

УДК 571.27

## БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI* И *MICROCOCCLUS LUTEUS* АКТИВИРУЮТ ГЕН *CG45045* В ЛИНИИ КЛЕТОК S2 ДРОЗОФИЛЫ

© 2024 г. Ю. А. Полунина, А. Э. Праведникова, М. Гасса, академик РАН П. Г. Георгиев, Ю. В. Шидловский, З. М. Качаев\*

Поступило 25.07.2024 г.

После доработки 15.08.2024 г.

Принято к публикации 17.08.2024 г.

Гуморальная иммунная система дрозофилы, наиболее изученная среди эукариот, активируется каноническими сигнальными путями IMD и Toll. Недавно выявлены новые потенциальные регуляторы врожденного иммунного ответа, такие как длинные некодирующие РНК (днРНК) и гены, кодирующие короткие полипептиды. Клетки S2, будучи макрофагоподобной клеточной линией, используются как модельная система для изучения молекулярных механизмов активации генов иммунного ответа. Мы использовали эту линию клеток для анализа влияния бактерий *Escherichia coli* и *Micrococcus luteus* на транскрипцию днРНК-*CR30055* и генов *CG45045* и *CG44404*, кодирующих короткие полипептиды. Обнаружено, что патогены активируют только *CG45045*, тогда как уровни транскрипции *CR30055* и *CG44404* остаются неизменными. Также не наблюдалось активации гена *Cecropin C* и некоторых генов семейства *Vomanin*, что указывает на различия в паттернах активации генов иммунного ответа в клетках S2 и взрослых мухах. При этом наиболее высокая активация *CG45045* наблюдалась между 6 и 12 часами инкубации клеток с патогенами. Паттерны активации *CG45045* после воздействия *E. coli* и *M. luteus* были схожими, что может указывать на общие механизмы активации транскрипции этого гена. Таким образом, *CG45045* может быть новым геном, вовлеченным в гуморальный иммунный ответ дрозофилы.

**Ключевые слова:** врожденный иммунитет, полипептид, днРНК, IMD, Toll

**DOI:** 10.31857/S2686738924060116

Плодовая мушка, являясь удобным модельным объектом, внесла значительный вклад в понимание фундаментальных механизмов врожденного иммунитета. Активация гуморального иммунного ответа начинается с запуска двух сигнальных путей: IMD и Toll [1, 2]. Путь IMD активируется грамотрицательными (Грам(-)) бактериями, тогда как Toll – грамположительными (Грам(+)) бактериями и грибами. Каскад активации сигнальных путей IMD и Toll завершается привлечением специфических факторов транскрипции на промоторные области генов антимикробных пептидов (АМП). Ключевым фактором транскрипции для пути IMD является протеолитически расщепленный вариант белка Relish – Rel68, тогда как для пути Toll – это факторы Dif и Dorsal (рис. 1a). Привлечение этих факторов приводит к гиперактивации генов, кодирующих антимикробные пептиды. К наиболее

