

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНОВ ИНСУЛИНОВОГО СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА НА ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ УГЛЕВОДОВ У САМОК *Drosophila melanogaster* ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

© 2019 г. М. А. Еремина¹, Е. К. Карпова¹, И. Ю. Раушенбах¹, Д. С. Пирожкова¹,
О. В. Андреевкова¹, Н. Е. Груntenко¹, *

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: nataly@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 20.04.2018 г.

После доработки 27.09.2018 г.

Принята к публикации 28.05.2018 г.

Исследовано влияние генов инсулинового сигнального каскада, транскрипционного фактора семейства Forkhead box class O (*dfoxo*) и инсулиноподобного белка DILP6 (*dilp6*), синтезируемого в жировом теле, на содержание углеводов в норме и при тепловом стрессе у самок *Drosophila melanogaster*. Установлено, что гипоморфные мутации *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018} вызывают в нормальных условиях повышение уровней глюкозы и трегалозы. Впервые показано, что резкое снижение уровня экспрессии генов *dilp6* и *dfoxo*, вызываемое этими мутациями, не препятствует повышению уровней обоих сахаров при тепловом стрессе, однако снижает интенсивность этого ответа.

Ключевые слова: глюкоза, трегалоза, *Drosophila melanogaster*, мутации *dilp6*⁴¹ и *dfoxo*^{BG01018}, тепловой стресс.

DOI: 10.1134/S0016675819030068

Сигнальный каскад инсулина/инсулиноподобных факторов роста (И/ИФР) крайне эволюционно консервативен и участвует в регуляции роста, развития, размножения, метаболического гомеостаза, продолжительности жизни и устойчивости к различным видам стресса [1–3]. В последние годы значительно вырос интерес к исследованию сигнального каскада И/ИФР у дрозофилы и использованию мух в качестве модельной системы для выяснения механизмов ряда заболеваний человека, таких как ожирение и диабет [1, 2, 4, 5]. Механизмы развития сахарного диабета все еще недостаточно изучены, и привлечение генетических моделей, таких как *Drosophila melanogaster*, может оказаться полезным для расшифровки молекулярно-генетических основ заболевания.

У *D. melanogaster* на настоящий момент известно восемь инсулиноподобных белков (DILP1–8). Эти белки связываются с единственным инсулиновым рецептором (InR), который активирует И/ИФР. Стимуляция рецептора приводит через ортолог субстрата инсулинового рецептора млекопитающих (CHICO) к активации протеинкиназы Akt, которая в свою очередь модулирует активность ряда белков, в частности, транскрипционного фактора семейства Forkhead box class O (dFOXO) [1, 5]. В нормальных условиях dFOXO неактивен, по-

скольку ингибируется И/ИФР; при снижении активности И/ИФР, в частности при недостатке питательных веществ, dFOXO транслируется в ядро, где активирует экспрессию генов-мишеней [6, 7]. Показано, что у дрозофилы окислительный и тепловой стресс также активируют dFOXO [6–8]. Сверхэкспрессия dFOXO повышает приспособленность [8, 9], что, в частности, подтверждается сниженной устойчивостью нуль-мутантов dFOXO дрозофилы к окислительному стрессу и их меньшей эффективностью в защите хозяев от вирусов [7, 10].

Установлено, что инсулиноподобный белок DILP6 экспрессируется на низком уровне в слюнных железах и сердце личинок и на высоком уровне — в жировом теле личинок и имаго *D. melanogaster* [1, 11]. Показано, что повышение экспрессии DILP6 в жировом теле самок *D. melanogaster* сопровождается повышением устойчивости к окислительному стрессу [12] и индуцирует поглощение липидов энцитами у самок *D. melanogaster*, стимулирует жировой обмен при нехватке питания и повышает устойчивость мух к голоду [13]. Также обнаружено, что экспрессия DILP6 регулируется экдизоном — гормоном, стимулирующим линьку и метаморфоз у членистоногих, и транскрипционным фактором dFOXO [11, 12].

