На правах рукописи

КАТКОВА-ЖУКОЦКАЯ

Ольга Александровна

Нематоды *Caenorhabditis elegans* как модель для изучения влияния генетического контроля метаболизма микробиоты на продолжительность жизни хозяина

1.5.7 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории генетической регуляции метаболических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетической регуляции метаболических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук — **Миронов Александр Сергеевич**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики Московского физико-технического института (национального исследовательского университета) — **Манухов Илья Владимирович**

кандидат биологических наук (по специальности генетика), доцент, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией №2 АО Научно-исследовательский институт «Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ») — **Закатаева Наталия Павловна**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Защита состоится «___» _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии Наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3. Тел./факс (499) 132-89-62.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. (499) 135-14-31.

Автореферат разослан «____» _____2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук — Горячева Ирина Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень разработанности темы исследования. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) – свободноживущие почвенные нематоды, питающиеся микроорганизмами.

Начало XXI века можно считать «эпохой *Caenorhabditis elegans*». Ряд открытий, совершенных при помощи *C. elegans,* были удостоены Нобелевских премий. Нематоды, геном которых был полностью секвенирован в 1998 году [*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998], стали традиционным модельным организмом для разнообразных генетических, биохимических, медицинских и биогеронтологических исследований. Благодаря биоинформационным подходам, выявлена высокая степень гомологии генов нематод с генами человека [Helmcke et al., 2010]. Наряду с линией *C. elegans* дикого типа N2 Bristol, являющейся стандартной для большинства исследований, существует большое количество мутантных по различным генам линий.

C. elegans – прекрасная модель для изучения различных биологических процессов, включая энергетический метаболизм [Jones et al., 2009], иммунитет [Schulenburg et al., 2004] и старение [Kenyon, 2010]. В лабораторных условиях нематоды растут, питаясь газоном бактериальной культуры, но ранее в исследованиях не учитывалось, что они используют активно метаболизирующие бактерии. В течение длительного периода бактериальной подложке не придавали значения и не рассматривали ее как важный фактор, влияющий на продолжительность жизни особей. Однако живые бактерии представляют собой как основной источник пищи, так и комменсальную кишечную микрофлору нематод в природных и лабораторных условиях, и могут существенно влиять на жизнедеятельность организма-хозяина [Larsen et al., 2002].

За последние десятилетия значительно расширился спектр исследований влияния метаболических процессов, протекающих в бактериях, на жизнедеятельность *C. elegans*. Сотрудники нашей лаборатории принимают активное участие в изучении влияния бактериального метаболизма на нематод. Одной из первых работ по данной тематике стало исследование положительного влияния оксида азота, синтезируемого бактериями, на продолжительность жизни и термотолерантность *C. elegans* [Gusarov et al., 2013]. Это исследование представляет собой пример межвидовой сигнализации с помощью небольшой молекулы и иллюстрирует важное значение комменсальных бактерий для организма-хозяина. В последующие годы различные аспекты взаимосвязи бактериального метаболизма и жизнедеятельности *C. elegans* стали предметом активного изучения.

Настоящая работа посвящена исследованию различных путей влияния метаболизма микробиоты на продолжительность жизни хозяина с использованием комбинированной межвидовой модели «*C. elegans* – бактерия», сочетающей в себе преимущества нематод и бактерий как модельных систем.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы – изучение различных аспектов влияния метаболизма микробиоты на продолжительность жизни хозяина с использованием межвидовой модели «*C. elegans* – бактерия».

