *Oregon R*. Выявлено, что высокое содержание в клетках оксида азота способно подавлять антиапоптотическое действие HSP70 и стимулировать апоптоз, возможно через *grim*-опосредованный путь. Причем длительное воздействие высокой концентрации оксида азота в течение всего развития более эффективно сказывается на стимуляции проапоптотических генов, чем кратковременное действие этого агента.

Ключевые слова: оксид азота, апоптоз, тепловой шок, дрозофила

Изучение мессенджерных молекул, опосредующих огромное многообразие клеточных сигналов и регулирующих физиологические и патологические процессы, привлекает на сегодняшний день пристальное внимание исследователей во всем мире. В этой связи особый интерес вызывает уникальная сигнальная молекула оксид азота (NO). Оксид азота – двухатомный свободный радикал, содержащий неспаренный электрон с очень коротким периодом полураспада (2–10 сек). Уникальность оксида азота заключается в том, что, в отличие от других известных на сегодняшний день сигнальных молекул, NO, благодаря чрезвычайно малому размеру, обладает способностью легко диффундировать сквозь клеточные мембраны и свободно проникать в межклеточное пространство сквозь плотные клеточные слои, действуя на соседние мишени. NO не только опосредует клеточные сигналы, но и является составной частью внутриклеточных эффекторных систем.

Оксид азота эндогенно вырабатывается в клетках с помощью фермента синтазы оксида азота (NOS), катализирующего образование NO и L-цитруллина из L-аргинина. К настоящему времени у млекопитающих идентифицированы 3 изоформы NOS, каждая из которых кодируется собственным геном, и различающихся по клеточной специфичности и механизмам регуляции: нейрональная, эндотелиальная и макрофагальная NOS. У дрозофилы NOS ген кодирует 10 различных транскриптов, которые могут образовывать, по

крайней мере, 7 протеинов, только один из которых (DNOS1) в димерной форме ферментативно активен (Stasiv et al., 2004; Кузин и Слезингер, 2005).

Диапазон проявлений биологической активности NO огромен. Известно, что оксид азота регулирует тонус гладкой мускулатуры сосудов, бронхов, пищеварительной, мочеполовой и других систем. Передача нервных импульсов осуществляется с помощью NO. Предполагается, что NO является медиатором функции памяти и болевой рецепции. Широко обсуждается участие этой сигнальной молекулы в механизмах иммунной защиты. У *Drosophila* оксид азота принимает участие в развитии зрительной системы, в регуляции иммунитета и поведения, в осморегуляции и регуляции клеточного цикла и процессов дифференцировки в период раннего эмбриогенеза и метаморфоза (Kuzin et al., 1996; Кузин и Слезингер, 2005, 2009).

Данные об участии оксида азота в апоптозе противоречивы. Баланс между анти- и проапоптотическим действием оксида азота зависит от многих факторов, включая его концентрацию в ткани и взаимодействие с другими регуляторами апоптоза (Kim et al., 2001).

Реализация апоптоза у *Drosophila melanogaster* требует активности действующих в комплексе специфических генов: *rpr*, *hid* и *grim* (Song et al., 2000; Kim et al., 2001; Richardson and Kumar, 2002). Существуют также данные, что эти гены способны ин-

дуцировать апоптоз самостоятельно, независимо транскрибируясь под действием различных апоптоз-индуцирующих стимулов (Bangs et al., 2000). Достаточно много аспектов функционирования этих генов и белок-белковых взаимодействий с другими компонентами апоптозного механизма остаются неясными. Особенно далека от разрешения роль гена *grim*.

Во многих работах показано участие белка теплового шока (Hsp70) в регуляции апоптоза (Sreedhar and Csermely, 2004; Beere, 2005; Arya et al., 2007). Семейство Hsp70 высококонсервативно, разнообразно и включает как конститутивные, так и стресс-индуцибельные формы. Накапливающиеся данные позволяют предположить, что белки теплового шока каким-то образом блокируют пути активации апоптоза и стабилизируют клеточные структуры или взаимодействуют с антиапоптотическими белками, усиливая их эффект. Несмотря на убедительные доказательства антиапоптотической роли белков теплового шока, точные механизмы супрессии апоптоза с их помощью пока не ясны. Кроме того, известно, что суперэкспрессия Hsp70 может определяться действием оксида азота (Bangs et al., 2000).

В настоящей работе предпринята попытка выяснить характер действия оксида азота на апоптоз и определить возможное участие в этом взаимодействии белка теплового шока Hsp70.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования служили следующие линии мух *Drosophila melanogaster*:

1) *Oregon R* – дикая линия;

2) *Df(Lobe)* – *Bl Df(2R)/L^{+R48}/CyO* – делеция по локусу *Lobe*;

3) Серия онковирус-индуцированных аллельных мутаций по локусу *Lobe* (2-72.0) (Габитова и др., 1991; Nabirochkin et al., 1998):

– *L^{R,RSV(Er)}* – доминантный аллель; фасеточное поле редуцировано на 80–95%, у 10% мух дублированы вибриссы. Пенетрантность 100% (25°C);

– *L^{R,RSV(Fes)}* – доминантный аллель; фасеточное поле редуцировано на 5–10%; у 10% мух дублированы вибриссы. Пенетрантность 100% (25°C);

– *L^{R,RSV(ad)}* – рецессивный аллель; фасеточное поле редуцировано на 15–20%; у 30–90% мух дублированы антенны; у 70–80% – вибриссы. Пенетрантность 81% (25°C);

– *L^{R,RSV(fem)}* – рецессивный аллель; фасеточное поле редуцировано на 5–10%; у 70–80% мух дублированы вибриссы. Пенетрантность 60% (25°C).

4) Трансгенные линии, содержащие дополнительные копии кДНК *DNOS* гена (линии были любезно предоставлены Б.А. Кузиным):

HS dNOS1 – содержит в X-хромосоме копию кДНК *DNOS* под HS-промотором, транскрибирующуюся в полноразмерный функциональный транскрипт, маркирована мутациями *u* и *w^a*;

– *HS dNOS4* – в III хромосоме несет копию кДНК *DNOS* под HS-промотором, транскрибирующуюся в усеченный, нефункциональный транскрипт, маркирована мутациями *u* и *w^a*;

– *HS dNOS1 Flag* – содержит в X-хромосоме Flag-вектор с кДНК *DNOS* под HS-промотором, транскрибирующуюся в полноразмерный функциональный транскрипт, маркирована мутациями *u* и *w^a*;

– *wGMR dNOS4; sp/CyO; Sb/TM3* – содержит в X-хромосоме копию кДНК *DNOS* под GMR-промотором, транскрибирующуюся в усеченный, нефункциональный транскрипт, маркирована мутациями *Su* и *Sb*.

Мух содержали на стандартной питательной среде при 25°C.

Синхронизация культур. Для получения синхронизированных кладок эмбрионов за день до сбора половозрелых самок отсаживали от самцов для сброса яиц. На второй день самок скрещивали с самцами и 1 час выдерживали на голоде для стимуляции спаривания. После чего мух помещали в специальные стаканчики, съемное дно которых заполнено питательной средой, обогащенной дрожжами и агар-агаром, поверхность корма предварительно смазывали винным уксусом. Далее кисточкой собирали синхронизированные 2-часовые кладки эмбрионов. Для получения культур личинок эмбрионы помещали в термостат на 25°C. Личинок выращивали до III-го возраста (96 часов развития).

Обработка донорами и ингибиторами оксида азота. В работе использовали 0.001 М концентрации растворов доноров (*S-nitroso-N-acetyl-penicillamine* (SNAP) и *lipopolysaccharide* (LPS)) и ингибиторов (*N^o-nitro-L-arginine* (LNNA) и *S-methyl-L-tiocitrulline-acetate* (Ltc)) оксида азота.

Для морфологического анализа проводили микроинъекции растворов доноров (SNAP и LPS) и ингибиторов (LNNA и Ltc) оксида азота в область развивающихся глазо-антенных дисков синхронизированных культур личинок дрозофилы III-го возраста (96 ч развития). Для микроинъекций использовали ручной микроманипулятор *FemtoJet* (Eppendorf, Germany). Количество инъецированного материала – 1 µl.

Для цитогенетического анализа применяли 5-минутную обработку изолированных слюнных желез указанными растворами данных веществ.

Для иммуноцитохимического анализа личинок III-го возраста в течение 5-ти мин обрабатывали растворами доноров и ингибиторов NO, после полчасовой инкубации в физиологическом раство-

ре (1xPBS) личинок фиксировали, далее готовили гистологические препараты.

Индукция теплового шока. Индукцию теплового шока проводили помещением пробирок, содержащих культуры личинок, в водяной термостат при 37°C на 1 ч. После чего отбирали личинок в следующих временных интервалах: непосредственно после теплового шока, 5, 20, 30 мин, 2–3 и 5–6 ч после индукции теплового шока.

