

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, ГЕНЕТИКА

Влияние экзогенного мелатонина и ретиноевой кислоты на экспрессию генов в теле планарий *Schmidtea mediterranea*

Ермакова О.Н., Ермаков А.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН 142290, Московская обл., Пущино, ул.

Институтская д.3

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Резюме. На примере уникальной биологической модели - пресноводных плоских червей планарий показано, что экзогенные мелатонин и ретиноевая кислота способны влиять на экспрессию генов в теле этих животных. При этом оказалось, что при введении ретиноевых кислот в тело планарий путем кормления существенно увеличивает их биологическую активность, особенно 9-*цис*-ретиноевой кислоты. В целом продемонстрировано, что мелатонин и ретиноевая кислота обладают морфогенетическим эффектом у примитивных животных на уровне экспрессии генов.

Ключевые слова: планарии, стволовые клетки, регенерация, морфогенез, экспрессия генов.

Effect of exogenous melatonin and retinoic acid on the genes expression in the body of planarians *Schmidtea mediterranea*

Ermakova O.N., Ermakov A.M.

*The Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russia Academy of Sciences
142290, Russia, Moscow region, Pushchino, Instituskaya st., 3*

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Summary. On the example of the unique biological model - freshwater planarian flatworms shown that exogenous melatonin and retinoic acid can affect the expression of genes in the body of these animals. It was found that the introduction of retinoic acid in the body by feeding planarians significantly increases their biological activity, especially 9-*cis*-retinoic acid. In general, demonstrated that melatonin and retinoic acid have morphogenetic effect in primitive animals on the expression level of genes.

Keywords: planarians, stem cells, regeneration, morphogenesis, gene expression.

Введение

Мелатонин и ретиноевая кислота, будучи различными по своей природе и механизмам воздействия, вызывают у высших животных схожие вполне определенные морфогенетические эффекты. Так мелатонин способен подавлять пролиферацию раковых клеток, стимулировать их дифференцировку и вызывать апоптоз [1, 2]. Ретиноевая кислота контролирует процессы эмбрио- и морфогенеза, и также способна подавлять пролиферацию и стимулировать дифференцировку и апоптоз раковых клеток [3, 4]. У беспозвоночных животных роль мелатонина и ретиноевой кислоты в процессах морфогенеза до настоящего времени не выяснена.

Полученные нами ранее результаты относительно роли мелатонина и ретиноевых кислот в процессах морфогенеза, регенерации и пролиферации стволовых клеток планарий [5, 6, 7] дали основание для проведения исследования действия этих веществ на экспрессию некоторых генов, отвечающих за реализацию позиционной информации, и регулирующих клеточный цикл необластов. В процессах морфогенеза особую роль играют гены Нох, активность которых обеспечивает контроль развития определенных частей и органов тела. Так, ген Нох $a3$ регулирует развитие передних частей тела вторичноротых животных [8]. В регуляции клеточного цикла пролиферирующих клеток ключевую роль играют циклин-зависимые киназы (CDK). Они, экспрессируясь в определенных фазах клеточного цикла и взаимодействуя с различными типами циклинов, обеспечивают контроль пролиферации клеток [9]. Например, CDK 2 экспрессируется на протяжении всего клеточного цикла, тогда как CDK 6 активна в точке перехода от G_1/G_0 к S фазе клеточного цикла. Подавление экспрессии специфических циклин-зависимых киназ приводит к остановке клеточного цикла животной клетки в определенной фазе.

Таким образом, **цель данного исследования** - изучение действия экзогенных мелатонина и ретиноевой кислоты на экспрессию некоторых генов у планарий, отвечающих за клеточный цикл и реализацию позиционной информации.

Материалы и методы

Животные

Исследование выполнено на бесполом клональном расе пресноводных плоских червей планарий *Schmidtea mediterranea*. Животных содержали в прудовой воде при комнатной температуре и кормили раз в неделю личинками двукрылых (мотыль). Для стандартизации биологических процессов в эксперимент отбирали планарий длиной около 10 мм и прекращали их кормление за 7 дней до опытов. В работе использовались

как интактные, так и регенерирующие планарии. Регенерация вызывалась путем ампутации 2 мм головной части тела планарий, содержащей головной ганглий. Температура воды в экспериментальном и контрольном сосудах поддерживалась одинаковой, на уровне 21 ± 0.5 °C. Эксперименты в каждой серии повторялись не менее 3-х раз на группах, включающих в среднем по 10 животных.

