

## ВПЛИВ ГІПЕРТЕРМІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ У ТКАНИНАХ МИШЕЙ

О. Штапенко

*Інститут біології тварин НААН  
вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна  
e-mail: o\_shtapenko@mail.ru*

Досліджено вплив теплового шоку на експресію генів у печінці та сім'яниках мишей. За допомогою методу ПЛР зі зворотною транскрипцією у тканинах печінки та сім'яниках мишей за дії теплового шоку проаналізовано зміну активності деяких генів упродовж різних часових періодів. За умов гіпертермії спостерігається експресія генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *Hdac4* тільки у сперматоцитах. Тоді як у печінці за дії теплового шоку виявлено експресію генів *Cideb* та *Dnaja*. Разом з тим, наші дослідження показали, що тепловий шок в обох тканинах індукує експресію генів теплового шоку.

*Ключові слова:* регуляція генів, сім'яники, тепловий шок, сперматогенез, експресія.

У сучасній біології важливе місце займає вивчення проблем патогенезу захворювань чоловічої репродуктивної системи [1, 13]. Безпліддя може бути результатом дії несприятливих екзо- й ендогенних факторів навколишнього середовища. Деякі чинники навколишнього середовища, зокрема, гіпертермія, гіпоксія, випромінювання, іони важких металів, здатні індукувати стан клітинного стресу. Сигнали про зміни параметрів навколишнього середовища сприймаються різними сенсорами клітин і передаються по системах передачі до ДНК, викликаючи зміни експресії генів, відповідальних за адаптацію до нових умов.

Підвищення в останні десятиліття кількості випадків, пов'язаних зі зниженням показників сперматогенезу, є наслідком генетичних порушень у гонадах самців. Розуміння цих механізмів функціонування клітини дасть змогу використовувати більш точні й ефективні підходи в діагностиці захворювань репродуктивної сфери й розробити нові методи їх корекції та лікування.

Наші дослідження спрямовані на виявлення змін у генетичному апараті соматичних і статевих клітин самців мишей за умов теплового шоку методом ДНК-аналізу з метою діагностування генетичних порушень та корекції на первинному молекулярному рівні.

### Матеріали та методи

Дослідження були проведені на самцях мишей лінії FVB/N віком 3–3,5 місяця масою 28 г. Для проведення термічного шоку *in vivo* після анестезії мишей 2,5% розчином Avertin (Sigma) із розрахунку 15–17 мкл/г маси, тварин поміщали у водяну баню Poluyest20 (BIOBLOCK) з температурою води 42°C на 30 хв до рівня грудей, згідно з описаною методикою [12]. Температуру води та положення тварин контролювали впродовж експерименту. Після 2, 4, 6 та 24 год по шоку проводили евтаназію мишей шляхом дислокації шийних хребців для відбору біологічного матеріалу. Для контрольної групи відбирали сім'яники від тварин після анестезії.

Загальну РНК виділяли зі сім'яників та печінки самців мишей за допомогою TRIZOL REAGENT (Sigma) згідно з інструкцією фірми-виробника. Для очищення зразків РНК від контамінацій ДНК використовували набір реагентів RNeasy Mini kit (Qiagen) згідно із про-

понованим протоколом. Якість РНК перевіряли електрофорезом у 1%-му агарозному гелі в присутності броміду етидію. Концентрацію ДНК (в нг/мкл) визначали на спектрофотометрі ND1000 (NanoDrop Technologies) при довжині хвилі 260 нм.

Реакції зворотної транскрипції проводили за допомогою зворотної транскриптази M-MLV (Promega) та random decamer праймерів (Invitrogene) згідно із запропонованими рекомендаціями виробника. Для ампліфікації кДНК використовували праймери, розміщені в різних екзонах гена. Усі праймери підібрані за допомогою програми Primer3 Designer (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Праймери були синтезовані фірмою Oligo.pl oraz Genomed (Польща).

### Результати і їхнє обговорення

Сперматогенез є одним із найбільш динамічних процесів, пов'язаних з клітинною регенерацією та диференціацією. Відомо, що яєчники та сім'яники, завдяки високій проліферації гермінативних клітин, належать до радіо- та температурозалежних органів, однак відповідь статевих клітин на дію гіпертермії залежить від стадії сперматогенезу [3]. Так, сперматоцити, зокрема, більш резистентні, тоді як сперматозоїди як носії генетичної інформації є чутливішими, і в них частіше виникають мутації [13]. Причини різної генетичної чутливості статевих клітин на різних стадіях гаметогенезу до кінця не з'ясовані, а результати сучасних досліджень вказують на дії комплексу факторів – особливості метаболізму різних типів тканин, ступінь конденсації хромосом, рівень насичення клітин киснем, відносна тривалість стадій клітинного циклу, інтенсивність роботи систем репарації.