Приготовление постоянных препаратов поли-*tenных хромосом.* Слюнные железы выделяли из личинок III-го возраста (96 ч развития) в физиологическом растворе PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7.0). Железы помещали в каплю 45%-ной уксусной кислоты и готовили давленный препарат, накрыв покровным стеклом. Приготовленный препарат помещали в камеру с жидким азотом на 20 мин, после чего покровное стекло скалывали лезвием. Для удаления остатков уксусной кислоты проводили обезвоживание препарата в 2-х сменах 96% этанола в течение 15 мин. Препарат сушили на воздухе и окрашивали 2% раствором ацетоорсеина в течение 5 мин. Препараты анализировали при помощи микроскопа *Leica DM LB* в проходящем свете при увеличениях 10 × 40 и 10 × 100.

Приготовление гистологических препаратов. Гистологические препараты готовили по стандартной методике с небольшими модификациями. Личинок III-го возраста фиксировали раствором Буэна в течение 1–3 сут. После фиксации объекты отмывали от фиксатора в 70% этаноле в течение 1 сут. Затем проводили обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации, выдерживали в смеси 100% спирта и хлороформа (1 : 1) и в чистом хлороформе. Парафинизацию проводили с предварительной проводкой объектов через хлороформно-парафиновую кашу (37°C) и две смены парафина (56°C). Заливку в парафин проводили на часовом стекле, смазанном глицерином. Готовили срезы толщиной 5–7 микрон.

Иммуногистохимический анализ. Иммуногистохимию проводили на неокрашенных гистологических препаратах с использованием моноклональных антител (anti iNOS, anti dHSP70), полученных С.Г. Георгиевой и Б.А. Кузиным в Институте биологии гена РАН (г. Москва, Россия). Методика Roche Molecular Biochemicals (kit: Cat.No. 1089153 Immunotech) была модифицирована для использования гистологических препаратов дрозофилы. После депарафинизации в двух сменах ксилола денатурацию осуществляли путем кипячения стекол в цитратном буфере (Citric acid 0.1 M, Sodium citrate 0.1 M) в течение 4 мин под давлением с использованием микроволновой печи при мощности 750 Вт. Далее стекла споласкивали в растворе 1xTBS (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5). Препараты фиксировали ацетоном при 20°C в

течение 10 мин. Отмывали в растворе TBSTB (TBSx1, BSA 1%, Tween 20 0.1%) в течение 15 мин, 25°C. Первичное антитело anti iNOS наносили в разведении 1 : 500, anti dHSP70 – в разведении 1 : 2000 (согласно протоколам производителя антител – лаборатории нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена РАН). Для ровного распределения антитела и во избежание его испарения предметное стекло накрывали покровным и закрывали парафильмом (PARAFILM “M”, LABORATORY FILM, American National CanTM, Chicago, IL. 60631), после чего проводили инкубацию во влажной камере при 25°C в течение 2 ч. Образцы отмывали в TBSTB 2 раза по 10 мин. В качестве вторичного антитела использовали ассоциированные с пероксидазой хрена биотинизированный крысиный IgG1 (разведение 1 : 1000, Immunotech, France) для anti iNOS, и мышиный IgG1 (разведение 1 : 1000, Immunotech, France) для anti dHSP70. Инкубацию проводили при 25°C в течение 1 ч во влажной камере. Визуализацию связывания антител осуществляли при помощи DAB-реакции. Для этого на каждое стекло наносили водные растворы DAB (Diaminobenzidine 0.7 mg/ml и H₂O₂/Urea 0.6 mg/ml), инкубировали 10 мин. После реакции насыщения реакцию останавливали ополаскиванием образцов в TBSTB. Окрашивание препаратов осуществляли по методу Романовского-Гимза, после чего заключали в Tris-glycerol mountant (глицерин 90%, Tris HCl pH 8.0 0.1 M). Препараты анализировали при помощи микроскопа *Leica DM LB* в проходящем свете при увеличениях 10 × 10, 10 × 20, 10 × 40, 10 × 63 и 10 × 100.

Определение апоптоза методом прижизненной окраски акридин-оранжевым. Выделение органов и имагинальных дисков из личинок и куколок проводили под бинокляром на предметном стекле в капле фосфатного физиологического буфера PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7.0). Выделенные органы помещали на чистое предметное стекло, окрашивали акридин-оранжевым красителем в концентрации 5 мкг/мл (pH 7.2) в течение 5 мин и осторожно (без раздавливания) покрывали предметным стеклом. Препараты анализировали под флуоресцентным микроскопом в области зеленого, λ = 530–570 нм, и красного свечения, λ = 620–750 нм. Были использованы фильтры green N 2.1 (Illumination path – BP 515-560, Dichronic mirror (reflector) – 580, Observation path – LP 590) и blue N 1.3 (Illumination path – BP 450-490, Dichronic mirror (reflector) – 510, Observation path – LP 515).

Определение апоптоза TUNEL-методом. Для TUNEL-метода использовали неокрашенные гистологические препараты личинок III-го возраста. Гистологические препараты депарафинизировали в двух сменах ксилола, регидратацию осуществляли последовательной проводкой по спиртам пони-

жающейся концентрации. Далее препараты обрабатывали протеиназой К. Инактивацию эндогенных пероксидаз проводили 3% раствором перекиси водорода в метаноле. Для мечения ДНК-фрагментов использовали набор реактивов “The TdT FragEL™ kit” (Sigma, США), с использованием меченых биотином dNTP и Klenow-фрагмента DNA-polymerase I. Детекцию проводили при помощи стрептавидин-пероксидазного конъюгата и диаминобензидина в качестве субстрата. В качестве позитивного и негативного контроля использовали HL60 клетки промиелоцитной лейкемии и HL60 клетки, инкубированные с 0.5 µg/ml актиномицином в течение 19 ч для индукции апоптоза. После дополнительной окраски 2% красителем Гимза в течение 5 мин препараты анализировали при помощи микроскопа Leica DM LB в проходящем свете при увеличениях 10 × 10, 10 × 20, 10 × 40, 10 × 63 и 10 × 100.

Выделение РНК и синтез кДНК. Экстракцию мРНК осуществляли из личинок III-го возраста с использованием RNA STAT-60 набора реагентов (Tel-Test Inc., TX, USA) согласно протоколу компании-производителя. Концентрации РНК определяли спектрофотометрически ($\lambda = 260, 280$ и 320 нм). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов компании Sileks (Россия) согласно инструкциям производителя. Реакция осуществлялась в 25 µl реакционной смеси, содержащей 2 µg тотальной мРНК.

RT-PCR analysis. Реакцию проводили в 20 µl реакционной смеси, содержащей по 0.3 µM каждого праймера и 0.5 µl кДНК. Условия ПЦР: 1) для *hsp 70* гена (s 5'-CTG CGA GTC GTT GAA GTA CG-3' и as 5'-TCG GTA TTG ATC TGG GAA CC-3'): 94°C – 2 мин 30 сек, далее 35 циклов: 94°C – 45 сек, 56°C – 45 сек, 72°C – 1 мин. Реакцию останавливали при 72°C в течение 10 мин; 2) для *dNOS1* гена (s 5'-TTG TTG TGG CCT CCA CCT TT-3' и as 5'-CAA TCC ATG CTC GGA AGA CTC-3'): 94°C – 2 мин, далее 40 циклов: 94°C – 15 сек, 60°C – 1 мин. Реакцию останавливали при 60°C в течение 30 сек; 3) для гена *grim* (s 5'-ATG AGG ACG ACG TTA CC-3' и as 5'-TTC TTG TTG CTG CGG TTG-3'): 95°C – 30 сек, 53°C – 30 сек, 72°C – 40 сек. Реакцию останавливали при 72°C в течение 7 мин. Амплификацию фрагментов гена β -actin (s 5'-CGT CGA CAA TGG ATC TGG AA-3' и as 5'-CGA CCA TCA CAC CCT GAT GA-3') применяли в качестве внутреннего контроля реакции. Для визуализации ПЦР продуктов использовали 2% агарозный гель.