Используемые в работе фармакологические препараты

В качестве агонистов рецепторов мелатонина использовали мелатонин (Sigma), для активации рецептора ретиноевой кислоты использовали *all-транс*-ретиноевую кислоту (Sigma) и *9-цис*-ретиноевую кислоту (Sigma).

Маточный раствор мелатонина (2 мг/мл) готовили следующим образом: навеску гормона растворяли в 30 мкл этанола и затем доводили дистиллированной водой до 1 мл. Исходные растворы ретиноевых кислот (10^{-2} М) готовили путем растворения их в диметилсульфоксиде (ДМСО). Фармакологические препараты добавляли непосредственно в стаканы с водой, в которых помещали планарий. Вода контрольных групп животных содержала этанол или ДМСО, в тех же концентрациях, что и в воде опытных групп. Конечные концентрации этанола и ДМСО для животных во всех группах не вызывали гибели или морфогенетических изменений животных.

В экспериментах по изучению изменений экспрессии генов под воздействием ретиноидов для повышения активности препарата применяли метод кормления планарий искусственной пищей [10]. Для этого 100 мкл 0,75 % легкоплавкой агарозы (ICN) смешивали с 100 мкл гемолимфы мотыля и добавляли раствор ретиноидов в ДМСО до конечной концентрации действующего препарата 10^{-4} М. Полученную смесь охлаждали до полного застывания агарозы, нарезами на мелкие кусочки и скармливали животным. Контрольные группы планарий кормились смесью, состоящей из агарозы, гемолимфы и ДМСО.

Метод ПЦР в реальном времени

Для определения изменений уровня экспрессии генов под воздействием исследуемых веществ, применяли метод ПЦР в реальном времени. В качестве исследуемых генов были выбраны те, которые контролируют клеточный цикл и морфогенез - это гомологи генов Нох А3 (*Smed-hox a3*) и циклин-зависимые киназы 2 и 6 (*Smed-cdk 2* и *Smed-cdk 6*). Под воздействием ретиноевой кислоты также изучалась экспрессия рецептора ретиноевой кислоты (RXR-рецептора (*Smed-rxr*)). В качестве референсного гена был использован хаус кининг ген - фактор элонгации EF-1 α , относительно которого нормализовалась экспрессия всех исследованных генов. Поиск

гомологов данных генов осуществляли *in silico* в геномной базе планарий *S. mediterranea* (SmedGD, <http://smedgd.neuro.utah.edu>).

Для выделения общей матричной РНК из ткани планарий использовали набор «Выделение полноразмерной поли (А) мРНК на магнитных частицах» (Силекс (Москва)), Полученную мРНК использовали для получения комплементарной ДНК, с помощью набора «Синтез первой цепи кДНК (олиго(дТ)15)» фирмы Силекс. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени проводили на приборе ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), используя набор фирмы Синтол (для ПЦР в реальном времени), содержащий интеркалирующий краситель SybrGreen и референсный краситель ROX. Ген - специфические праймеры подбирались с помощью программы Primer Express 3 (Applied Biosystems). Длина праймеров составляла в среднем 24 нуклеотида. Температура отжига 59-60°C, длина амплифицируемого фрагмента 94-100 пар нуклеотидов. Реакцию проводили по следующей схеме: 1 цикл 95°C – 5 мин; 40 циклов 95°C – 30 сек, 60°C – 40 сек; 1 цикл (стадия диссоциации) 95°C – 15 сек, 60°C – 1 мин, 95°C – 15 сек.