Після аналізу результатів проведених досліджень впливу гіпертермії на експресію генів у тканинах сім'яників і печінки самців мишей усі вивчені гени, згідно з транскрипційною активністю були поділені на три групи.

До першої групи входили гени, активність яких була виявлена у сперматоцитах, тоді як у гепатоцитах їхня експресія була незначною або відсутньою. Так, до цієї групи було віднесено найбільшу кількість генів: *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *c-fos*, *Hdac4* (рис. 1). Проте, активність генів цієї групи дещо відрізнялася між собою. Так, висока активність гена відзначена після 4-х та 6-ти год, тоді як експресія генів *mDazl* та *Mdm1* спостерігається вже через 2 год після гіпертермії. Часова залежність зміни активності відзначена також для генів *c-fos* та *Hdac4*.

Отримані нами результати показали тканинспецифічний вплив гіпертермії на активність генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *c-foc*, *Hdac4*. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР сім'яників показав наявність інтенсивних смужок генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, що свідчить про посилення експресії цих генів за дії теплового шоку в репродуктивних органах самців. Тоді як у продуктах ПЛР з печінки мишей, яких піддавали впливу гіпертермії, експресія цих генів не відзначено.

Причиною повного або часткового зниження сперматогенезу є деякі генетичні порушення, зокрема, анеуплоїдія та структурні аномалії хромосом. Основним геном, який відповідає за продукцію сперми, є *DAZZ*, розміщений на хромосомі Y (3p24) [14]. Мутації гена *DAZ* у 10–15% призводять до чоловічого безпліддя. Гени даної родини кодують РНК-зв'язуючі білки, які експресуються у пренатальних та постнатальних статевих клітинах самців і самок [8]. Білок, що кодується цим геном, під час мейозу самців переміщується до цитоплазми, де і локалізується у сперматидях і сперматозоїдах. Дослідженнями С. Ferrás [9] встановлено, що білок *DAZ* міститься тільки в зародкових клітинах на пізніх стадіях розвитку – сперматидях і сперматозоїдах.

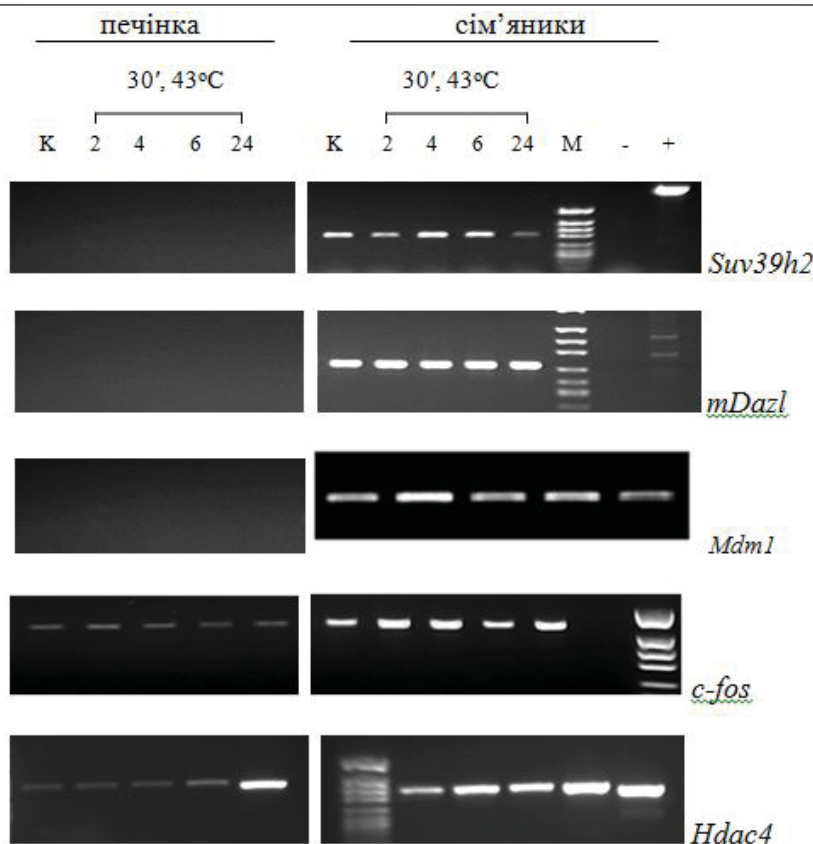


Рис. 1. Експресія генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *c-fos*, *Hdac4* у тканинах печінки та сім'яників мишей за дії гіпертермії. Тканини отримували після 2, 4, 6 та 24 год після теплового шоку.