Western-blot анализ. 20 µg белкового экстракта на основе гомогената ткани личинок III-го возраста в разделяли с помощью 8% SDS-PAGE геле-электрофореза при 100 V и 4°C. Осуществляли перенос полипептидов на PVDF мембрану (Immobilon™-P transfer membrane, Millipore Corporation) в течение 1.5 ч при 200 mA и 4°C. После бло-

кирования свободных мест связывания буфером А (5%-ное обезжиренное молоко, 10 mM Трис-НСl, pH 7.5; 100 mM NaCl и 0.1% Твин-20) в течение 1 ч при комнатной температуре блоты инкубировали с моноклональными антителами к индуцибельной синтазе окиси азота (iNOS) в разведении 1 : 250. Первичные антитела к HSP-70 (SantaCruz, CA, USA) использовали в разведении 1 : 4000. Связывание с первичными антителами выявляли путем инкубации блотов с мышиным иммуноглобулином IgG, меченым пероксидазой хрена. Проявление проводили с помощью реагентов для усиленной хемиллюминесценции согласно инструкции фирмы-производителя (Amersham International, UK).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания модельной системы изучения регуляции апоптоза у дрозофилы мы использовали серию онковирусиндуцированных аллельных мутантных линий *Lobe^{RSV}*, связанных с нарушениями развития глазо-антенных дисков. Как известно, при нормальном развитии во время метаморфоза не происходит апоптоза имагинальных дисков дрозофилы. Однако *Lobe^{RSV}*-мутанты имеют нарушения в развитии глазо-антенных дисков, связанные с редукцией числа фасеток глаза и дубликации некоторых головных структур. Определение роли апоптоза в формировании мутантного фенотипа у *Lobe*-аллелей *Drosophila melanogaster* показало, что в отличие от нормы у мутантов в ходе метаморфоза происходит апоптотическая гибель клеток в имагинальных глазо-антенных дисках. Причем интенсивность апоптоза коррелирует с числом фасеток у имаго: чем меньшее число фасеток характерно для взрослых особей данной линии, тем активнее протекает апоптоз в имагинальных дисках во время метаморфоза (Мить и др., 2004; Толебаева и др., 2009). Были изучены временные интервалы индукции апоптоза в глазо-антенных имагинальных дисках синхронизированных культур личинок и куколок мутантных аллелей локуса *Lobe* (таблица 1). Однако интенсивность апоптотических изменений на разных стадиях развития для этих мутаций носит индивидуальный характер. На рисунке 1 представлен глазо-антенный комплекс *Lobe^{r,RSV(ad)}*-мутанта. В качестве отрицательно контроля использовали личинок линии *Oregon R*, в качестве отрицательного – личинок линии с делецией по локусу *Lobe* – *BIDf* (*2R*)/*L^{+R48}/CyO*.

Таким образом, фенотипы мутантных аллелей *Lobe^{RSV}*-группы, выражающиеся в различной степени редукции фасеточного поля и дубликациях кутикулярных структур у имаго, могут служить хорошими маркерами апоптоза в глазо-антенных имагинальных дисках во время метаморфоза.

Таблица 1. Время возникновения апоптотических изменений в глазо-антенных дисках *Lobe^{RSV}*-аллелей дрозофилы

Линия мух	Часы развития							
	90–91	92–94	95	96–98	105–109	110	111–112	113–115
<i>L^{R,RSV(Er)}</i>	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>L^{R,RSV(Fes)}</i>	–	+	+	+	+	–	–	–
<i>L^{r,RSV(ad)}</i>	–	–	+	+	+	+	–	–
<i>L^{r,RSV(fem)}</i>	–	–	–	+	+	+	–	–
<i>BIDf(2R)/L^{+R48}/CyO</i>	–	–	–	–	+	+	+	–
<i>Oregon R</i>	–	–	–	–	–	–	–	–

Эксперименты по изучению влияния доноров (SNAP и LPS) и ингибиторов (LNNA и Ltc) NO, введенных в развивающиеся глазо-антенные диски с помощью метода микроинъекций, показали, что повышение концентрации NO ведет к усилению интенсивности апоптоза, а понижение синтеза эндогенной оксида азота ведет к супрессии апоптоза.

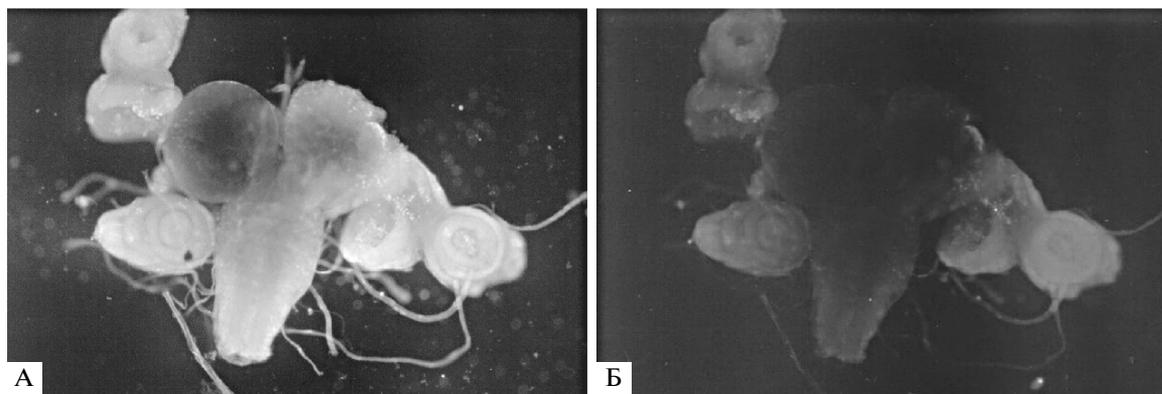
Повышение концентрации NO в развивающихся имагинальных дисках мутантов *Lobe^{RSV}*-группы ведет к уменьшению числа оптических фасеток вплоть до полной редукции глаза, недоразвитию головных структур, а также к гипотрофии грудных структур (рисунок 2).

Причем эффект LPS выражен сильнее, чем у SNAP. Липополисахариды являются известными сигналами, стимулирующими специфическую индукцию экспрессии гена *dNOS* в макрофагах. Нитрозосоединение SNAP при попадании в организм распадается с образованием большого количества окиси азота (Nagy et al., 2005). Надо отметить, что эффект SNAP является кратковременным, так как молекула NO живет всего около 5 сек. Действие

LPS будет более длительным, поскольку он стимулирует экспрессию *dNOS* гена. Способностью NO легко диффундировать через плотные клеточные слои и распространяться через лимфу можно объяснить то, что фенотипические эффекты действия доноров проявляются не только на глазо-антенных структурах, но и на развитии других головных и грудных сегментов.

Мы считаем, что фенотипическое действие доноров NO на редукцию фасеток глаза происходит за счет усиления интенсивности апоптоза в глазо-антенных имагинальных дисках. Тот факт, что при использовании личинок дикой линии *Oregon R* (позитивный контроль) также происходит редукция фасеточного поля, свидетельствует о том, что NO способен индуцировать апоптоз *de novo*. Это же подтверждается гипотрофией других головных и грудных структур (ротовой аппарат, ноги, крылья, грудные сегменты) у *Lobe*-мутантов, особей *Oregon R* и *Df(Lobe)*.

Анализируя фенотипы имаго в результате применения ингибиторов фермента синтазы оксида азота (LNNA и Ltc), можно сделать вывод, что понижение синтеза эндогенного NO имеет противо-

**Рис. 1.** Прижизненная окраска акридин-оранжевым красителем глазо-антенного комплекса личинок III-го возраста *Lobe^{r,RSV(ad)}*-мутанта. А – фильтр blue N 1.3; Б – фильтр green N 2.1.

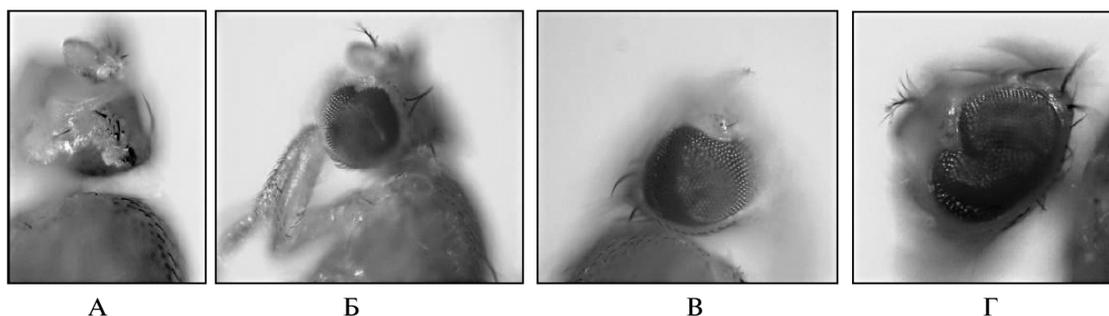


Рис. 2. Действие доноров NO на фенотипы *Lobe^{RSV}*-мутантов. А – *L^{R,RSV(Er)}* – полная редукция глаза, действие LPS; Б – *L^{R,RSV(Fes)}* – 5% редукция глаза, ротовой аппарат редуцирован, недоразвитие ног, действие LPS; В – *L^{r,RSV(fem)}* – 5% редукция глаза, кутикулярный вырост, действие SNAP; Г – *L^{R,RSV(Fes)}* – 5% редукция глаза, кутикулярные выросты на месте вырезки, действие SNAP.