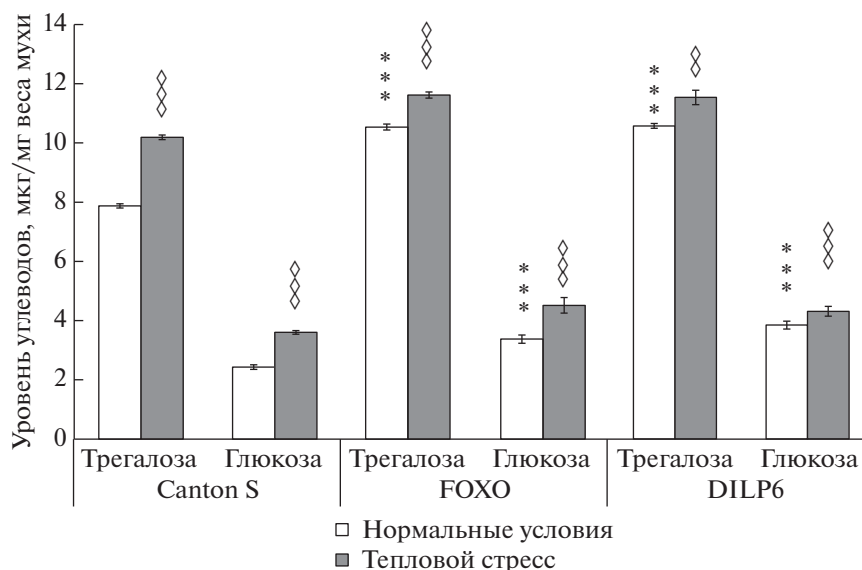


Рис. 1. Влияние теплового стресса (30 мин, 38°C) на уровень глюкозы и трегалозы у 3-суточных самок *D. melanogaster* линии дикого типа (Canton S) и линий, несущих гипоморфные мутации инсулиноподобного белка DILP6 и транскрипционного фактора dFOXO. Каждое значение – среднее из 12–22 измерений. Звездочка – достоверность отличий мутантных самок от самок линии Canton S, ромб – достоверность различий между подвергнутыми тепловому стрессу и контрольными мухами одного генотипа (два ромба или звездочки – $p < 0.01$, три – $p < 0.001$).

Основные компоненты сигнального каскада И/ИФР хорошо сохраняются в ходе эволюции, хотя у млекопитающих они имеют более высокую сложность, чем у беспозвоночных [11]. Изучение И/ИФР *D. melanogaster* демонстрирует, что консервативность также распространяется и на функциональный уровень. У мух со сниженной интенсивностью инсулинового сигналинга наблюдается повышенное содержание глюкозы в гемолимфе и высокое содержание углеводов и липидов в тканях, аналогичное наблюдаемому у млекопитающих с диабетическим фенотипом [14].

Двумя основными формами циркулирующих углеводов у дрозофилы являются глюкоза и трегалоза (дисахарид глюкозы). Глюкозу муха получает из внешних источников (с пищей), тогда как трегалоза синтезируется в жировом теле (аналоге печени/жировой ткани млекопитающих), циркулирует в гемолимфе и поглощается мышечными тканями, где метаболизируется до глюкозы [15].

В настоящей работе мы исследовали влияние гипоморфных мутаций генов *dilp6* и *dfoxo* на изменение уровня углеводов при тепловом стрессе у половозрелых самок *D. melanogaster*.

В работе были использованы три линии *D. melanogaster*: линия *dilp6⁴¹* с делецией 3'-области гена *phl* и 5'-области гена *dilp6*, захватывающей первый экзон [3]; линия *foxo^{BG01018}*, несущая транспозон элемента Р [GT1] в 5'-области гена *dfoxo*, что приводит к снижению его экспрессии и функции [3, 6]; и линия дикого типа Canton S, используемая в качестве контроля. Линии получе-

ны из Bloomington Drosophila Stock Center. Мух выращивали на стандартной питательной среде при 25°C. Синхронизацию линий проводили по вылету имаго (собирали мух, вылетевших в течение 3–4 ч). Мух подвергали тепловому стрессу, перенося пробирки в сухой шкаф с температурой 38°C на 30 мин.