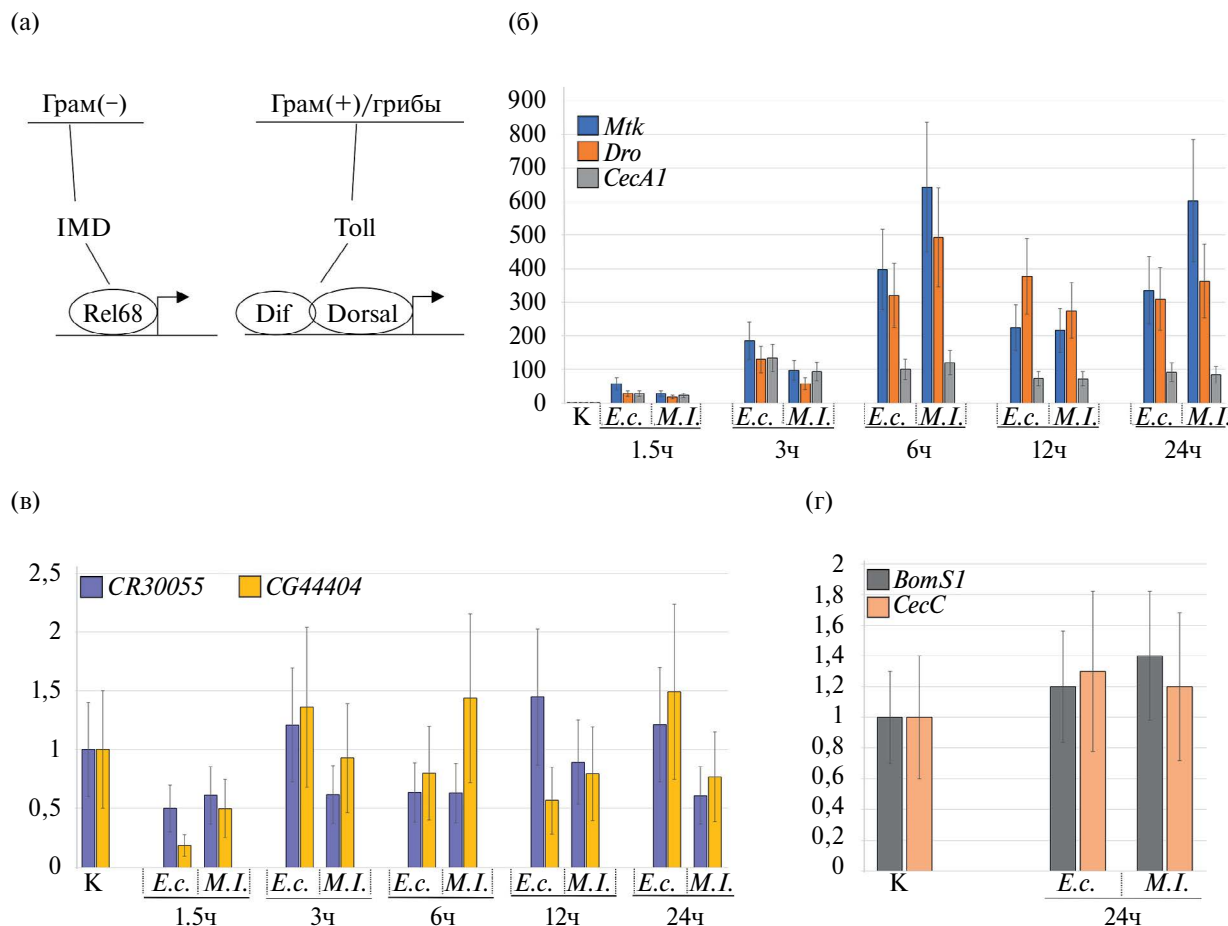
изученным генам АМП относятся *Metchnikowin (Mtk)*, *Drosocin (Dro)*, *Cecropins (Cec)* и т.д. [2, 3].

Помимо классических генов АМП, в настоящее время активно исследуется вклад потенциально новых регуляторов в активацию врожденного иммунитета у насекомых. Это позволяет не только глубже понять механизмы их активации, но и изучить возможные взаимодействия гуморального иммунного ответа с другими сигнальными путями. К таким новым регуляторам относятся гены, кодирующие короткие полипептиды и длинные некодирующие РНК (днРНК). Например, ген *CG44404*, активирующийся при заражении мух бактериями *Enterococcus faecalis* и *M. luteus*, кодирует пептид с антимикробной активностью [4]. Некоторые днРНК также участвуют в регуляции иммунитета: у млекопитающих они активируются в иммунных клетках [5], а у дрозофилы днРНК, например, такие как *CR46018*, *CR33942* и *CR11538* подавляют транскрипцию генов АМП, конкурируя с факторами транскрипции пути Toll [6].

Наш предварительный транскриптомный анализ выявил несколько новых потенциальных регуляторов иммунного ответа в клетках S2.