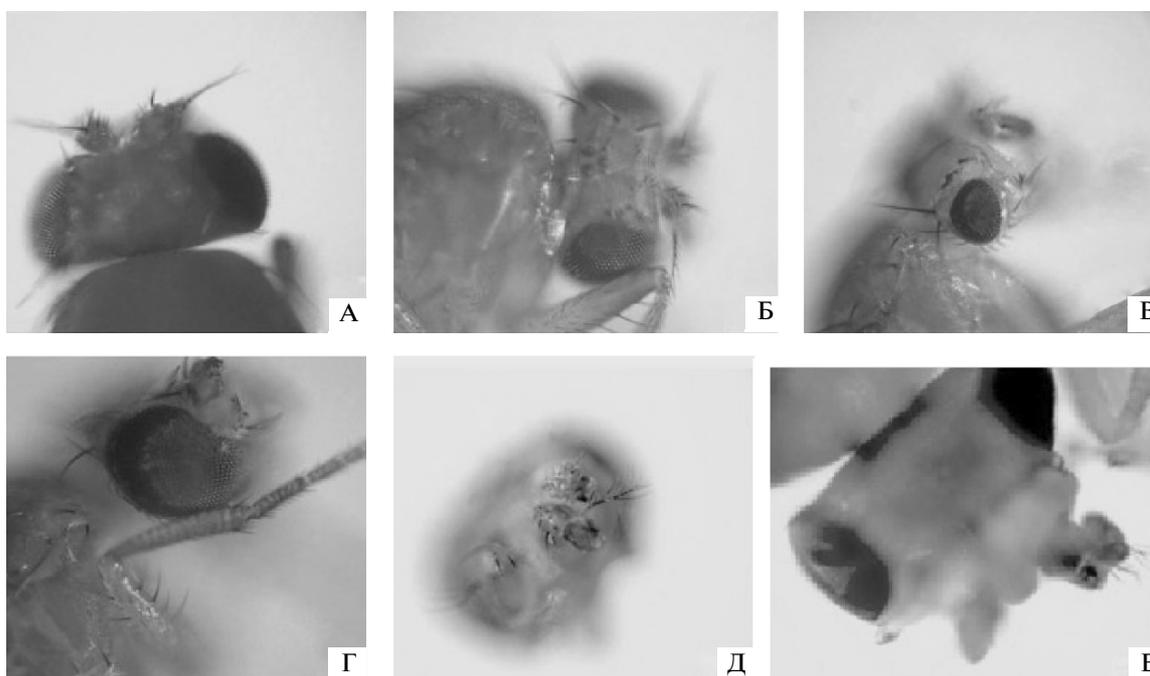


Рис. 3. Действие ингибиторов NO на фенотипы *Lobe^{RSV}*-мутантов. А – *Oregon R* – 5% гипертрофия правого глаза, действие L-тиоцитрулина, действие LNNA; Б – *Oregon R* – 2% гипертрофия глаза, гипертрофия ног; В – *L^{R,RSV(Er)}* – редукция числа фасеток глаза на 30% (вместо 95%), действие L-тиоцитрулина; Г – *L^{r,RSV(fem)}* – редукция 4–5% (вместо 40%), кутикулярный вырост, гипертрофия ног, действие L-тиоцитрулина; Д – *L^{r,RSV(ad)}* – дупликация антенн и увеличение их размеров, действие L-тиоцитрулина; Е – *L^{r,RSV(ad)}* – розетковидная антенна, действие LNNA.

положительный действию доноров NO эффект (рис. 3). Так, в случае мутантов локуса *Lobe* происходит увеличение числа фасеток глаза по сравнению с фенотипом каждого конкретного мутантного аллеля. Появление дупликаций антеннальных структур и кутикулярных выростов у *Lobe*-мутантов, гипертрофированных сегментов грудного щитка, крыльев и ног у *Lobe*-мутантов, а также в случаях позитивного (линия *Oregon R*) и негативного (линия *Df(L)*) контроля, вероятно, происходит за счет

угнетения процесса апоптоза в развивающихся имагинальных дисках.

Эффект действия доноров и ингибиторов NO на пролиферативные процессы был ранее отмечен Б. Кузиным с соавторами: ингибиторы NO стимулировали пролиферативные процессы в развивающихся имагинальных дисках, а доноры NO ускорили процесс дифференциации в имагинальных дисках. Авторы сделали вывод, что NO действует в качестве антипролиферативного агента в развитии дрозофилы, контролируя баланс между клеточной

пролиферацией и клеточной дифференцировкой (Kuzin et al., 1996). Возможно, нарушения развития глазо-антенного комплекса опосредованы взаимодействием NO с ретинобластомом (*Rb*) – зависимой регуляцией клеточного цикла (Kuzin et al., 2000).

Эксперименты с использованием трансгенных линий дрозофилы, несущих функциональные (*dNOS1*) и нефункциональные (*dNOS4*) копии *dNOS*-гена (Stasiv et al., 2004), показали сходный фенотипический эффект действия NO. *Lobe*-мутантов мы скрещивали с трансгенными линиями в обоих направлениях (прямое и обратное скрещивание), в качестве позитивного контроля использовали скрещивания трансгенных линий с мухами *Oregon R*, в качестве негативного – с мухами, несущими делецию по локусу *Lobe*. Развивающихся гибридных личинок F₁ и F₂ стрессировали при 37°C в течение 1 ч для стимуляции HS-промотора. Фенотипические изменения наблюдали у имаго.

dNOS1-трансген, кодирующий образование полноразмерного пептида, оказывал фенотипическое действие, ранее отмеченное нами после применения доноров NO: увеличение редукции числа фасеток глаза, недоразвитие головных и грудных структур. *dNOS4*-трансген, кодирующий образование усеченного полипептида, оказывал гипертрофическое действие на развитие глазных и грудных структур имаго: у всех мутантов *Lobe*^{RSV}-группы редукция глаза была выражена слабее, чем это характерно для проявления аллеля, в отдельных случаях восстанавливалось нормальное число фасеток глаза и были случаи гипертрофии до 105%.

Следует отметить, что регулирующий апоптоз эффект NO обнаружен нами только в тех органах, в развитии которых апоптоз был замечен ранее. Так, у использованных нами в качестве негативного контроля мутантов *Df(Lobe)* число фасеток глаза не изменялось, однако регистрировались крыловые и ножные изменения.

Наличие апоптозных изменений регистрировали TUNEL-методом. На рисунках 4 и 5 представлены данные использования TUNEL-метода для определения зон апоптоза при нормальном метаморфозе и при использовании доноров и ингибиторов NO.

Эксперименты по влиянию NO на изменение пуффинга политенных хромосом проводили на мухах дикого типа *Oregon R* как с использованием микроинъекций доноров и ингибиторов оксида азота, так и с использованием трансгенных линий – у гибридных личинок после индукции теплового шока.

Во всех вариантах эксперимента проведено картирование районов локализации про- и анти-апоптотических генов дрозофилы. В табл. 2 представлены сводные данные цитогенетического анализа. Поскольку для индукции экс-

прессии трансгена использовали температурную обработку, то определяли также характерный для теплового шока специфический пуффинг.

Установлено, что при действии донора оксида азота SNAP и *dNOS1*-трансгена определяется специфический пуффинг в районе локализации основных генов апоптоза дрозофилы *rpr*, *hid* и *grim* (3L, 75C-D), активируется экспрессия других индукторов апоптоза – генов *dmp53* (3R, 94D – пуф или междиск) и *dFadd* (3R, 94A1 – пуф), происходит инактивация работы ингибиторов апоптоза, генов *Diap1* (3L, 72D – пуф) и *dBcl* (2R, 42C – диск) (рис. 6). Активация генов, кодирующих инициаторы и эффекторы каспаз (*Strica*, *Damm*, *Dcp-1*, *Dronc*, *Decay*, *Drice*), свидетельствует о раннем начале апоптотических событий в линиях с повышенным содержанием оксида азота. Действие донора эндогенного оксида азота LPS на индукцию апоптоза было не столь очевидно.

При действии ингибиторов оксида азота и *dNOS4*-трансгена наблюдается эухроматизация в районе локализации антиапоптотического гена *Diap2* (2R, 52D – междиск), снижение экспрессии проапоптотического гена *dmp53* (3R, 94D – диск или междиск) и выключение работы гена *Dcp-1* (2R, 59E – диск), кодирующего эффектор каспаз (рис. 6). Вероятно, в линиях с пониженным содержанием оксида азота помимо общего механизма подавления апоптоза до наступления метаморфоза, связанного с ингибированием экдизонзависимого рецепторного пути апоптоза, действуют дополнительные факторы, сдерживающие запуск запрограммированной клеточной гибели. Следует отметить, что эффект *dNOS*-трансгенов был выражен сильнее действия доноров и ингибиторов NO. По-видимому, это связано с тем, что действие трансгенов более продолжительно.

Отмечено, что при действии доноров оксида азота наблюдается гетерохроматизация в районе локализации гена *hsp-70* (3R, 87C). По данным SDS-электрофореза белковых экстрактов слонных желез личинок, обработанных SNAP, наблюдается заметное снижение концентрации полипептидов с молекулярной массой 70 кДа (масса Hsp-70). Возможно, это является результатом снижения транскрипционной активности гена *hsp-70*.