В соответствии с поставленной целью сформулированы следующие задачи:

1. Изучение влияния метаболизма *Bacillus subtilis* на продолжительность жизни и термотолерантность *C. elegans* через оксид азота.
2. Определение влияния антиоксидантов и мутаций в генах, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, на жизнедеятельность организма-хозяина.
3. Изучение механизмов ингибирующего действия глюкозы на продолжительность жизни нематод.
4. Изучение влияния экзогенного АИКАР и эндогенного АИКАР, продуцируемого штаммом *B. subtilis*, на продолжительность жизни *C. elegans.*

Теоретическая значимость и научная новизна работы. Результаты проведенных исследований расширяют представление о молекулярных механизмах влияния бактериального метаболизма на жизнеспособность нематод. Продемонстрирована важная роль бактериального оксида азота в физиологии нематод, что представляет собой пример межвидовой сигнализации, а также подчеркивает большое значение комменсальных бактерий для организма-хозяина. Впервые установлено положительное влияние мутаций в генах, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, на продолжительность жизни модельных организмов, связанное с эффектом митохондриального гормезиса. Показано, что постоянное употребление экзогенных антиоксидантных добавок, в том числе полученных естественным путем из микробиоты, приводит к сокращению продолжительности жизни нематод *C. elegans,* подтверждая важную роль наличия сбалансированного уровня антиоксидантов для поддержания нормальной жизнедеятельности организма. Продемонстрировано, что наряду с сокращением продолжительности жизни, глюкоза обусловливает устойчивость нематод к действию таких оксидантов, как диамид и паракват. В результате проведенной работы впервые показано, что гликоген ответственен за сокращение продолжительности жизни нематод. Сделано заключение, что именно гликоген является ответственным за быстрое восстановление глутатиона и детоксикацию активных форм кислорода в присутствии высокой концентрации глюкозы. Полученные данные свидетельствуют о том, что умеренный окислительный стресс способствует мобилизации защитных сил организма, не функционирующих в обычных условиях. Установлено, что гликоген регулирует продолжительность жизни нематод независимо от DAF-16. Исследована роль АМФ-зависимой протеинкиназы (AMPK) в регуляции продолжительности жизни *C. elegans*. Впервые продемонстрировано, что регуляторный метаболит АИКАР увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* и обладает геропротекторным эффектом. Полученный штамм-продуцент АИКАР *B. subtilis*, обладающий свойствами пробиотика, значительно увеличивает продолжительность жизни

C. elegans AMPK-зависимым образом. Полученные результаты существенно углубляют знания о роли метаболической активности микробиоты в жизнедеятельности организма-хозяина.

Основные положения работы, выносимые на защиту

1. Оксид азота, продуцируемый бактериями *B. subtilis*, оказывает положительное влияние на жизнедеятельность нематод *C. elegans*, увеличивая термотолерантность и продолжительность жизни особей.
2. Инактивация генов *cyoA* и *cydA* бактерий *E. coli*, нарушающих активность терминальных оксидаз *bo'* и *bd*-I, способствует увеличению продолжительность жизни *C. elegans*.
3. Постоянное употребление экзогенных антиоксидантных добавок приводит к сокращению продолжительности жизни нематод *C. elegans*. Ограничение потребления диетических тиолов, включая те, которые получены естественным путем из микробиоты, увеличивает продолжительность жизни особей.
4. Гликоген ответственен за устойчивость к оксидантам и сокращение продолжительности жизни нематод в условиях высокого потребления глюкозы.
5. На модели *C. elegans* регуляторный экзогенный метаболит АИКАР обладает геропротекторным эффектом, увеличивая продолжительность жизни особей на 13%. Значительно большее увеличение продолжительности жизни нематод (на 62%) наблюдается при их культивировании на газоне штамма-пробиотика *B. subtilis*, продуцирующего АИКАР. Добавление экзогенного или эндогенного АИКАР не влияет на жизнедеятельность мутантной линии нематод с инактивированным геном *aak-2*, что свидетельствует об участии AMPK-зависимого пути в контроле продолжительности жизни.

