

Роль посттранскрипционной регуляции экспрессии гена, кодирующего протеинкиназу GSK3, в контроле тканевого гомеостаза и выживания *Drosophila melanogaster*

Андреев Ю.А.*, Пасюкова Е.Г.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

* y.andreev96@yandex.ru

Ключевые слова: гомеостаз; выживание; жировая ткань; GSK3; *Drosophila melanogaster*

Мотивация и цель: В результате вредных воздействий, а также в ходе старения происходит нарушение гомеостаза, в том числе изменяется экспрессия генов и вследствие этого внутриклеточная регуляция биохимических процессов. Контролируемое точечное нарушение гомеостаза может позволить подробнее изучить процессы, происходящие в процессе старения и развития патологий. Киназа гликогенсинтазы GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) представляет собой высококонсервативный фермент, являющийся ключевым звеном множества метаболических путей. Описана важная роль GSK3 в развитии различных патологических состояний, таких как болезнь Альцгеймера, диабет, воспалительные заболевания и некоторые виды рака. Целью данной работы была оценка влияния сверхэкспрессии нормальной и измененных форм GSK3 на выживание *D. melanogaster* и сохранение гомеостаза различных тканей, таких как жировое тело и слюнные железы.

Методы и алгоритмы: У *D. melanogaster* протеинкиназу GSK3 кодирует ген *shaggy* (*sgg*). Сверхэкспрессия GSK3 достигалась путем тканеспецифической индукции трансгенов, кодирующих нормальную изоформу GSK3B (*sggB*) и изоформу GSK3B с аминокислотными заменами, приводящими к нарушению внутриклеточной регуляции активности GSK3 (*sggB_S9A*), снижению активности GSK3 (*sggB_Y214F*) и появлению неактивной GSK3 (*sggB_A81T*) [1]. Для индукции трансгенов использовали бинарную систему GAL4-UAS [2]. Сверхэкспрессию трансгенов индуцировали в жировом теле и слюнных железах личинок. Количество транскрипта *sgg* оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Количество белка GSK3 определяли с помощью вестерн-блот анализа. Объем и количество секреторных клеток слюнных желез, площадь поперечного сечения жировых клеток определяли с помощью конфокальной микроскопии. Количество общего белка в жировом теле оценивали методом Бредфорда. Уровень гликогена в жировом теле определяли с помощью ШИК-реакции.

Результаты: В результате индукции каждого из использованных трансгенов в жировом теле личинок наблюдалось увеличение количества транскрипта *sgg*. Однако увеличение количества белка GSK3 наблюдалось только в случае сверхэкспрессии *sggB_S9A*. Снижение уровня гликогена в жировом теле, которое отражает увеличение активности GSK3, было выявлено также только в результате сверхэкспрессии *sggB_S9A*, а в случае сверхэкспрессии *sggB_Y214F* наблюдалось увеличение уровня гликогена. Количество общего белка в жировом теле, объем

слюнных желез при отсутствии изменения количества секреторных клеток снижались во всех случаях. Площадь поперечного сечения жировых клеток снижалась только в случае дополнительной экспрессии *sggB* и *sggB_S9A*. Более того, в результате сверхэкспрессии как *sggB*, так и *sggB_S9A* в жировом теле и слюнных железах максимальная продолжительность жизни была ограничена кукольной стадией p5(ii). При сверхэкспрессии *sggB_Y214F* и *sggB_A81T* развитие протекало нормально, а продолжительность жизни взрослых особей, как было показано ранее [3], изменялась.