Для наблюдения действия дополнительных копий *dNOS1*-гена в динамике (различное время после индукции теплового стресса) мы применили RT-PCR с использованием специфических праймеров к кДНК мРНК генов *dNOS1*, *hsp70* и *grim*. Было показано, что непосредственно после индукции теплового стресса дополнительные копии *dNOS1* гена в трансгенных линиях *HS dNOS1* и *HS dNOS1 Flag* экспрессируются на высоком уровне в течение 2–3 ч. Затем уровень экспрессии *dNOS1* уменьшается, но остается заметным вплоть до 5–6 ч после индукции стресса (рис. 7). Это под-

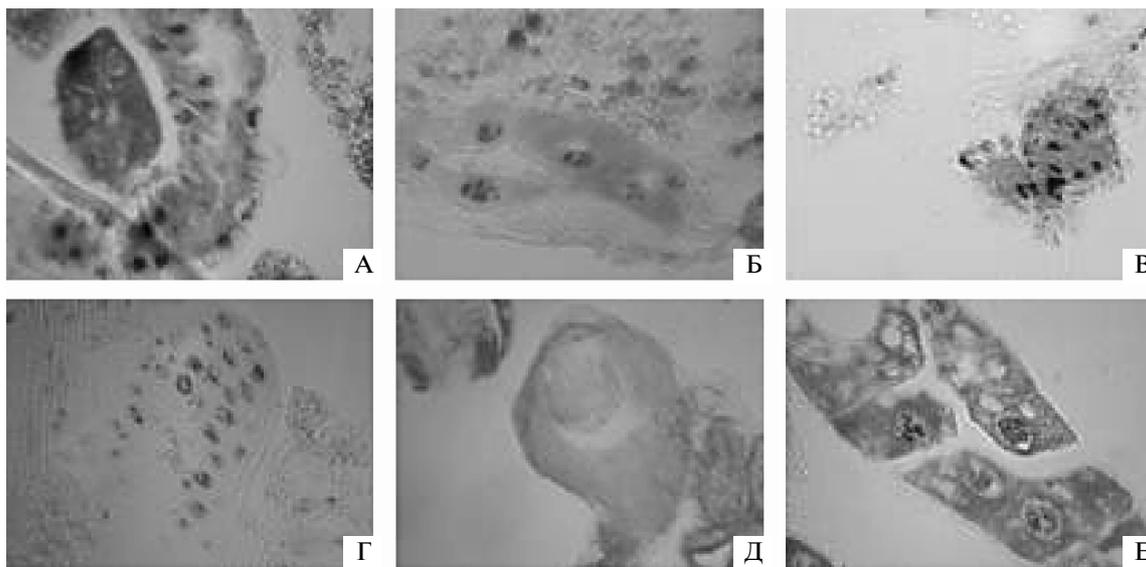


Рис. 4. Идентификация апоптоза TUNEL-методом при метаморфозе *Drosophila melanogaster* в норме. А – средний отдел кишечника, линия *Oregon R*, 10 × 40; Б – мальпигиевый сосуд, линия *Oregon R*, 10 × 40; В – жировое тело, линия *Oregon R*, 10 × 40; Г – слюнные железы, линия *Oregon R*, 10 × 40; Д – крыловой имагинальный диск, линия *Oregon R*, 10 × 40; Е – клетки пищевода на начальных стадиях апоптоза, линия *Oregon R*, 10 × 40.

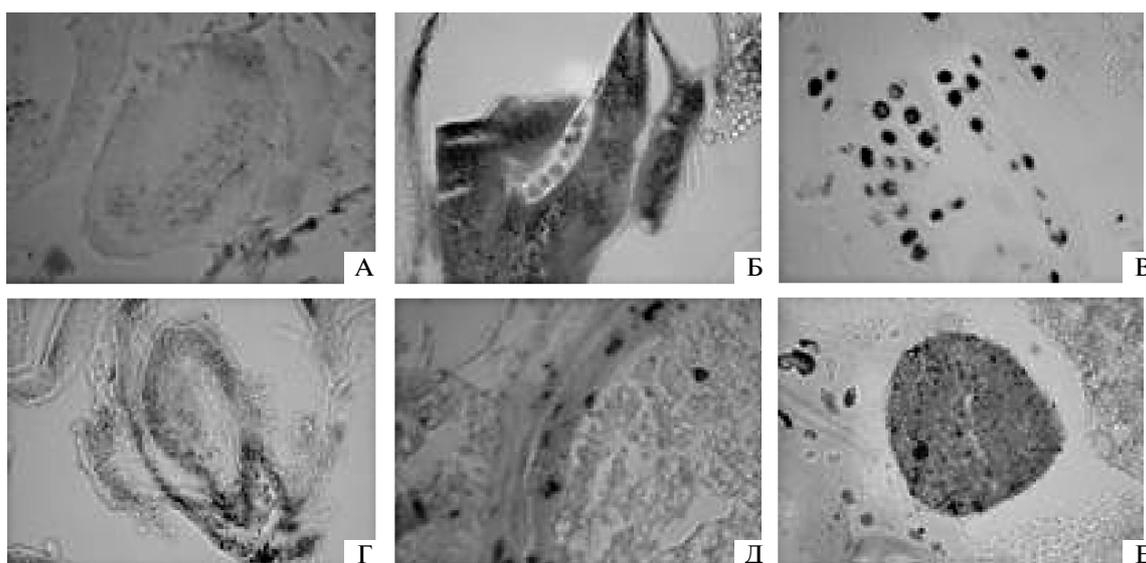


Рис. 5. Апоптоз при действии доноров и ингибиторов оксида азота. А – глазо-антенный диск, линия *Lobe^{RSV,ad}*, действие LPS, 10 × 63; Б – слюнные железы, линия *Lobe^{RSV,Er}*, действие LPS, 10 × 63; В – жировое тело, линия *Lobe^{RSV,fem}*, действие SNAP, 10 × 63; Г – крыловой диск, линия *Lobe^{RSV,Fes}*, действие SNAP, 10 × 63; Д – средний отдел кишечника, линия *Oregon R*, действие LNNA, 10 × 63; Е – глазо-антенный диск, линия *Lobe^{RSV,Er}*, действие Ltc, 10 × 40.

тверждается также иммуногистохимически (рис. 8): в интактном контроле DNOS белок определяется в небольшом количестве в покровных тканях, в линии *HS dNOS1* его много как в покровных тканях, так и в жировом теле, мальпигиевых сосудах, стенках кишечника.

RT-PCR с использованием специфических праймеров к кДНК мРНК *hsp70* гена также выяв-

ляет резкое увеличение экспрессии *hsp70* непосредственно после индукции теплового стресса, наблюдаемое как в линии *Oregon R*, так и в *dNOS1*-трансгенных линиях (рис. 9). Экспрессия *hsp70* гена остается на высоком уровне в течение 2–3 ч, значительное уменьшение экспрессии наблюдается по истечении 5–6 ч. Результаты RT-PCR подтверждаются Western-блот анализом (рис. 10) и

Таблица 2. Пуффинг в политенных хромосомах слюнных желез дрозофилы при действии оксида азота

Цитогенетическая локализация	Гены и кодируемые протеины	Контроль (линия Oregon R)	Действие доноров NO		Действие ингибиторов NO		Действие dNOS1 трансгена		Действие dNOS4 трансгена	
			SNAP	LPS	LNNA	Ltc	HS dNOS1	HS dNOS1 Flag	HSdNOS4	wGMR dNOS4; sp/CyO; Sb/TM3
X(1B)	Dredd – инициатор каспаз	МД	МД	МД	МД	МД	МД	МД	МД	МД
2L (32B)	dNOS – полипептид синтазы оксида азота	МД	П	МД	МД	МД	МД	МД	Д//МД	МД
2R (42A)	Strica(dream) – инициатор каспаз	Д//МД	Д	Д	Д	МД	МД	МД//П	МД//Д	МД//Д
2R (42C)	dVcl – белок митохондрией, ингибитор апоптоза	Д//МД	Д	П	МД	МД	МД	Д	Д//МД	МД//Д
2R (48C5)	Damm – эффектор каспаз	Д	Д	МД	Д	МД	Д	Д	Д	Д
2R (52D2)	Diar2 (Iar2) – ингибитор апоптоза	Д	Д	П	Д	МД	Д//МД	Д//МД	МД	МД
2R (59E3)	Der-1 – эффектор каспаз	МД	МД	П//МД	МД	МД	МД	П	Д//МД	Д
3L (67D2)	Drops (Nc) – инициатор каспаз	Д	МД	Д	Д	МД	МД	МД	Д	Д
3L (72D1)	Diar1 (Thread) – ингибитор апоптоза	П	Д	МД	П	МД	Д//МД	Д//МД	П	П
3L (75C1)	hid (winkled) – митохондриальный белок, проапоптотический белок	Д//МД	Д	Д	Д	МД	МД	МД	Д	Д
3L (75C4)	grim – проапоптотический белок	Д	МД	Д	МД	МД	П	П	Д	Д
3L (75C6)	grg (reager) – проапоптотический белок	Д	МД	Д	МД	МД	П	П	Д	Д
3R (89B18)	deacy – эффектор каспаз	Д//МД	МД	Д//МД	МД	МД	МД//П	МД//П	Д	Д
3R (94A1)	dFadd (BG4) – индуктор апоптоза	Д	МД	Д	МД	МД	П	П	Д	Д
3R (94D10)	Dmp53 – регулятор клет. цикла, активатор проапопт. генов	МД	МД//П	Д//МД	Д	Д	П	П	МД//Д	Д//МД
3R (99C1)	Dpice (Ice) – эффектор каспаз	Д	МД//П	Д	МД	МД	МД	МД	Д//МД	Д

Примечание: Д – диск; МД – междиск; П – пуф. Выделено и подчеркнуто значимое изменение экспрессии гена.