Личное участие автора. Все основные результаты получены лично автором, либо при его участии в планировании и проведении экспериментов. Эксперименты по транскриптомике проводились совместно с сотрудниками лаборатории Е.А. Нудлера Медицинского Центра Нью-Йоркского университета (США). Автор лично участвовал в планировании и проведении всех экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, формулировке выводов, подготовке публикаций и представлении результатов на конференциях. Работа по теме диссертации была поддержана грантом №14.Z50.31.0014 Минобрнауки РФ.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований, 1 патент и 3 тезиса докладов.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на конференциях: International Conference «Biomedical Innovation for Healthy Longevity» (Санкт-Петербург, 2016 г.), 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2018 г.), Конгресс «VII съезд ВОГиС, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург, 2019 г.).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 117 страницах машинописного текста, содержит 35 рисунков, 12 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения экспериментальных данных, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, а также списка цитируемой литературы, включающего 254 источник (из них – 243 на английском языке). Работа содержит Приложение, включающее 1 объемную таблицу.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы содержит четыре подглавы, посвященные общей характеристике нематод *Caenorhabditis elegans*, а также их роли в качестве модельного объекта для биогеронтологических исследований, изучения взаимосвязи продолжительности жизни и стрессоустойчивости. Рассмотрены возможности перспективы использования межвидовой биологической модели «*C. elegans* – бактерия» для изучения механизмов взаимодействия «хозяин-микробиота».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные в работе штаммы бактерий и нематод *C. elegans*, а также их генетические характеристики представлены в Таблице 1.

Таблица 1

Использованные в работе штаммы бактерий и нематод *C. elegans*

Штамм	**Генотип**	**Происхождение/ источник**
1	2	3
Бактерии:		
E. coli:		
K-12 MG1655	F- λ- *ilvG- rfb-50 rph-1*	[Jensen, 1993]
MG1655 *cyoA::kan*	Как K-12 MG1655, но *cyoA*, Km^R	Данная работа
MG1655 *cydA::kan*	Как K-12 MG1655, но *cydA*, Km^R	Данная работа
MG1655 *cyoA::kan cydA::kan*	Как K-12 MG1655, но *cyoA, cydA*, Km^R	Данная работа
OP50	*ura*$^-$	[Gusarov et al., 2013]
TG1	*thi supE hsd*Δ*5* Δ*(lac-proAB*)/F'*tra* Δ*36 proAB(+) lacI(q) lacZ* ΔM15	[Лобанов и др., 2011]

HT 115	F-, *mcrA, mcrB,* IN(*rrnD-rrnE*)1, *rnc14*::Tn10(DE3 lysogen: *lacUV5* pT7pol. Tc^R	Коллекция Thermo Scientific
HT 115 e.v.	Как HT 115, но содержит пустой векторный контроль плазмиды (pL4440)	Коллекция Thermo Scientific
HT 115 gsy-1	Как HT 115, но содержит плазмиду, экспрессирующую двухцепочечные фрагменты антисмысловых РНК против гена *gsy-1 C. elegans*	Коллекция Thermo Scientific
HT 115 pyg-1	Как HT 115, но содержит плазмиду, экспрессирующую двухцепочечные фрагменты антисмысловых РНК против гена *pyg-1 C. elegans*	Коллекция Thermo Scientific
B. subtilis:		
B. subtilis 168 wt	*trpC (trp⁻)*	[Spizizen, 1958]
B. subtilis Δ*nos*	*trpC2 nos::spc,* Spc^R	[Gusarov et al., 2013]
B. subtilis Mu8u5u6	*leu met purF*	[Yoshikawa, Sueoka, 1963]
B. subtilis AM1182	*purF* (получен как вариант Leu^+ Met^+ от Mu8u5u6 *leu met ade*)	Данная работа
B. subtilis AM815	*purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::*[P_{rpsF}-prs_E-$purF_E$]	[Лобанов и др., 2011]
B. subtilis AM878	*purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::*[P_{rpsF}-prs_E-$purF_E$] P_{rpsF}*::zwf*	Данная работа
B. subtilis AM890	*purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::*[P_{rpsF}-prs_E-$purF_E$-$udhA_E$] P_{rpsF}*::zwf*	Данная работа
B. subtilis AM2020 АИКАР↑	*purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::*[P_{rpsF}-prs_E-$purF_E$-$udhA_E$] P_{rpsF}*::zwf* Δ*sacB*	Данная работа
Плазмиды:		
pLE1	Производная плазмиды pKS1. Репликон pG+, (EmR)	[Shatalin, Neyfakh, 2005]
pDG268	Интеграционный вектор, содержащий 5' и 3' области гена *amyE*	[Stragier et al., 1988]
Нематоды *C. elegans*:		
N2 Bristol	Дикий тип	Caenorhabditis Genetics Center
aak-2	TG38 (aak-2(gt33)) (делеция в гене *aak-2*); *aak-2*(*ok524*)	Caenorhabditis Genetics Center
daf-2	CB1370 (daf-2(e1370) III)	Caenorhabditis Genetics Center
daf-16	CF1038 (daf-16 (mu86) I)	Caenorhabditis Genetics Center
daf-2 daf-16	HT1890 (daf- 16(mgDf50) I; daf-2(e1370) III)	Caenorhabditis Genetics Center
clk-1	MQ130 (clk-1 (qm30) III)	Caenorhabditis Genetics Center
hsf-1	PS3551 (hsf-1 - (sy441) I)	Caenorhabditis Genetics Center