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

\*e-mail: k-z-m@mail.ru



**Рис. 1.** Активация генов иммунного ответа в клетках S2. (а) Схема активации сигнальных путей IMD и Toll. (б), (в), (г) Анализ уровней экспрессии генов АМП, *днPHK-CR30055*, *CG44404*, *BomS1* и *CecC*. Уровни транскрипции анализировали в следующих точках: К – 0 часов (ч), 1.5 ч, 3 ч, 6 ч, 12 ч и 24 ч. S2 клетки были обработаны инактивированными культурами *E. coli* (*E.c.*) с оптической плотностью (OD) 0.03 и *M. luteus* (*M.I.*) с OD 1.2. Приведены средние значения и стандартные отклонения для трех независимых экспериментов. Активация рассчитана относительно К. Отличие является статистически значимым для генов АМП (б) во всех точках ( $p < 0.05$ ), кроме 1.5.

В частности, уровни экспрессии *днPHK-CR30055* и гена *CG45045* повышались после ночной инкубации клеток S2 с бактериями *E. coli* и *M. luteus*. Для более детального анализа динамики экспрессии этих генов, а также положительного контроля *CG44404*, мы исследовали паттерны их активации в разные моменты времени методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Клетки инкубировали с *E. coli* и *M. luteus* в течение 1.5, 3, 6, 12 и 24 часов. Успешность активации иммунного ответа оценивали по уровню экспрессии соответствующих генов АМП. Мы обнаружили, что наиболее высокий уровень активации *Mtk*, *CecA1* и *Dro* наблюдается в интервале между 6 и 24 часами инкубации клеток S2 с патогенами (рис. 1б). Далее мы проанализировали влияние *E. coli* и *M. luteus* на активацию *CG45045*, *CG44404* и *CR30055*.

Мы не обнаружили какой-либо статистически значимой активации транскрипции *CR30055* и *CG44404* (рис. 1в). Стоит отметить, что ранее уже было показано несоответствие уровней транскрипции патоген-зависимых генов в культуре клеток и во взрослых мухах [7]. Зачастую высокий уровень транскрипции генов иммунного ответа наблюдался во взрослых мухах, но не в культуре клеток. Например, уровень транскрипции *Diptericin* (*Dpt*) значительно ниже в культуре клеток по сравнению со взрослыми мухами [7, 8]. Мы также обнаружили незначительное усиление транскрипции гена *Dpt* в клетках S2. Кроме того, уровень транскрипции *Cecropin C* (*CecC*) практически не менялся (рис. 1г). Наконец, мы проанализировали уровень транскрипции генов *BomS1* и *BomS3*, которые относятся к кластеру генов семейства *Bomanin*, участвующих

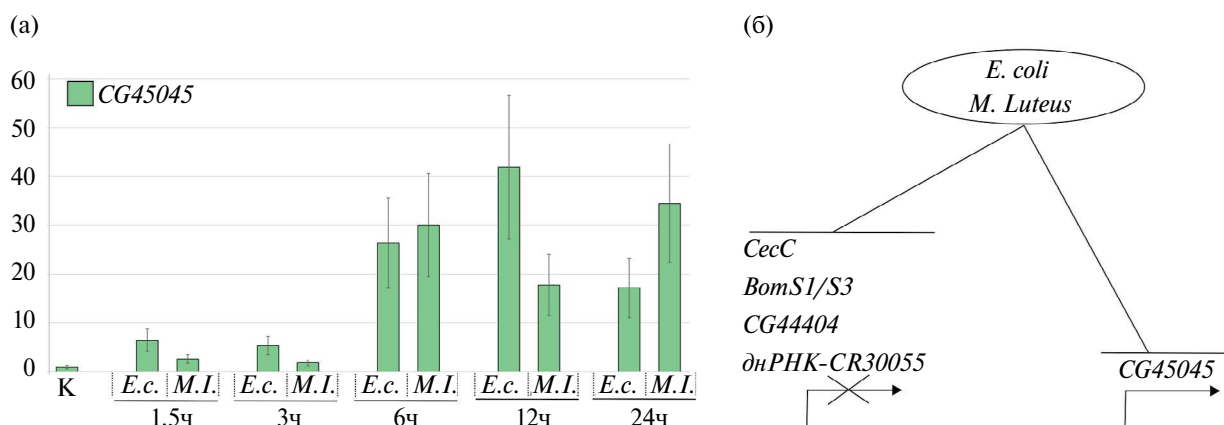
в пути Toll [9]. Нам удалось детектировать только продукт амплификации *BomS1*. Уровень транскрипции этого гена не менялся после обработки клеток S2 *E. coli* и *M. luteus* (рис. 1г). Таким образом, данные из литературы и полученные нами указывают на то, что экспрессия некоторых патоген-зависимых генов отличается в культуре клеток и во взрослых мухах. Есть несколько объяснений этому феномену.