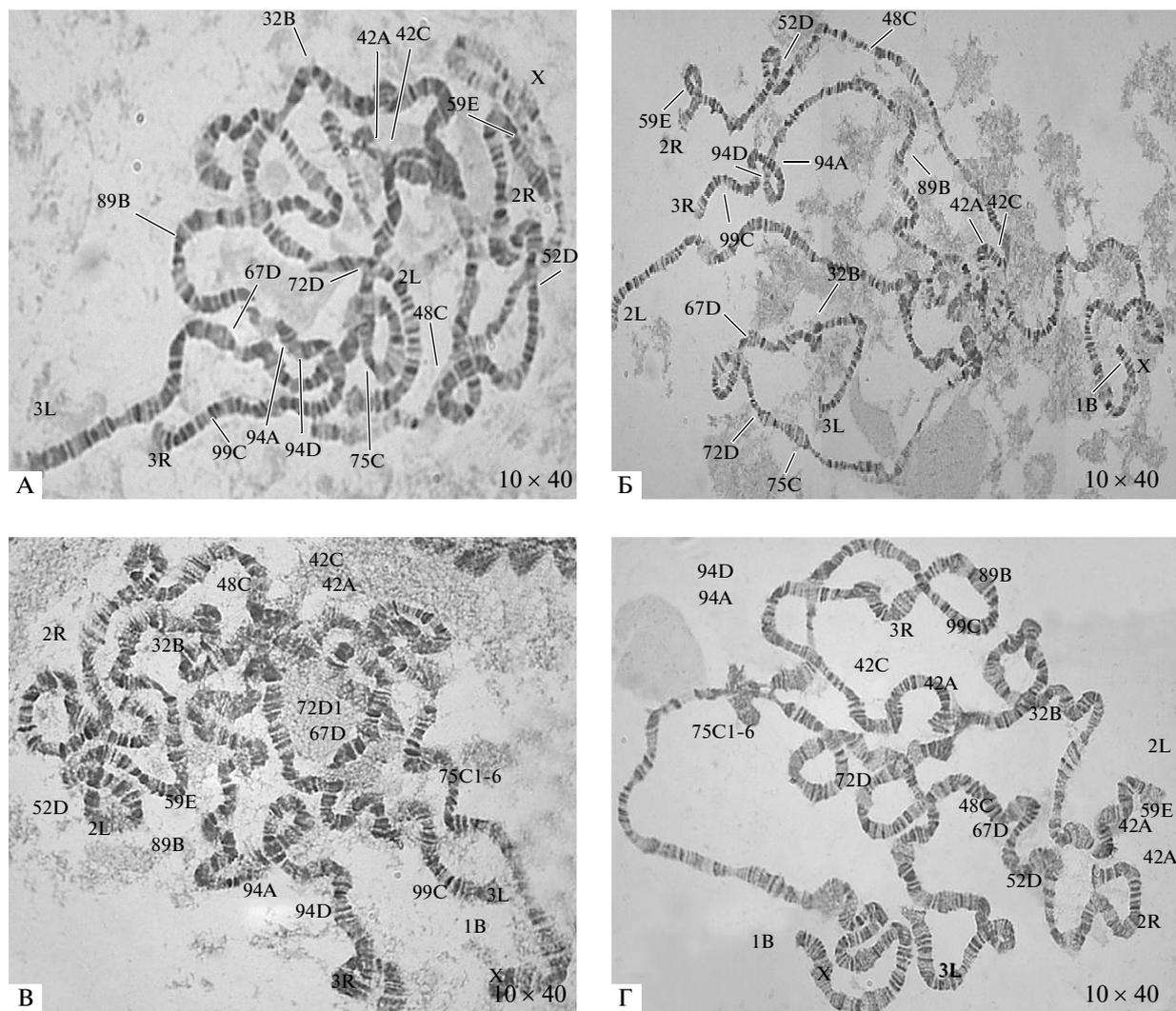


Рис. 6. Картирование районов локализации генов апоптоза в политенных хромосомах. А – интактные личинки *Oregon R*; Б – действие SNAP на личинки *Oregon R*; В – гибриды F₁ от скрещивания *Oregon R* × *HS dNOS1*; Г – гибриды F₁ от скрещивания *Oregon R* × *HS dNOS4*.

иммуногистохимией. Похоже, что экспрессия гена *hsp70* контролируется на уровне посттранскрипционной регуляции. Так, в линии *Oregon R* у интактных личинок отмечается наличие мРНК (рис. 9), однако белкового продукта не обнаружено (рис. 10).

Хорошо известно, что эктопическая экспрессия, по крайней мере, одного из ключевых регуляторов апоптоза (*rpr*, *hid* или *grim*) достаточна для запуска программы апоптоза. Активность каждого гена регулируется различными регуляторными сигналами. В то время как регуляция экспрессии *rpr* и *hid* активно изучалась при действии различных стимулов, о факторах регуляции экспрессии *grim* гена почти ничего не известно (Bangs et al., 2000).

RT-PCR-анализ с использованием специфических праймеров к кДНК мРНК *grim* (рис. 11) вы-

явил слабую экспрессию этого гена в интактной линии *Oregon R*, ассоциирующуюся с естественным началом метаморфоза. Непосредственно после индукции теплового шока уровень экспрессии *grim* в линии *Oregon R* не меняется, незначительное усиление сигнала наблюдается по прошествии 2–3 ч после стресса, которое возвращается к прежнему уровню через 5–6 ч. Однако наблюдается заметная разница в уровне экспрессии этого гена между контрольной линией и *dNOS1*-трансгенными линиями, продуцирующими большое количество NO после индукции стрессом HS-промотора трансгена. Так, непосредственно после индукции теплового шока наблюдается высокий уровень экспрессии гена *grim* в обеих использованных трансгенных линиях. В линии *HS dNOS1 Flag* по прошествии 2–3 ч *grim* экспрессируется слабее и

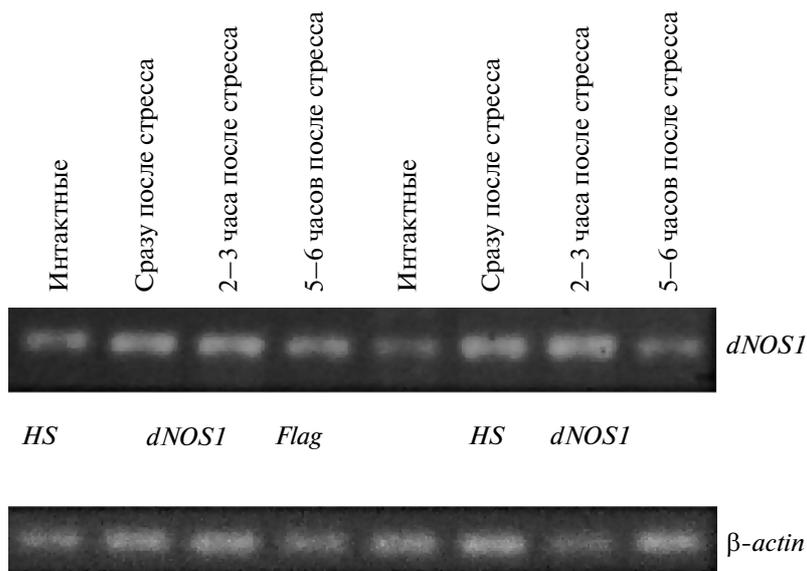


Рис. 7. Экспрессия мРНК *dNOS* у интактных и стрессированных личинок (37°C) *dNOS1*-трансгенных линий (RT-PCR).

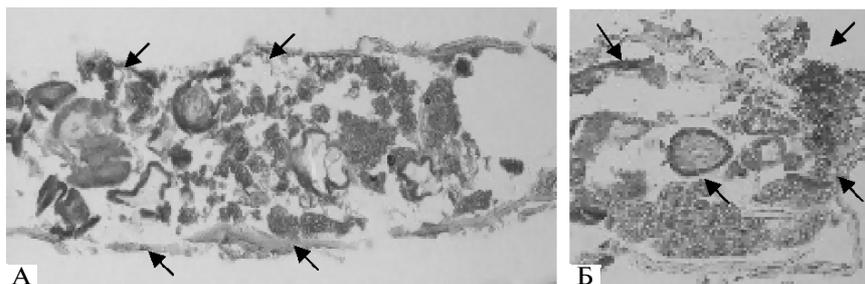


Рис. 8. Иммуногистохимическая локализация DNOS белка в дикой линии *Oregon R* (А) и в линии *HS dNOS1* (Б).