Манипуляции с плазмидной ДНК. Выделение ДНК, клонирование, трансформация в клетки *E. coli* и анализ рекомбинантных плазмид выполнялись стандартными методами [Maniatis et al., 1982]. Выделение ДНК *B. subtilis*, очистку и трансформацию *B. subtilis* и отбор проводили, как описано ранее [Anagnostopoulos, Spizizen, 1961; Saito, Miura, 1963].

Получение мутантных штаммов *E. coli* MG1655 *cyoA::kan*, *E. coli* MG1655 *cydA::kan*, *E. coli* MG1655 *cyoA::kan cydA::kan*. Для получения мутантных штаммов в геном штамма *E. coli* MG1655 с помощью трансдукции фагом P1 переносили инсерции *cyoA::kan* и *cydA::kan* из штаммов коллекции Keio [Baba et al., 2006]. Трансдукцию проводили по стандартной методике [Miller, 1972]. Культуру клеток *E. coli* растили в LB бульоне в течение 12 часов при температуре 37°C. Клетки осаждали, дважды промывали 0.025M $CaCl_2$. К полученному препарату клеток добавляли лизат фага P1 нужного разведения (10^9 фаговых частиц/мл), инкубировали в течение 20 мин при температуре 37°C и высевали на чашки с селективной средой. Отбор трансдуктантов проводили методом реплик.

Конструирование штамма-продуцента АИКАР. В качестве исходного материала для конструирования высокоактивного штамма-продуцента АИКАР использовали полученный ранее штамм *B. subtilis* АМ815 [Лобанов и др., 2011]. Для увеличения продукции АИКАР-Ф необходимо было усилить экспрессию генов, вовлеченных в биосинтез пуриновых нуклеотидов, которые в геноме *B. subtilis* объединены в *pur*-оперон. Поэтому на первом этапе работы был инактивирован репрессор пуринового оперона (ген *purR*), а также удален аттенюатор рибопереключателя, расположенный в лидерной области *pur*-оперона. Затем был сконструирован синтетический оперон, содержащий гены *prs, purF и udhA E. coli* под контролем сильного рибосомного промотора P_{rpsF}. Для усиления экспрессии G6PD кодирующий ее ген *zwf* был подставлен под контроль сильного промотора P_{rpsF}. Кроме того, чтобы предотвратить расход глюкозы на путь биосинтеза левана, была проведена инактивация гена *sacB*. Наконец, было заблокировано преобразование АИКАР в IMP путем инактивации в составе *pur*-оперона гена *purH*, кодирующего фосфорибозиламиноимидазолкарбоксамид формилтрансферазу, что приводило к существенному накоплению АИКАР в культуральной жидкости при выращивании полученного штамма на полноценной среде с глюкозой.