В работе использовались праймеры со следующими последовательностями:

Smed-ef 1

F 5'-CGGCTGGAACTGGTGAAT-3'

R 5'-GTGGAAGTCGAAGAGGTTTAT-3'

Smed-hox a3

F 5'-TCGACGAATGAAGTGGAAGAAAG-3'

R 5'-GCTGATGTGTGATTTGAATTCGAA-3'

Smed-cdk 2

F 5'-CCGCTTTTTCGAGGTGATTCT-3'

R 5'-CGATAACTTCTACTAAACGGCTTCTCA-3'

Smed-cdk 6

F 5'-AGCTTGACGCCAGTCGTAGTG-3'

R 5'-TCGCATGCGGTCAGATAGC-3'

Smed-rxr

F 5'-GATCTTCTTATATTGGACTGCT-3'

R 5'-ATTGTGATTGAGAAACGGTGTA-3'

На стадии отладочных экспериментов для проверки специфичности реакции продукты амплификации проверялись электрофорезом в 2% агарозе. Во всех остальных случаях специфичность реакции проверялась на кривых температурной диссоциации

полученных ампликонов. Анализ данных, полученных с помощью ПЦР в реальном времени, производили по пороговой флуоресценции методом $\Delta C(T)$ по формуле: $\Delta C(T)_{\text{гена}} = C(T)_{\text{гена}} - C(T)_{\text{Smed-ef } 1\alpha}$, где $C(T)_{\text{Smed-ef } 1\alpha}$ – пороговая флуоресценция хаус кинг гена.

Разницу между экспрессией гена в опыте и контроле вычисляли методом $\Delta\Delta C(T)$ т.е. по формуле: $\Delta\Delta C(T)_{\text{гена}} = \Delta C(T)_{\text{гена опыт}} - \Delta C(T)_{\text{гена контр.}}$.

Относительный уровень экспрессии гена вычисляли по формуле: $\text{Отн. эксп.} = 2^{\Delta\Delta C(T)_{\text{гена}}}$.

Помимо этих значений на начальных этапах проведения ПЦР оценивалась также эффективность амплификации для каждого из генов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ для анализа данных экспрессии Relative Expression Software Tool (REST, Германия, <http://www.gene-quantification.de/rest.html>).

Результаты и обсуждения

Как показано на рисунке 1, в теле интактных планарий при действии мелатонина в концентрации 10^{-5}M сутки инкубации уровень экспрессии *Smed-cdk 6* снижался в 2,3 раза, тогда как количество мРНК *Smed-hox a3* и *Smed-cdk 2* по сравнению с контролем увеличивалось. Суточная инкубация планарий в 10^{-6}M растворе all-транс и 9-цис-ретиноевой кислоты приводила к подавлению транскрипции гена *cdk 6*. При этом all-транс-ретиноевая кислота увеличивала экспрессию гена *cdk 2* и не действовала на экспрессию *hox a3* и *rxr*, а 9-цис-ретиноевая кислота не влияла на транскрипцию генов *cdk 2* и *rxr*, но подавляла экспрессию *hox a3* (рис. 1).

Суточная инкубация планарий при концентрации ретиновых кислот 10^{-7}M (рис. 2, а) в меньшей степени снижала уровень транскрипции генов *Smed-cdk 6* (в 1,4 раза в all-транс-ретиноевой кислоте и 1,88 раз в 9-цис-ретиноевой кислоте), *Smed-hox a3* (1,25 раза в 9-цис-ретиноевой кислоте) и *Smed-rxr* (в 1,23 раза в all-транс и 1,47 раза в 9-цис-ретиноевой кислоте). Экспрессия *Smed-cdk 2* не изменялась (рис. 2, а).

Увеличение экспозиции планарий до двух суток в растворах ретиновых кислот с концентрацией 10^{-7}M приводило лишь к незначительному снижению экспрессии генов *Smed-cdk 6*, *Smed-rxr* и *Smed-hox a3* (рис. 2, б). Это явление можно объяснить тем, что ретиновые кислоты в силу своей высокой химической активности достаточно быстро окисляются в биологически - неактивные соединения.