Во-первых, это может быть связано с доминированием одного из сигнальных путей в макрофагоподобных клетках. Так, по данным FlyBase, в клетках линии S2 уровень транскрипции *Relish* существенно выше *Dif/Dorsal* [10]. Поэтому, возможно, в клетках S2 преобладающим путем активации иммунного ответа является путь IMD. Косвенно это также подтверждается экспрессией преимущественно IMD-зависимых генов АМП, таких как *CecA1* и *Dro* (рис. 1б). Во-вторых, поскольку линия клеток S2 была выведена из 20–24-часовых эмбрионов, то, возможно, иммунная система на этой стадии развития мух сформирована не полностью. При этом, вероятно, активируются гены, которые могут обеспечить эмбриону устойчивую иммунную защиту.

Ранее было показано, что уровень транскрипции гена *CG45045* практически не меняется у молодых самцов дрозофилы (0–2 дня) после инфицирования *M. luteus* [4]. В то же время наши данные свидетельствуют о существенном усилении транскрипции *CG45045* после обработки клеток S2 бактериями *E. coli* и *M. luteus* (рис. 2а). Наиболее высокий уровень активации наблюдается в интервале между 6 и 24 часами инкубации клеток S2 с патогенами (рис. 2а). Интересно, что паттерны активации *CG45045* схожи после индукции иммунного ответа как *E. coli*, так и *M. luteus*. Это может свидетельствовать о наличии общих механизмов активации

*CG45045* в клетках S2 в ответ на присутствие этих бактерий. Важно отметить, что в предыдущих исследованиях авторы анализировали уровень транскрипции *CG45045* только у молодых мух [4]. В связи с этим влияние патогенов на экспрессию *CG45045* на других стадиях развития мух остается неясным. Учитывая, что линия клеток S2 была получена из поздних эмбрионов, дальнейшие исследования должны быть направлены на изучение роли *CG45045* на эмбриональной стадии развития. Кроме того, данные базы FlyBase указывают на то, что транскрипция *CG45045* значительно усиливается у стареющих мух [10]. Высокий уровень экспрессии генов иммунного ответа на поздних стадиях развития может быть связан с хроническими воспалительными процессами, которые, в свою очередь, влияют на продолжительность жизни [11]. Поэтому изучение функций *CG45045* на поздних стадиях развития мух также представляет большой интерес.

Таким образом, мы изучили влияние инактивированных культур бактерий *E. coli* и *M. luteus* на активацию днРНК и генов, кодирующих короткие полипептиды, в клетках линии S2 (рис. 2б). В отличие от взрослых мух, в культуре клеток S2 патогены не индуцируют экспрессию генов *CG44404*, *CecC* и *BomS1/S3*. При этом нам удалось частично подтвердить результаты предварительного транскриптомного анализа, а именно то, что патогены стимулируют активацию только *CG45045*, тогда как уровень транскрипции *днРНК-CR30055* практически не изменился. Ввиду актуальности поиска и анализа новых потенциальных регуляторов, вовлеченных в иммунный ответ, в дальнейшем предстоит более детально изучить влияние патогенов на механизмы активации этих генов на различных стадиях развития мух.