Культивирование нематод *C. elegans*. Нематод выращивали на стандартной агаризованной питательной среде NGM (Nematode Growth Media) по протоколу [Stiernagle, 2006]. В случае культивирования нематод на агаризованной полноценной среде LA в нее добавляли спиртовой раствор холестерина (в количестве, эквивалентном добавке в среду NGM). В качестве пищевого субстрата использовали моноксеническую культуру *E. coli* OP50 [Stiernagle, 2006] или других бактерий, выращенных в соответствующих условиях.

Определение продолжительности жизни нематод. Все эксперименты с нематодами проводили при температуре 20°C, как описано ранее [Apfeld, Kenyon, 1999; Dillin et al., 2002] (если особо не указано иное). Во всех случаях за начальную точку t=0 принимали возраст нематод L4. Численность особей контролировали ежедневно. Использованное количество нематод в опыте – не менее 100 особей на точку. Пересадку нематод осуществляли через день на аналогичные среды в течение всего эксперимента. Животные считались мертвыми, когда они прекращали глоточную перекачку и не реагировали на касание платиновой проволокой. Особей с внутренним вылуплением яиц удаляли из чашек и не включали в расчеты продолжительности жизни. Продолжительность жизни нематод оценивалась путем определения временного интервала, который соответствует выживаемости 50% популяции (средняя (срединная) продолжительность жизни – СПЖ). Все эксперименты повторяли как минимум три раза. Построение графиков и их обработка методом сигмоидальной аппроксимации экспериментальных данных проводились с использованием программного пакета статистического анализа SciDAVis 0.2.1. Все графики продолжительности жизни представляют собой совокупность всех независимых экспериментов. Значение p-критерия рассчитывали в Microsoft Excel по отношению к контрольным особям в том же эксперименте с использованием t-критерия Стьюдента (двустороннее распределение, парный) (если не указано иное) [Gusarov et al., 2021]. Значения $p<0.05$ считались значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1 Продуцируемый бактериями оксид азота увеличивает продолжительность жизни и термотолерантность нематод *C. elegans*

В многоклеточных организмах оксид азота (NO) является сигнальной молекулой и обладает множеством важных функций. Большинство животных продуцируют оксид азота из L-аргинина под контролем семейства специализированных ферментов, известных как NO-синтазы (NOS). Нематоды *C. elegans* являются исключением и не имеют собственных NOS, однако в своей естественной среде они питаются бациллами, обладающими функциональными NOS.

Известно, что нематоды, культивируемые на газоне *B. subtilis,* характеризуются заметно большей продолжительностью жизни по сравнению с таковой при их выращивании на газоне *E. coli*. В отличие от *B. subtilis,* бактерии *E. coli,* как и нематоды, не имеют собственной активной NOS. Мы предположили, что более высокая продолжительность жизни нематод на газоне *B. subtilis* связана с позитивным действием выделяемого этими бактериями оксида азота на жизнеспособность особей.

Для проверки данного предположения был инактивирован ген *nos* в геноме *B. subtilis* (*B. subtilis Δnos*) и проведено сравнение продолжительности жизни

нематод при их культивировании на этом мутанте и родительском штамме *B. subtilis* дикого типа (*B. subtilis* wt).

Изучение влияния штаммов *B. subtilis Δnos* на продолжительность жизни нематод. Для подавления спорообразования и создания условий для оптимальной продукции NO в стандартную для культивирования нематод среду NGM добавляли глюкозу (2%) и аргинин (0.5 мМ) (NGMga). Культивирование нематод на газоне бактерий, выращенных на этой среде, выявило существенное различие в продолжительности жизни нематод – на мутантном штамме *B. subtilis Δnos* она сократилась на 14.74% (Рисунок 1.1).