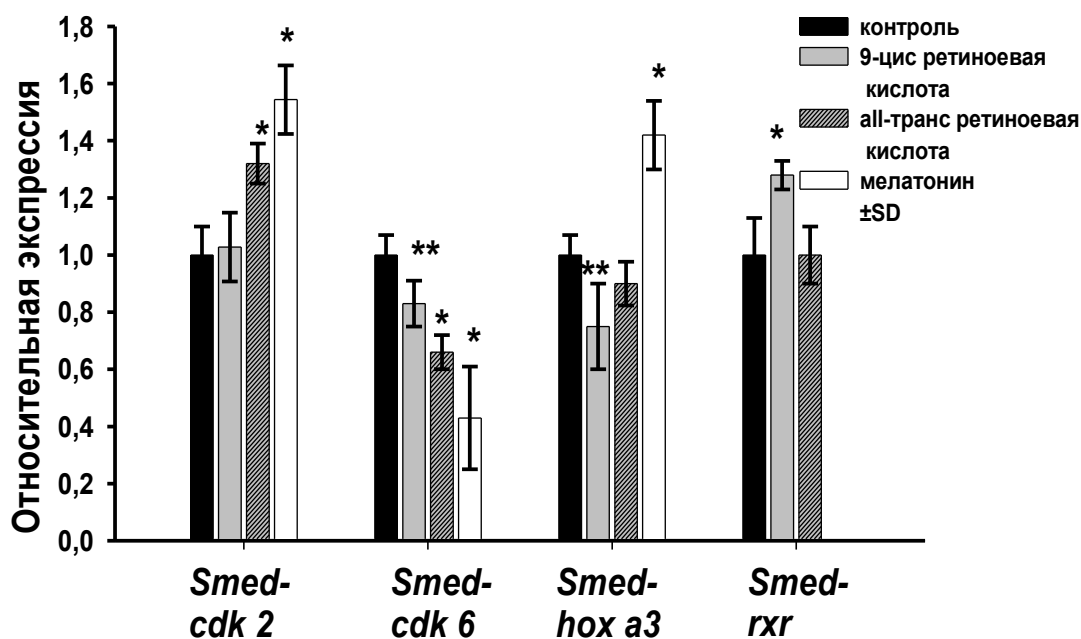


Рис. 1. Экспрессия генов в теле интактных планарий *S. mediterranea* при воздействии мелатонина (10^{-5} M) и ретиновых кислот (10^{-6} M) (суточная инкубация). Здесь и ниже в качестве единицы принята экспрессия генов в теле контрольной группы планарий. Значения представлены в виде средних по трем независимым экспериментальным значениям $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

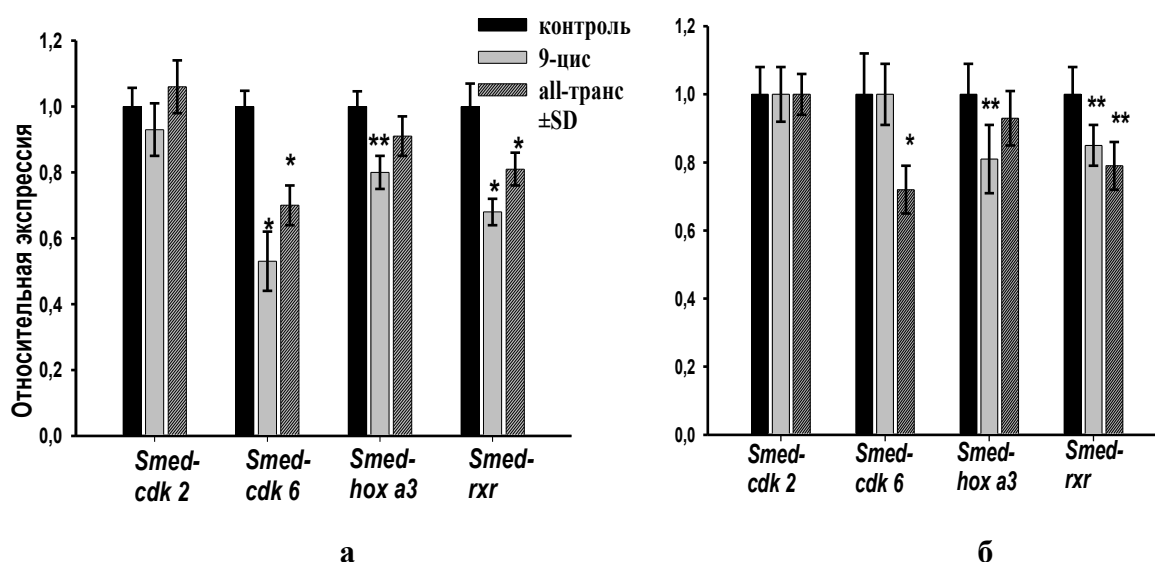


Рис 2. Экспрессия генов в теле интактных планарий *S. mediterranea* при воздействии all-транс и 9-цис-ретиноевой кислоты (10^{-7} M). а – суточная инкубация, б – двухсуточная инкубация. 9-цис - 9-цис-ретиноевая кислота, all-транс – all-транс-ретиноевая кислота. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