Обсуждение и выводы: Отсутствие увеличения количества белка GSK3 при возросшем в результате индукции трансгенов количестве транскрипта гена *sgg* в жировом теле может быть связано с посттранскрипционной регуляцией экспрессии трансгенов клеточными факторами. Обращает на себя внимание тот факт, что сверхэкспрессия *sggB_S9A*, если и регулируется посттранскрипционно, то в меньшей степени, чем остальные трансгены. Показано, что в клетках эпителиальной опухоли молочной железы замена серина на аланин в 9 положении (S9A) GSK3 приводит к нарушению протеасомной деградации этого белка [4]. Можно предположить, что и в наших опытах по крайней мере одним из механизмов посттранскрипционной регуляции количества GSK3 является протеасомная деградация, которая не затрагивает белок с заменой S9A. Известно, что замена S9A нарушает регуляцию активности GSK3 другими протеинкиназами клетки. Фосфорилирование серина 9 делает возможным взаимодействие N-концевого участка GSK3 с сайтом ее связывания с праймированными сериновыми остатками белков-мишеней. В результате сайт связывания и, следовательно, активность GSK3 в отношении мишеней, требующих праймирования, могут быть заблокированы. Замена серина на аланин приводит к тому, что GSK3 сохраняет постоянную активность в отношении таких мишеней, к которым относится и гликогенсинтаза. Тот факт, что снижение уровня гликогена в жировом теле было выявлено только при сверхэкспрессии *sggB_S9A*, но не других форм, можно объяснить как увеличением количества GSK3, которое наблюдалось только в этом случае, так и конститутивной активностью этой формы белка. Увеличение количества гликогена в результате сверхэкспрессии *sggB_Y214F* указывает на снижение суммарной внутриклеточной активности GSK3 в отношении гликогенсинтазы в этом случае. Известно, что фосфорилирование тирозина в положении 214 увеличивает активность GSK3 [5], следовательно, замена Y214F снижает активность белка, кодируемого трансгеном. Снижение суммарной активности GSK3 в клетке подтверждает ранее высказанное предположение о том, что трансген *sggB_Y214F* может проявлять отдельные свойства конструкции с доминантным негативным эффектом [1]. Однако причина того, почему сверхэкспрессия *sggB_A81T*, эффект которой тоже, предположительно, является доминантно негативным [1], не оказала подобного влияния на уровень гликогена, остается не ясной.

Известно, что протеинкиназа GSK3 фосфорилирует и тем самым инактивирует фактор инициации трансляции eIF6 [6], что может объяснять снижение количества общего белка в жировом теле. Фосфорилирование eIF6 не требует праймирования [6], поэтому эффект активации экспрессии всех трансгенов оказался одинаковым. Уменьшение размера клеток жирового тела, а также объема слюнных желез можно объяснить влиянием сверхэкспрессии *sgg* на активность TOR пути [7], участвующего в контроле роста клеток. Причины различного влияния

сверхэкспрессии разных трансгенов на выживание на кукольной стадии неясны и требуют дальнейшего изучения. Однако прежде всего необходимо понять, почему совокупность эффектов сверхэкспрессии *sgg* наблюдается при отсутствии детектируемого увеличения количества белка GSK3. Возможно, для этого достаточно очень небольшого избытка GSK3, который не удастся выявить методом вестерн-блот анализа.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке государственного бюджета Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Impact of post-transcriptional regulation of expression of the gene encoding GSK3 protein kinase in the control of tissue homeostasis and survival in *Drosophila melanogaster*

Andreev Y.A.*, Pasyukova E.G.

National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

* y.andreev96@yandex.ru

Key words: homeostasis; survival; adipose tissue; GSK3; *Drosophila melanogaster*

Motivation and Aim: Exposure to harmful stimuli as well as aging can disrupt homeostasis, leading to changes in gene expression and subsequent intracellular regulation of biochemical processes. Controlled disruption of homeostasis could provide a more detailed understanding of the processes occurring during aging and the development of pathologies. Glycogen synthase kinase (GSK3) is a highly conserved enzyme that plays a key role in numerous metabolic pathways. GSK3 has been implicated in the development of various pathological conditions such as Alzheimer's disease, diabetes, inflammatory diseases, and certain types of cancer. The aim of this study was to assess the impact of overexpression of normal and altered forms of GSK3 on the survival of *D. melanogaster* and the maintenance of homeostasis in different tissues such as the fat body and salivary glands.

Methods and Algorithms: In *D. melanogaster*, the protein kinase GSK3 is encoded by the gene *shaggy* (*sgg*). Overexpression of GSK3 was achieved through tissue-specific induction of transgenes encoding the normal isoform of GSK3B (*sggB*) and isoform GSK3B with amino acid substitutions leading to disruption of intracellular regulation of GSK3 activity (*sggB_S9A*), reduction in GSK3 activity (*sggB_Y214F*) and generation of inactive GSK3 (*sggB_A81T*) [1]. Transgenes were induced using the binary GAL4-UAS system [2]. Overexpression of transgenes was induced in the fat body and salivary glands of larvae. The amount of *sgg* transcript was evaluated using quantitative real-time PCR. The level of GSK3 protein was determined using Western blot analysis. The volume and number of secretory cells in the salivary glands, cross-sectional area of fat cells were determined using confocal microscopy. Total protein content in the fat body was assessed using the Bradford method. The level of glycogen in the fat body was determined using the PAS (Periodic Acid-Schiff) reaction.