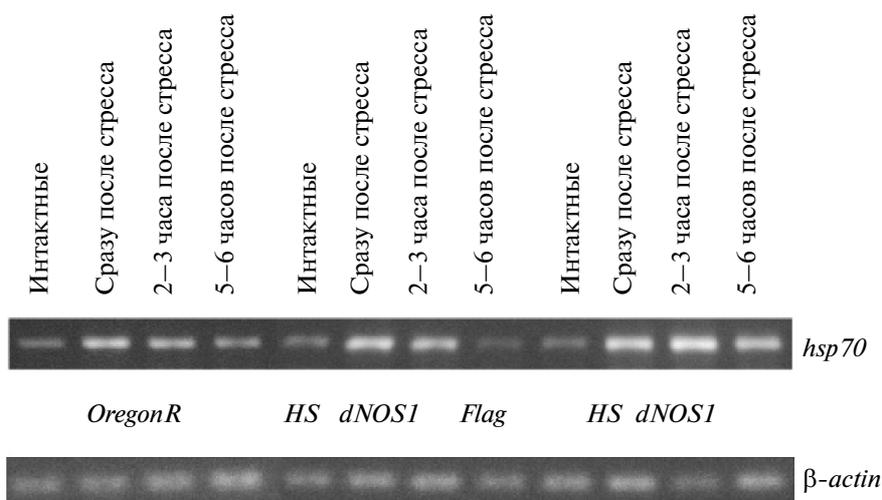


Рис. 9. Экспрессия мРНК *hsp70* у интактных и стрессированных личинок (37°C) дикой линии *Oregon R* и *dNOS1*-трансгенных линий (RT-PCR).

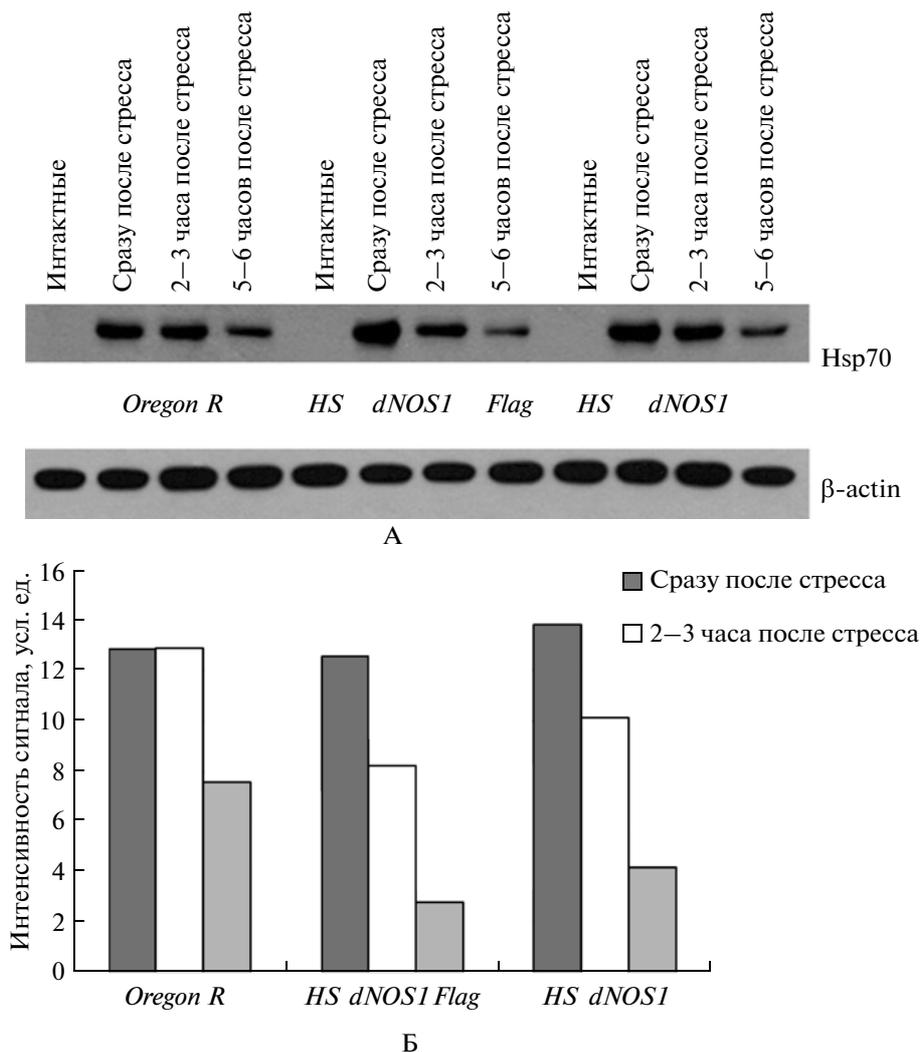


Рис. 10. Полуколичественный анализ содержания белка Hsp70 у интактных и стрессированных личинок (37°C) дикой линии *Oregon R* и *dNOS1*-трансгенных линий. *Oregon R* и *dNOS1*-трансгенных линий. А – Western-blot анализ, В – денситометрическое сканирование Western-blot имиджа.

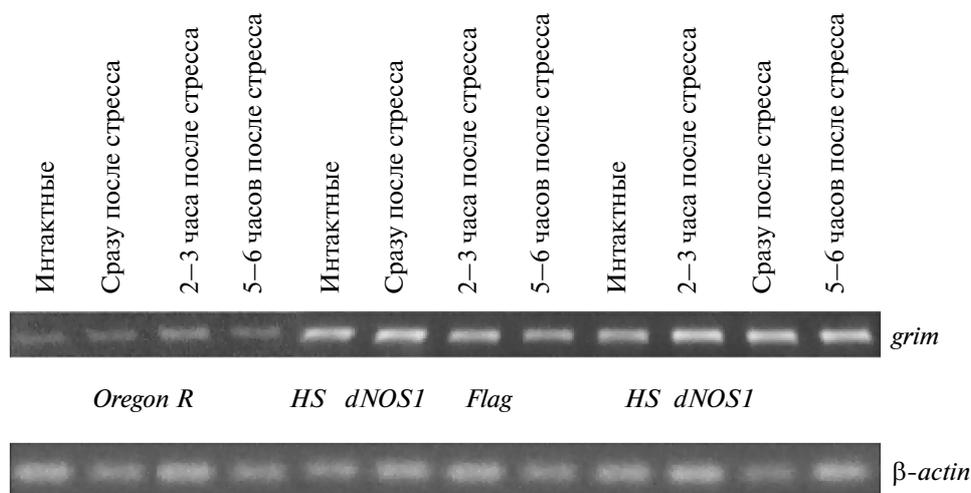


Рис. 11. Экспрессия мРНК *grim* у интактных и стрессированных личинок (37°C) дикой линии *Oregon R* и *dNOS1*-трансгенных линий (RT-PCR).

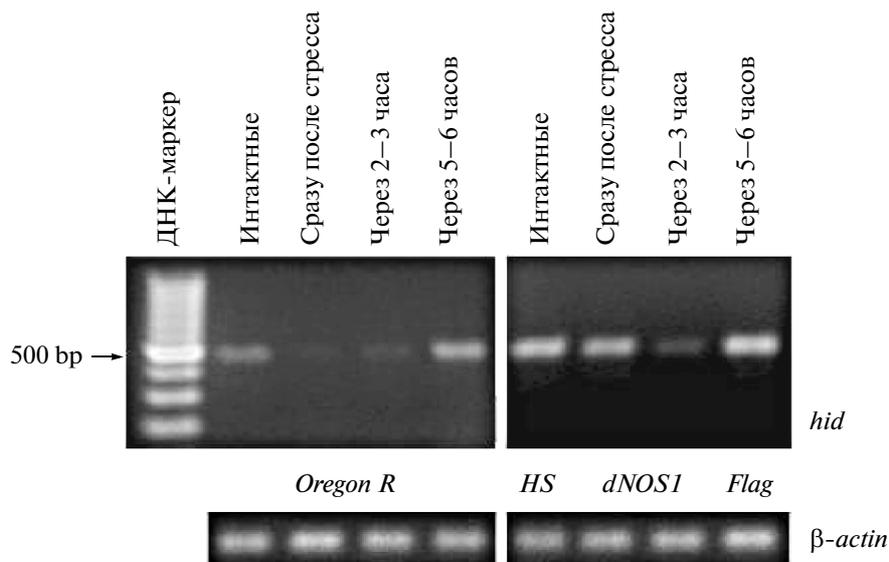


Рис. 12. Экспрессия мРНК *hid* у интактных и стрессированных личинок (37°C) дикой линии *Oregon R* и трансгенной линии *HSdNOS1Flag* (RT-PCR).