У наших дослідженнях виявлено активність гена *Mdm1* в сперматогенетичних клітинах та її відсутність у гепатоцитах. Очевидно, контроль за експресією гена *Mdm1* в умовах стресу тканиноспецифічний і здійснюється на різних рівнях, можливо, включаючи також функціональну інактивацію білка p53, оскільки відомо, що *Mdm2* контролює рівень експресії *p53* [4]. У відповідь на стрес здійснюється активація *p53* до компетентного стану для сайт-специфічного зв'язування респонсивними генами, до яких належить *Mdm1*, що визначає в подальшому включення програми апоптозу чи зупинку клітинного циклу [7]. При незначному пошкодженні структури ДНК активується *p53*, який, у свою чергу, індукує транскрипцію генів, білкові продукти яких беруть участь у зупинці клітинного циклу, що дає клітині змогу репарувати пошкодження ДНК. У разі значних пошкоджень ДНК білок p53 активує експресію проапоптичних генів, у тому числі *Mdm2*, *Fas*, *bax*, *p53* [5].

У наших дослідженнях було встановлено, що гіпертермія викликає зміну транскрипції деяких генів ранньої відповіді, зокрема, протоонкогена *c-fos*. Так, на відміну від тканини сім'яників, у гепатоцитах експресія гена *fos* репресована і майже не активується за дії теплового шоку, що, очевидно, пов'язане з формуванням компактною структури нуклеосоми в промоторі гена *c-fos*, викликане деацетилюванням гістонів [11].

Гіпертермія супроводжується зміною експресії позитивних і негативних регуляторів клітинного циклу. Нами встановлено, що транскрипція деяких генів ранньої відповіді, зо-

крема, *Hdac4*, в гепатоцитах майже не активується за умов гіпертермії, тоді як у сім'яниках відзначено експресію цього гена. Оскільки статеві клітини є більш чутливими до дії різних факторів, то, очевидно, тепловий шок призводить до активації механізмів, які контролюють компактизацію хроматину сперматозоїдів, чим і зумовлена виявлена нами активність гена *Hdac4*.

До другої групи віднесено гени, експресія яких за дії теплового шоку виявлена в гепатоцитах і відсутня в яєчках (рис. 2). Так, на відміну від сім'яників, у тканинах печінки відзначено активність генів *Cideb* та *Dnaja* за дії гіпертермії.

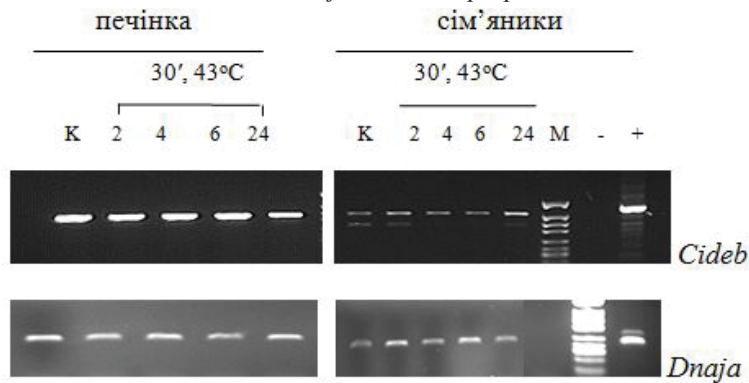


Рис. 2. Експресія *Cideb* та *Dnaja* у тканинах печінки та сім'яників мишей за дії гіпертермії. Тканини отримували після 2, 4, 6 і 24 год після теплового шоку.

До третьої групи входили гени теплового шоку та ген *Ebb1*, під дією гіпертермії в яких відзначена експресія і в яєчках, і в гепатоцитах. За дії теплового шоку в тканинах сім'яників виявлена активність гена *ErbB1* в усіх групах, порівняно з контролем, тоді як у гепатоцитах експресія цього гена була однаковою як у контрольній групі, так і за дії теплового шоку (рис. 3).