Воздействие ретиноевых кислот на экспрессию генов в теле регенерирующих планарий представлено на рис. 3. Суточная инкубация регенерантов планарий в растворе, содержащем 9-*цис*-ретиноевую кислоту при начальной концентрации 10^{-6} М, приводила к уменьшению экспрессии *Smed-hox a3*, тогда как уровень транскрипции остальных исследуемых генов не изменялся. All-*транс*-ретиноевая кислота не влияла на экспрессию исследуемых генов в регенерирующих планариях. Инкубация регенерирующих животных в растворе мелатонина приводила к уменьшению экспрессии только *Smed-cdk 6*.

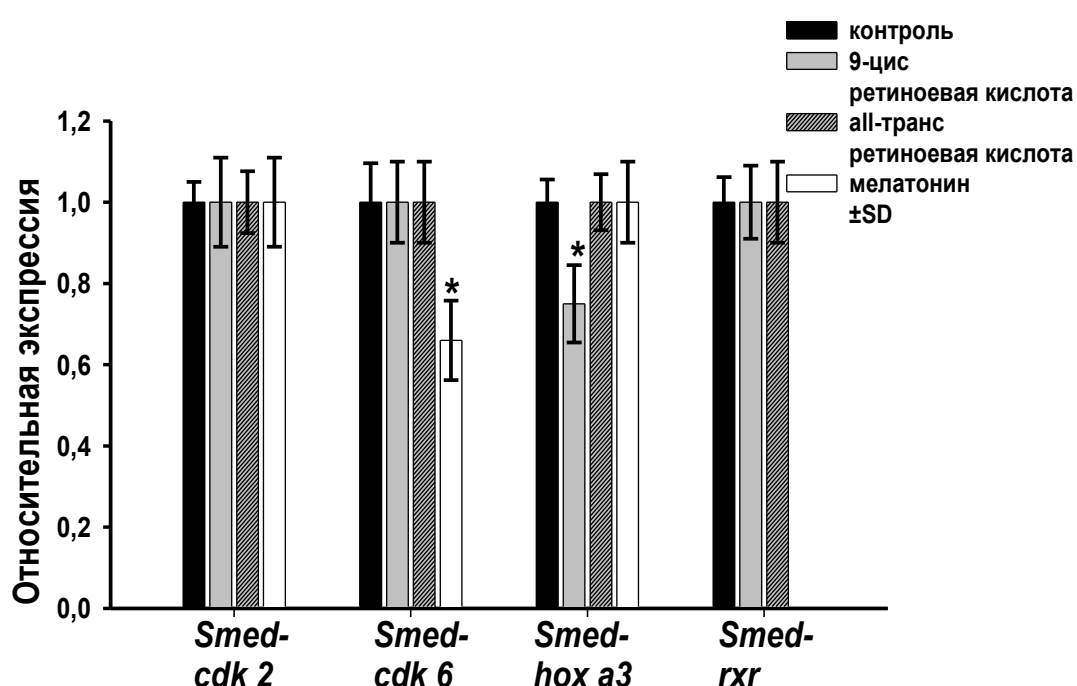


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии генов в области головной постбластемы регенерирующих планарий *S. mediterranea* после суточной инкубации в растворе мелатонина, 9-*цис* или all-*транс*-ретиноевой кислоты. * $p < 0.001$

Для прямого введения ретиновых кислот внутрь организма планарий был применен способ доставки препарата с помощью его скармливания. Планарии после приема пищи переваривают ее посредством фагоцитоза, который происходит в течение первых суток после кормления [11]. Экспрессия генов *Smed-cdk 2*, *Smed-cdk 6*, *Smed-rxr*, *Smed-hox a3* в теле планарий на 1, 2 и 3 день после кормления их *all-транс*-ретиновой кислотой представлена на рис. 4.