Results: Induction of each of the transgenes used in the fat body of larvae resulted in an increase in the amount of *sgg* transcript. However, an increase in the level of GSK3 protein was observed only in the case of overexpression of *sggB_S9A*. A decrease in the level of glycogen in the fat body, reflecting an increase in GSK3 activity, was also detected only as a result of overexpression of *sggB_S9A*, while overexpression of *sggB_Y214F* led to

an increase in the level of glycogen. The total protein content in the fat body, and the volume of the salivary glands, in the absence of changes in the number of secretory cells, decreased in all cases. The cross-sectional area of fat cells was reduced only in the case of additional expression of *sggB* and *sggB_S9A*. Furthermore, as a result of overexpression of both *sggB* and *sggB_S9A* in the fat body and salivary glands, the maximum lifespan was limited to the p5(ii) pupal stage. With overexpression of *sggB_Y214F* and *sggB_A81T*, development proceeded normally, but the lifespan of adult individuals, as previously shown [3], was altered.

Discussion and Conclusions: The lack of an increase in the level of GSK3 protein with the increased amount of *sgg* gene transcript induction in the fat body may be related to post-transcriptional regulation of transgene expression by cellular factors. It is noteworthy that the overexpression of *sggB_S9A*, if post-transcriptionally regulated, appears to be to a lesser extent than the other transgenes. It has been demonstrated that in breast epithelial tumor cells, the substitution of serine with alanine at position 9 (S9A) in GSK3 disrupts proteasomal degradation of this protein [4]. It can be hypothesized that, in our experiments, at least one of the mechanisms of post-transcriptional regulation of GSK3 levels could involve proteasomal degradation, which does not affect the protein with the S9A substitution. It is known that the S9A substitution disrupts the regulation of GSK3 activity by other protein kinases within the cell. Phosphorylation of serine 9 enables the N-terminal region of GSK3 to interact with the site of primed serine residues of target proteins. As a result, the binding site and hence the activity of GSK3 towards primed targets may be blocked. The substitution of serine with alanine leads to GSK3 maintaining a constant activity towards such targets, including glycogen synthase. The fact that a decrease in the level of glycogen in the fat body was observed only with the overexpression of *sggB_S9A*, but not with other forms, can be explained by both the increase in the amount of GSK3, which was only observed in this case, and the constitutive activity of this form of the protein. Increase in glycogen levels resulting from overexpression of *sggB_Y214F* indicates a decrease in the overall intracellular activity of GSK3 towards glycogen synthase in this case. It is known that phosphorylation of tyrosine at position 214 enhances GSK3 activity [5], therefore, the substitution Y214F reduces the activity of the protein encoded by the transgene. The decrease in the total activity of GSK3 in the cell confirms the previously stated assumption that the *sggB_Y214F* transgene may exhibit individual properties of the construct with a dominant negative effect [1]. However, the reason why overexpression of *sggB_A81T*, the effect of which is also presumably dominant negative [1], did not have a similar effect on glycogen levels remains unclear.

It is known that the protein kinase GSK3 phosphorylates and thereby inactivates the translation initiation factor eIF6 [6], which may explain the decrease in the total protein content in the fat body. Phosphorylation of eIF6 does not require priming [6], hence the effect of activation of the expression of all transgenes was identical. The reduction in the size of fat body cells and salivary gland volume can be explained by the influence of *sgg* overexpression on the activity of the TOR pathway [7], which is involved in cell growth control. The reasons for the different effects of overexpression of different transgenes on survival at the pupal stage are unclear and require further investigation. However, it is essential to understand first and foremost why the combination of effects of *sgg* overexpression is observed in the absence of detectable increase in GSK3 protein levels. It is possible that this could be due to a very slight excess of GSK3, which cannot be detected by Western blot analysis.

Funding: The work was carried out within the state assignment of NRC “Kurchatov Institute”.