Головну роль у захисті клітин від різних шкідливих факторів та підтримці гомеостазу всього організму на всіх стадіях його розвитку відіграє родина білків теплового шоку. Відомо, що гени теплового шоку характеризуються швидкими й інтенсивними процесами активації транскрипції [10]. Отримані нами дані показали, що тепловий стрес індукує перебудову структури хроматину на промоторних і кодуючих ділянках генів теплового шоку, внаслідок чого змінюється активація генів теплового шоку. Ген теплового шоку *Hsp70* експресується на низькому рівні та посилює експресію після дії гіпертермії в обох типах тканин, тоді як гени *Hsp90aa1* та *Hspab1* виявляють високу активність як до теплового шоку, так і у відповідь на підвищення температури. Різна активність генів теплового шоку за дії гіпертермії вказує на те, що регуляція експресії кожного гена має свої особливості. Так, у наших дослідженнях в обох тканинах відзначена вища експресія гена *Hsp90aa1* при температурному шоці, ніж гена *Hsp90ab1*. На нашу думку, різниці в активності генів *Hsp90aa1* та *Hsp90ab1* при гіпертермії вказують на різну їх локалізацію у клітині, а відтак – і на специфіку їх регуляції. Ізоформи Hsp90 характеризуються тканино- та органоспецифічною конститутивною експресією та відрізняються за інтенсивністю відповіді на дію стресу [6].

У стресових умовах, коли в клітині накопичуються білки з порушеною конформацією, Hsp90 частково переключається на їх фолдинг, зв'язуючись з білками та передаючи їх іншим шаперонам (зокрема Hsp70) для денатурації або протеосомам для протеолізу [15]. Тепловий стрес індукує синтез у обох досліджуваних тканинах білків теплового стресу

Hsp70.1, який, як відомо, виконує в клітині функцію молекулярного шаперона, захищаючи її від пошкоджень і, таким чином, підтримуючи стабільність геному в умовах стресу [2].

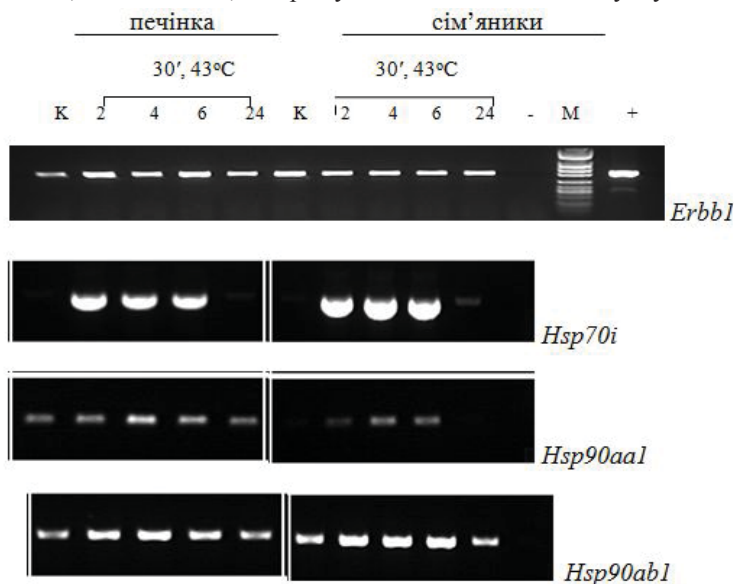


Рис. 3. Експресія *Erbb1*, *Hsp70i*, *Hsp90aa1*, *Hsp90ab1* у тканинах печінки та сім'яників мишей за дії гіпертермії. Тканини отримували після 2, 4, 6 та 24 год після теплового шоку.

Проаналізовано вплив гіпертермії на активність деяких генів у печінці та сім'яниках мишей. Дослідження експресії генів у печінці та сім'яниках самців мишей за дії гіпертермії дало змогу порівняти активність експресії генів у соматичних і репродуктивних тканинах. Встановлено тканиноспецифічні зміни активності генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *c-fos*, *Hdac4* після теплового шоку. Гіпертермія призводить до активації транскрипції генів теплового шоку в обох досліджуваних тканинах. Диференціальна експресія генів за умов гіпертермії в різних тканинах зумовлена здатністю різних типів клітин застосовувати одну або кілька систем регуляції певних каскадів генів.