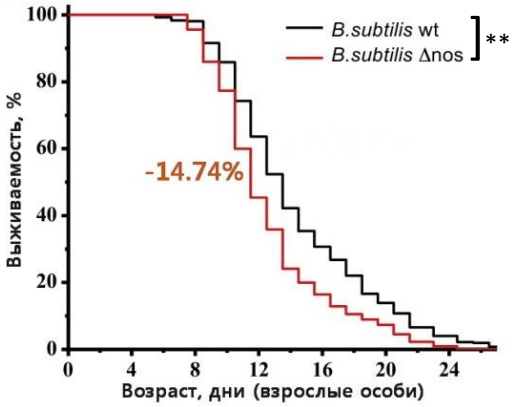

Рисунок 1.1 – Влияние бактериального NO на продолжительность жизни *C. elegans* N2 (среда NGMga). Отсутствие бактериального NO снижает продолжительность жизни *C. elegans*. Нематод выращивали на чашках со средой NGMga, засеянных штаммом *B. subtilis* Δ*nos* или *B. subtilis* wt. На графике представлены средние значения из трех независимых экспериментов. **p<0.01

NO-зависимое увеличение продолжительности жизни нематод зависит от активности глобальных регуляторов *daf-16* и *hsf-1*. Продолжительность жизни нематод находится под контролем нескольких сигнальных путей и транскрипционных факторов, ответственных за реакцию особей на стрессы и доступность питания [Vijg, Campisi, 2008; Kenyon, 2010]. Ингибирование инсулин-подобной сигнальной системы (ILS) и нарушения метаболизма митохондрий являются наиболее изученными факторами, которые влияют на продолжительность жизни нематод [Lakowski, Hekimi, 1996; Mukhopadhyay et al., 2006; Kenyon, 2010]. Для того, чтобы определить, вовлечен ли эффект оксида азота в функционирование одной из этих регуляторных систем, мы изучили влияние NO на поведение мутантных линий нематод *C. elegans daf-16* и *clk-1*. DAF-16 представляет собой транскрипционный фактор FOXO, который необходим для поддержания нормальной продолжительности жизни под контролем ILS [Mukhopadhyay et al., 2006; Kenyon, 2010]. Мутация *clk-1* снижает содержание и уровень синтеза убихинона в митохондриях, в результате чего происходит увеличение продолжительности жизни, замедляется развитие и нарушается клеточный цикл [Lakowski, Hekimi, 1996].

Как следует из результатов экспериментов, донор NO увеличивает продолжительность жизни мутанта *clk-1* примерно на 13% (p<0.05), но не

оказывает позитивного влияния на мутанта *daf-16*. Тестирование эффекта экзогенного NO на жизнеспособность мутанта *C. elegans* с нарушенной экспрессией гена *hsf* не выявило изменения в продолжительности жизни нематод при их культивировании на газоне *E. coli*. Также продолжительность жизни нематод на газоне *B. subtilis* wt и *B. subtilis Δnos* оказалась одинаковой на фоне инактивированного гена *hsf*. Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что позитивное действие NO на жизнеспособность нематод зависит от активности глобальных регуляторов DAF-16 и HSF-1 и полностью нивелируется при их нарушении.

Изучение влияния штаммов *B. subtilis Δnos* на термотолерантность нематод. Известно, что продолжительность жизни коррелирует со стрессоустойчивостью организма [Johnson et al., 2001; Lithgow, Walker, 2002]. В ходе работы было показано, что оксид азота играет важную роль в обеспечении термотолерантности *C. elegans*. Перед воздействием повышенных температур нематод культивировали на штаммах *B. subtilis* wt и *B. subtilis* Δ*nos* при 20°C до возраста A3 или A4 (3-й или 4-й день взрослой жизни, соответственно). При повышении температуры до 32°C или 34°C нематоды возраста A3, питавшиеся бактериями дикого типа, жили на 16.18% или 15.4% дольше (соответственно), чем особи, питавшиеся бактериями с дефицитом NOS (Рисунок 1.2А и 1.2Б). Примечательно, что разница во времени выживания увеличивалась с увеличением возраста животных (нематоды возраста A4, питавшиеся бактериями дикого типа, жили на 19% дольше, чем особи, питавшиеся бактериями с дефицитом NOS). Вероятно, данный эффект наблюдался из-за более длительного воздействия NO (Рисунок 1.2Б).