Через сутки после кормления у планарий достоверно понижался уровень транскрипции гена *Smed-cdk 6*. На вторые сутки после кормления, в момент максимальной фагоцитарной активности клеток планарий, достоверно уменьшилась экспрессия *Smed-cdk 6* (3,3 раза), *Smed-hox a3* (1,3 раза) и *Smed-rxr* (1,5 раза). К третьему дню (завершение процесса пищеварения у планарий) эффект ингибирования транскрипции генов *Smed-cdk 6* и *Smed-hox a3* уменьшился, тогда как уровень ингибирования экспрессии ретиноидного рецептора остался прежним.

Увеличение экспрессии циклин–зависимой киназы 2 и Нох а3 после суточной инкубации интактных планарий в растворе мелатонина, по-видимому, можно рассматривать как адаптивную реакцию пролиферирующих неопластов, которые в ответ на ингибирование пролиферации ускоряют клеточный цикл индукцией синтеза факторов пролиферации. Подобное воздействие на пролиферирующие неопласты мы наблюдаем и при инкубации планарий в растворе ретиновой кислоты.

Изменение экспрессии большинства исследуемых генов под воздействием ретиновой кислоты только у интактных планарий, тогда как у регенерантов подобного эффекта не было, что свидетельствует о различии реализации механизмов регуляции пролиферации неопластов у интактных и регенерирующих животных.

Сравнение результатов действия мелатонина и ретиновой кислоты на экспрессию генов в теле планарий демонстрирует их способность регулировать клеточный цикл неопластов и морфогенез через экспрессию циклин–зависимой киназы 6 и гомеотического гена Нох а3. Ингибирование экспрессии циклин–зависимой киназы 6 мелатонином и ретиновой кислотой приводит к остановке клеточного цикла пролиферирующих неопластов в точке перехода от G₁ фазы к S фазе. Подавление экспрессии другого гена - Нох а3, являющегося одним из звеньев механизма контролирующего морфогенез головного конца у вторичноротых животных, вероятно, обуславливает дистально-проксимальную морфогенетическую активность ретиновых кислот и у первичноротых животных – планарий.