Дана робота виконана в *M. Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice* за підтримки гранту *National Cancer Institute, NCI, Bethesda (USA)*.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гладкова А. І., Золотухіна В. М. Реактивність чоловічих статевих клітин різних стадій розвинення до стрес-запалення // Клінічна та експериментальна патологія. 2004. Т. 3. № 2. С. 126–127.
2. Евдонин А. Л., Медведева Н. Д. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции // Цитология. 2009. Т. 51. № 2. С. 130–137.
3. Жабин С. Г., Артифексов С. Б., Нагайцев В. М. та ін. Современные представления о созревании сперматозоидов в придатке яичка // Проблемы репродукции. 2010. № 2. С. 66–73.
4. Желтухин А. О., Чумаков П. М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 // Успехи биологической химии. 2010. Т. 50. С. 447–516.
5. Чумаков П. М. Белок 353 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии. 2007. Т. 47. С. 3–52.

6. *Amere S. Sreedhar, Eva Kalmar, P. Csermely, Yu-Fei Shen.* Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance // *FEBS letters.* 2004. (562). P. 11–15.
7. *Ashcroft M. A., Vousden K. H.* Regulation of p53 stability // *Oncogene.* 1999. Vol. 18. P. 7637–7643.
8. *Chai N. N., Phillips A., Fernandez A., Yen P. H.* A putative human male infertility gene DAZLA: genomic structure and methylation status // *Mol. Hum. Reprod.* 1997. Vol. 3 (8). P. 705–708.
9. *Ferrás C., Fernandez S., Marques C. J. et al.* AZF and DAZ gene copy-specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome // *Mol. Hum. Reprod.* 2004. Vol. 10 (10). P. 755–761.
10. *Fujimoto M., Nakai A.* The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress // *FEBS J.* 2010. Vol. 277. P. 4112–4125.
11. *Jolly C., Morimoto R. I.* Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death // *J. National Cancer Institute.* 2000. Vol. 92(19). P. 1564–1572.
12. *Lue Y. H., Hikim A. P., Swerdloff R. S. et al.* Single exposure to heat induce stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity // *Endocrinology.* 1999. Vol. 140. P. 1709–1717.
13. *Rockett J. C., Faye L. Map, J. Brian Garges, J. Christopher.* Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression and fertility in adult male mice // *Biology of Reproduction.* 2001. Vol. 65. P. 229–239.
14. *Saxena R., de Vries J. W., Repping S., Alagappan R. K. et al.* Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome // *Genomics.* 2000. Vol. 67. P. 256–267.
15. *Wegele H., Müller L., Buchner J.* Hsp70 and Hsp90-a relay team for protein folding // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2004. Vol. 151. P. 1–44.

Стаття: надійшла до редакції 01.03.13

доопрацьована 04.06.13

прийнята до друку 05.06.13

## EFFECTS OF HYPERTHERMIA ON GENE EXPRESSION IN MICE TISSUES

**O. Shtapenko**

*Institute of Animal Biology NAAS  
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine  
e-mail: o\_shtapenko@mail.ru*

The effect of heat shock on gene expression in mice testes and livers was studied. PCR methods were used to characterize effects of testicular and liver heat shock (43 C for 20 min) at different times posttreatment. Comparing of gene expression in mouse liver and testis was identified genes with different effects of expression depending of hyperthermia. It was shown, that hyperthermia was induced the *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *Hdac4* genes expression only in testes, but not in liver. The high expression levels of genes *Cideb* та *Dnaja* was seen in liver after heat shock. Our studies have shown, that gene expression in

mouse liver and testis are associated with heat shock-induced effects was correlated with the expression of stress-inducible Hsp genes.

*Keywords:* gene regulation, testis, heat shock, spermatogenesis, expression.

## ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В ТКАНЯХ МЫШЕЙ

О. Штапенко

*Институт биологии животных НААН*

*ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина*

*e-mail: o\_shtapenko@mail.ru*

С помощью ОТ-ПЦР метода оценивали экспрессию некоторых генов в семенниках и печени мышей при тепловом шоке. Сопоставление результатов активности генов в исследуемых тканях после гипертермии позволило идентифицировать гены, экспрессия которых существенно отличалась или не менялась. Выявлена экспрессия генов *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *Hdac4* только в сперматоцитах, а также генов *Cideb* и *Dnaja* – исключительно в гетацотипах при гипертермии. Наши исследования также показали, что тепловой шок индуцирует экспрессию генов теплового шока в одинаковой степени так в тканях семенника, так и в печени мышей.

*Ключевые слова:* регуляция генов, семенники, тепловой шок, сперматогенез, экспрессия.