через 5–6 ч возвращается к исходному уровню экспрессии. В трансгенной линии *HS dNOS1* уровень экспрессии через 2–3 ч снижается незначительно, но остается высоким вплоть до 5–6 ч после индукции стресса.

Анализируя эффект действия *hsp70* гена с экспрессией гена *grim*, можно отметить антиапоптотическое действие белка теплового шока. После того, как уровень экспрессии *hsp70* в линии *Oregon R* снижается (2–3 ч после стресса), клетки реанимируют апоптотическую машину. Если полагать, что уровень экспрессии *hsp70* в обеих трансгенных линиях был сходен, то различия в уровне экспрессии гена-регулятора апоптоза *grim* могут быть связаны с различной производимостью в отношении оксида азота. Несмотря на то, что наличие HSP70 белка резко возрастает после индукции теплового стресса, повышенное содержание NO нейтрализует апоптотическое действие HSP70 и стимулирует *grim*-опосредованный путь апоптоза. Однако ввиду короткой жизни NO его концентрации в клетке становятся меньше, тогда как белок HSP70 еще остается на высоком уровне (2–3 ч после индукции стресса). Это является причиной снижения интенсивности апоптоза до прежнего уровня.

Антиапоптотическое действие HSP70 проявляется также на снижении экспрессии гена *hid* у *Drosophila melanogaster*, этот эффект отмечен как в линии дикого типа *Oregon R*, так и в трансгенных линиях после индукции теплового шока (рис. 12). Обнаружено, что повышенный уровень оксида азота в *dNOS1*-трансгенных линиях сразу после теплового стресса поддерживает экспрессию гена *hid* на интактном уровне, однако через 2–3 ч наблюдается заметное снижение экспрессии *hid*, и к 5–6 ч после

индукции стресса уровень экспрессии *hid* возвращается на прежний уровень. В то время как в линии *Oregon R* уровень экспрессии гена *hid* значительно снижается и остается низким вплоть до 5–6 ч.

Сравнивая характер экспрессии апоптотических индукторов *grim* и *hid* в контроле и у *dNOS1*-трансгенных линий после индукции температурного стресса, можно отметить одинаковое снижение экспрессии *grim* и *hid* после индукции теплового шока в линии *Oregon R* и сохранение уровня экспрессии регуляторов апоптоза *grim* и *hid* в трансгенных линиях с повышенной выработкой оксида азота. Интересен тот факт, что при сохранении высокого уровня содержания белка HSP70, экспрессия гена *grim* в *dNOS1*-трансгенных линиях через 2–3 ч после индукции стресса остается на очень высоком уровне, а гена *hid* – на низком. TUNEL-метод через 2–3 ч после индукции теплового шока регистрирует высокую интенсивность апоптоза в разных тканях *dNOS1*-трансгенных линий, но не в линии *Oregon R*. Совокупность этих данных позволяет сделать несколько предположений: оксид азота способен подавлять антиапоптотическое действие белка HSP70, по-видимому, не являющееся специфичным; апоптотическое действие NO имеет выраженный эффект поддержания высокого уровня экспрессии гена *grim*, но не *hid*.

Серия проведенных экспериментов дает основание считать, что повышение содержания NO, введенного как экзогенно, так и опосредованного его эндогенным синтезом, может индуцировать или ускорять процессы апоптоза, а понижение содержания NO ведет к супрессии апоптоза. Относи-

тельно роли HSP70 можно отметить, что высокое содержание в клетках оксида азота способно подавлять антиапоптотическое действие HSP70 и стимулировать апоптоз, возможно, через *grim*-опосредованный путь. Причем, как показали опыты с использованием экзогенных доноров оксида азота и *dNOS1*-трансгенных линий, длительное воздействие высокой концентрации NO в течение всего развития более эффективно сказывается на стимуляции проапоптотических генов, чем кратковременное действие этого агента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Габитова Л.Б., Набирочкин С.Д., Бегетова Т.В., Газарян К.Г.* Индукция нестабильных мутаций у *Drosophila melanogaster* микроинъекцией ДНК онкогенных вирусов в полярную плазму эмбрионов. Продленная генетическая нестабильность мутаций в локусе *Lobe* // Генетика. 1991. Т. 27. № 4. С. 617–624.
- Кузин Б.А., Слезингер М.С.* Регуляция мультимерного строения NO-синтазы как новый фактор органогенеза // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 5. С. 285–291.
- Кузин Б.А., Слезингер М.С.* NO-синтаза участвует в регуляции поляризации и движения клеток в морфогенезе *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 1. С. 31–37.
- Мить Н.В., Джансугурова Л.Б., Бекманов Б.О. и др.* Генетическая нестабильность и апоптоз у онковирусиндуцированных мутантов *Drosophila melanogaster* // Материалы Третьего Съезда ВОГиС “Генетика в XXI век: современное состояние и перспективы развития”. Москва, 2004. С. 418.
- Толбаева А.Д., Амиргалиева А.С., Мить Н.В. и др.* Создание модельной системы регуляции апоптоза с NO с использованием онковирусиндуцированных *Lobe*-мутантов *Drosophila melanogaster* // Фундаментальные исследования в биологии и медицине: Сборник научных трудов. Вып. 6. Ставрополь: Изд-во СевКавГТУ, 2009. С. 160–163.
- Arya R., Mallik M., Lakhotia S.C.* Heat shock genes—integrating cell survival and death // J. Biosci. 2007. V. 32. № 3. P. 595–610.
- Bangs P., Franc N., White K.* Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila* // Cell Death Differ. 2000. V. 7. № 11. P. 1027–1034.
- Beere H.M.* Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways // J. Clin. Invest. 2005. V. 115. № 10. P. 2633–2639.
- Kornbluth S., White K.* Apoptosis in drosophila: neither fish nor fowl (nor man, nor worm) // J. Cell Sci. 2005. V. 118. № 9. P. 1779–1787.
- Kuzin B., Roberts I., Peunova N., Enicolopov G.* Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development // Cell. 1996. V. 87. P. 639–649.
- Kuzin B., Regulski M., Stasiv Y. et al.* Nitric oxide interacts with the retinoblastoma pathway to control eye development in *Drosophila* // Curr. Biol. 2000. V. 10. P. 459–462.
- Kim P.K., Zamora R., Petrosko P., Billiar T.R.* The regulatory role of nitric oxide in apoptosis // Int. Immunopharmacol. 2001. V. 1. № 8. P. 1421–1441.
- Nabirochkin S.D., Gabitova L.B., Soldatov A., Osokina M.* Oncoviral DNAs induce transpositions of endogenous mobile elements in the genome of *Drosophila melanogaster* // Mutation Research. 1998. V. 403. № 1–2. P. 127–136.
- Nagy G., Milosevic I., Fasshauer D. et al.* Alternative splicing of snap regulates secretion through nonconservative substitutions in the SNARE domain // Mol. Biol. Cell. 2005. V. 29. P. 4485–4496.
- Richardson H., Kumar S.* Death to f lies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death // J. Immunol. Methods. 2002. V. 265. № 1–2. P. 21–38.
- Song Z., Guan B., Bergman A. et al.* Biochemical and genetic interactions between *Drosophila* caspases and the proapoptotic genes *rpr*, *hid*, and *grim* // Mol. Cell. Biol. 2000. V. 20. № 8. P. 2907–2914.
- Sreedhar A. S., Csermely P.* Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review // Pharmacol. Ther. 2004. V. 101. № 3. P. 227–257.
- Stasiv Y., Kuzin B., Regulski M. et al.* Regulation of multimers via truncated isoforms: a novel mechanism to control nitric-oxide signaling // Genes Dev. 2004. V. 18. № 15. P. 1812–1823.

Effect of Nitric Oxide on Expression of Apoptotic Genes and HSP70 in *Drosophila*

L. B. Dzhanugurova

Institute of General Genetics and Cytology, pr. Al-Farabi 75A, Almaty, 050060 Kazakhstan

e-mail: leylad@mail.ru

Abstract—Data on involvement of nitric oxide in apoptosis are contradictory. The balance between anti- and proapoptotic activities of nitric oxide depends on many factors, including its concentration in a tissue and interactions with other regulators of apoptosis. This paper describes the results of a series of experiments on the effect of nitric oxide donors and inhibitors as well as *dNOS1* and *dNOS4* transgenes on the apoptosis on *drosophila Lobe^{RSV}* mutant strain and wild-type strain *Oregon R*. It has been shown that a high nitric oxide content in cells is able to inhibit antiapoptotic effect of HSP70 and stimulate apoptosis, possibly, via the *grim*-mediated apoptotic pathway. Moreover, long-term action of a high nitric oxide concentration during the entire development more efficiently stimulates the proapoptotic genes as compared with short-term action of this agent.

Keywords: nitric oxide, apoptosis, heat shock, *drosophila*