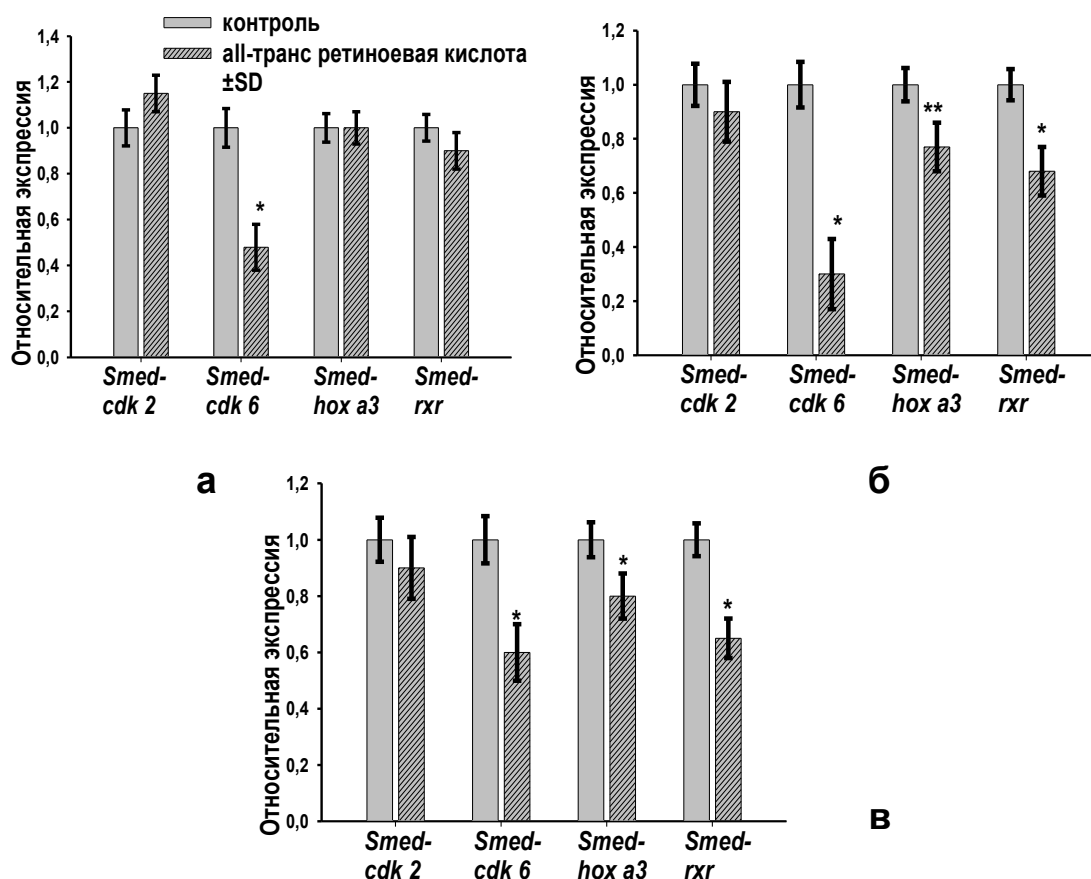


Рис. 4. Изменение экспрессии генов в теле интактных планарий *S. mediterranea* после кормления искусственной пищей, содержащей all-транс-ретиноевую кислоту. а – 1 день после кормления, б – 2 дня после кормления, в – 3 дня после кормления. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

Выводы:

1. Показано, что антипролиферативная активность мелатонина и ретиноевой кислоты, аналогично высшим животным, обусловлена ингибированием экспрессии гена циклин-зависимой киназы 6, регулирующего клеточный цикл. Морфогенетическая активность ретиноевой кислоты у планарий опосредуется изменением экспрессии гомеотического гена *Hox a3*, отвечающего за реализацию позиционной информации.

2. Явление ингибирования экспрессии ретиноевой кислотой гена циклин-зависимой киназы 6 и гена ретиноидного рецептора RXR наблюдается только у интактных животных, что свидетельствует о наличии различных механизмов ингибирования пролиферации неопластов у интактных и регенерирующих планарий.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы», госконтракт № 16.740.11.0352 и грантом РФФИ № 12-04-32091 мол_а.

Литература:

1. Анисимов В.Н., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Дильман В.М. (1973) Сопоставление противоопухолевой активности экстрактов эпифиза, гипоталамуса, мелатонина и сигетина у мышей с перевиваемым раком молочной железы. *Вопр. онкол.* 10: 99-101.
2. Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J.M., Cardinali G.P., Poeggeler B., Hardeland R. (2006) Melatonin. Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal* 273: 2813–2838.
3. Breitman T. R., Selonick, S. E., Collins S. J. (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 2936–2940
4. Chen Y., Dokmanovic M., Stein W. D., Ardecky R. J., Roninson I. B. (2006) Agonist and antagonist of retinoic acid receptors cause similar changes in gene expression and induce senescence-like growth arrest in MCF-7 breast carcinoma cells. *Cancer Res* 66(17): 8749-8761.
5. Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Тирас Х.П., Леднев В.В. (2009) Влияние мелатонина на регенерацию планарий *Girardia tigrina*. *Онтогенез*, №6, с. 466-469.
6. Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Тирас Х.П., Леднев В.В. (2009) Ретиноевая кислота – как регулятор морфогенеза планарий. *Онтогенез*, №6, с. 449-455.
7. Ermakov A.M., Ermakova O.N., Kudravytsev A.A., Kreshchenko N.D. (2011) Study of planarian stem cell proliferation by means of flow cytometry. *Mol Biol Rep* 39(3): 3073-80.
8. Daftary G.S., Taylor H.S. (2006) Endocrine regulation of HOX genes. *Endocrine Reviews*. 27(4):331–355.
9. Malumbres M. (2011) Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev.* 91(3): 973-1007.
10. Newmark P.A., Sanchez Alvarado A. (2000) Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol* 220: 142-153.
11. Sheiman I.M., Sakharova N.J. (1974) On peculiarity of planarian digestion. *Comp Biochem Physiol* 48(3): 601-607.