Экспрессию *dilp6* измеряли в жировых телах 20 мух с использованием TRI reagent Lot #BCBT8883 ("Sigma", США) для выделения суммарной РНК, набора Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621 ("Thermo Scientific", США) с праймером oligo (dT)18 для получения кДНК, набора R-402 с SYBR-Green I ("Синтол", Россия) для проведения ПЦР-РВ и амплификатора CFX96 ("BIO-RAD", США). Использованные праймеры: *Dilp6_F* 5'CACGGAATACGAACAGAGACG3', *Dilp6_R* 5'TCGGTTACGTTCTGCAAGTC3', *RpL32_F* 5'AGCATACAGGCCCAAGATCGT3' и *RpL32_R* 5'CGATGTTGGGCATCAGATACTG3'. Для определения уровней углеводов мух гомогенизировали с последующим центрифугированием. Уровень глюкозы в супернатантах измеряли, используя Glucose (HK) Assay Kit #SLBL3912V ("Sigma", США). Трегалозу конвертировали в глюкозу путем добавления трегалазы (0.5 ед./мл, "Sigma", США) с последующим определением количества глюкозы в образце. Измерения проводили с использованием не менее четырех биологических повторов на спектрофотометре Smart Spec Plus ("BIO-RAD", США) при длине волны 340 нм, в трех технических повторах

каждый. Достоверность различий оценивали, используя *t*-критерий Стьюдента.

Ранее методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) нами было установлено, что гипоморфная мутация *foxo*^{BG01018} приводит к двукратному снижению уровня мРНК *dfoxo* у линии, используемой в данной работе [7]. В настоящей работе методом ПЦР-РВ мы оценили влияние мутации *dilp6*⁴¹ на экспрессию гена *dilp6* в жировом теле самок соответствующей линии. Обнаружено, что экспрессия гена *dilp6* у линии *dilp6*⁴¹ снижена в 13 раз по сравнению с уровнем экспрессии гена *dilp6* в жировом теле линии дикого типа Canton S.

На рис. 1 представлены результаты исследования уровня углеводов у самок *D. melanogaster* с мутациями *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018} и самок контрольной линии Canton S в нормальных условиях и при тепловом стрессе. Ясно видно, что у мутантных самок обеих линий уровень как глюкозы, так и трегалозы в нормальных условиях повышен по сравнению с самками дикого типа (различия достоверны при $p < 0.001$). При тепловом стрессе уровень обоих сахаров как у мух дикого типа, так и у мутантных самок повышается по сравнению с нормальными условиями (различия с контролем достоверны при $p < 0.001$ для обоих сахаров у линий Canton S и *foxo*^{BG01018} и при $p < 0.001$ для глюкозы и при $p < 0.01$ для трегалозы у линии *dilp6*⁴¹). Таким образом, снижение экспрессии генов *dilp6* и *dfoxo* не препятствует повышению уровня углеводов в ответ на тепловой стресс. Однако степень повышения уровня глюкозы (на 12.5% по сравнению с уровнем в нормальных условиях) и трегалозы (на 7.5%) при тепловом стрессе у самок *dilp6*⁴¹ ниже, чем у мух дикого типа (на 22.5 и 34.3% соответственно). У самок линии *foxo*^{BG01018} повышение уровня трегалозы (на 9.5%) и глюкозы (на 24.4%) также менее выражено, чем у мух дикого типа.