**Рис. 2.** Уровень транскрипции *CG45045* и модель активации этого и других генов в культуре клеток S2. (а) Клетки были обработаны инактивированными культурами *E. coli* (*E.c.*) и *M. luteus* (*M.l.*). Активацию транскрипции анализировали в следующих точках: К – 0 часов (ч), 1.5 ч, 3 ч, 6 ч, 12 ч и 24 ч. Приведены средние значения и стандартные отклонения для трех независимых экспериментов. Активация рассчитана относительно К. Отличие является статистически значимым для *CG45045* во всех точках ( $p < 0.05$ ), кроме 1.5 ч и 3 ч. (б) Схематическая иллюстрация воздействия бактерий на транскрипцию патоген-зависимых генов в культуре клеток S2.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Количественный анализ транскриптов проводили с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00567.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эта статья не содержит экспериментов с участием животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Govind S., Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways, *Insect science*, 15 (2008) 29–43.
2. Buchon N., Silverman N., Cherry S. Immunity in *Drosophila melanogaster* – from microbial recognition to whole-organism physiology, *Nature reviews. Immunology*, 14 (2014) 796–810. doi: 10.1038/nri3763
3. Westlake H., Lemaitre M.A. В *The Drosophila Immunity Handbook* EPFL Press 2024.
4. Valanne S., Salminen T.S., Järvelä-Stöling M. et al., Immune-inducible non-coding RNA molecule lincRNA-IBIN connects immunity and metabolism in *Drosophila melanogaster*, *PLoS pathogens*, 15 (2019) e1007504.
5. Atianand M.K., Fitzgerald K.A. Long non-coding RNAs and control of gene expression in the immune system, *Trends in molecular medicine*, 20 (2014) 623–631.
6. Zhou H., Ni J., Wu S. et al., lncRNA-CR46018 positively regulates the *Drosophila* Toll immune response by interacting with Dif/Dorsal, *Developmental and comparative immunology*, 124 (2021) 104183.
7. Leulier F., Parquet C., Pili-Floury S. et al. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition, *Nature immunology*, 4 (2003) 478–484.
8. Kaneko T., Golenbock D., Silverman N. Peptidoglycan recognition by the *Drosophila* Imd pathway, *Journal of endotoxin research*, 11 (2005) 383–389.
9. Lindsay S.A., Lin S.J.H., Wasserman S.A. Short-Form Bomanins Mediate Humoral Immunity in *Drosophila*, *Journal of innate immunity*, 10 (2018) 306–314.
10. Gramates L.S., Agapite J., Attrill H., et al. FlyBase: a guided tour of highlighted features, *Genetics*, 220 (2022).
11. Hanson M.A., Lemaitre B. Antimicrobial peptides do not directly contribute to aging in *Drosophila*, but improve lifespan by preventing dysbiosis, *Disease models & mechanisms*, 16 (2023).

## ESCHERICHIA COLI AND MICROCOCCUS LUTEUS BACTERIA ACTIVATE THE CG45045 GENE IN THE DROSOPHILA S2 CELL LINE

**Yu. A. Polunina, A. E. Pravednikova, M. Gassa, Academician of the RAS P. G. Georgiev, Yu. V. Shidlovsky, Z. M. Kachaev\***

*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

*\*e-mail: k-z-m@mail.ru*

The humoral immune system of *Drosophila*, the most studied among eukaryotes, is activated by the canonical IMD and Toll signaling pathways. Recently, new potential regulators of the innate immune response have been identified, such as long non-coding RNAs (lncRNAs) and genes encoding short polypeptides. S2 cells, being a macrophage-like cell line, are used as a model system to study the molecular mechanisms of immune response gene activation. We used this cell line to analyze the effect of *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* bacteria on the transcription of lncRNA-CR30055 and the CG45045 and CG44404 genes encoding short polypeptides. It was found that pathogens activate only CG45045, while the transcription levels of CR30055 and CG44404 remain unchanged. No activation of the Cecropin C gene and some Bomanin family genes was observed, indicating differences in the activation patterns of immune response genes in S2 cells and adult flies. The highest activation of CG45045 was observed between 6 and 12 hours of cell incubation with pathogens. The patterns of CG45045 activation after exposure to *E. Coli* and *M. Luteus* were similar, which may indicate common mechanisms of transcriptional activation of this gene. Thus, CG45045 may be a novel gene involved in the humoral immune response of *Drosophila*.

**Keywords:** innate immunity, polypeptide, lncRNA, IMD, Toll