Полученные данные свидетельствуют о том, что гипоморфные мутации генов инсулинового каскада *dilp6* и *dfoxo*, являющегося регулятором *dilp6* в жировом теле [3, 12], приводят к повышению концентрации основных циркулирующих сахаров в гемолимфе дрозофилы и снижению интенсивности их ответа на тепловой стресс.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-02934 и бюджетного проекта № 0324-2019-0041.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Toivonen J.M., Partridge L. Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila* // Mol. Cell. Endocrinol. 2009. V. 299. P. 39–50. doi 10.1016/j.mce.2008.07.005
2. Nässel D.R., Vanden Broeck J. // Cell. Mol. Life Sci. 2016. V. 73. P. 271–290. doi 10.1007/s00018-015-2063-3
3. Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. The role of insulin signalling in the endocrine stress response in *Drosophila melanogaster*. A mini-review // Gen. Comp. Endocrinol. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.05.019.
4. Xu J., Sheng Zh., Palli S.R. Juvenile hormone and insulin regulate trehalose homeostasis in the red flour beetle *Tribolium castaneum* // PLoS Genet. 2013. 9(6): e1003535. doi 10.1371/journal.pgen.1003535
5. Kannan K., Fridell Y.W. Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction // Front. Physiol. 2013. V. 4. P. 288.
6. Puig O., Marr M.T., Ruhf M.L., Tjian R. Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway // Gen. Devel. 2003. V. 17. P. 2006–2020. doi 10.1101/gad.1098703
7. Gruntenko N.E., Adonyeva N.V., Burdina E.V. et al. The impact of FOXO on dopamine and octopamine metabolism in *Drosophila* under normal and heat stress conditions // Biol. Open. 2016. V. 5. P. 1706–1711. doi 10.1242/bio.022038
8. Hwangbo D.S., Gershman B., Tu M.P. et al. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signaling in brain and fat body // Nature. 2004. V. 429. P. 562–566. doi 10.1038/nature02549
9. Giannakou M.E., Goss M., Jünger M.A. et al. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body // Science. 2004. V. 16. P. 305–361. doi 10.1126/science.1098219
10. Spellberg M.J., Marr M.T. FOXO regulates RNA interference in *Drosophila* and protects from RNA virus infection // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. 14587–14592. doi 10.1073/pnas.1517124112
11. Grönke S., Clarke D.F., Broughton S. et al. Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides // PLoS Genet. 2010. V. 6:e1000857. doi 10.1371/journal.pgen.1000857
12. Bai H., Kang P., Tatar M. *Drosophila* insulin-like peptide-6 (*dilp6*) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain // Aging Cell. 2012. V. 11. P. 978–985. doi 10.1111/accel.12000
13. Chatterjee D., Katwa S.D., Qi Y. et al. Control of metabolic adaptation to fasting by dILP6-induced insulin signaling in *Drosophila* oenocytes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 17959–17964. doi 10.1073/pnas.1409241111
14. Broughton S.J., Piper M.D., Ikeya T. et al. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 3105–3110. doi 10.1073/pnas.1409241111
15. Tatar M., Kopelman A., Epstein D. et al. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function // Science. 2001. V. 292. P. 107–110. doi 10.1126/science.1057987

Mutations in the Insulin Signaling Pathway Genes Affect Carbohydrate Level under Heat Stress in *Drosophila melanogaster* Females

M. A. Eremina^a, E. K. Karpova^a, I. Yu. Rauschenbach^a,
D. S. Pirozhkova^a, O. V. Andreenkova^a, and N. E. Gruntenko^{a, *}

^aFederal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: nataly@bionet.nsc.ru

The effect of insulin signaling pathway genes – transcription factor Forkhead box O (*dfoxo*) and synthesized in the fat body insulin-like peptide DILP6 (*dilp6*) – on carbohydrate content under normal and heat stress conditions in *Drosophila melanogaster* females was studied. The hypomorphic mutations *dilp6*⁴¹ and *foxo*^{BG01018} were shown to result in an increase of glucose and trehalose levels. For the first time it is demonstrated, that a sharp decline in the expression level of *dilp6* and *dfoxo* genes caused by these mutations does not prevent the increase in the levels of both sugars under heat stress, but reduces the intensity of this response.

Keywords: glucose, trehalose, *Drosophila melanogaster*, mutations *dilp6*⁴¹ and *dfoxo*^{BG01018}, heat stress.