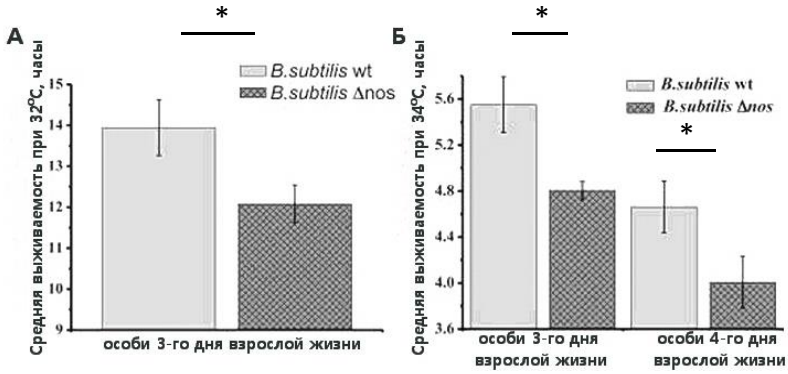

Рисунок 1.2 – Бактериальный оксид азота увеличивает термотолерантность нематод. Нематод в возрасте L4, питавшихся штаммами *B. subtilis* wt или *B. subtilis* Δ*nos,* переносили на чашки со средой NGMga и инкубировали в течение 3-х или 4-х дней при 20°C (пересадку нематод осуществляли на 2-й и 3-й дни). Затем чашки переносили на 32°C (А) или 34°C (Б) и рассчитывали среднюю выживаемость. В каждом случае на графике показана средняя выживаемость ± стандартная ошибка из более трех независимых экспериментов. *$p<0.05$.

Заключение. В настоящей работе мы продемонстрировали важную роль бактериального метаболита NO в жизнедеятельности *C. elegans*. Оксид азота, синтезируемый бактериями, диффундирует в ткани нематод и инициирует сигнальный каскад, который приводит к специфической транскрипционной реакции. Это, в свою очередь, увеличивает термотолерантность и продолжительность жизни особей (Рисунок 1.3).

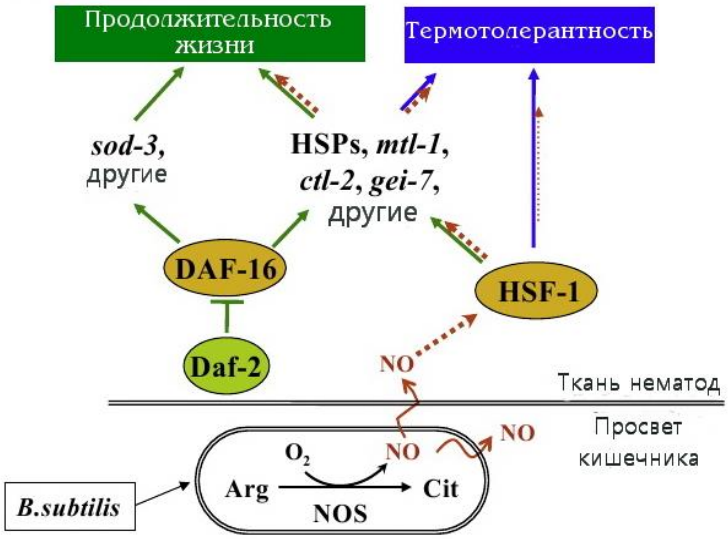

Рисунок 1.3 – Модель бактериальной передачи сигналов оксида азота у *C. elegans*. Находясь в кишечнике нематод, вегетативные *B. subtilis* продуцируют NO, индуцируя специфический ответ, зависящий от активности DAF-16 и HSF-1, и приводящий к индукции 65 генов, включая *hsps* и несколько других цитопротекторных генов (*mtl-1*, *ctl-2*, *gei-7* и T19B10.2), которые связаны с долголетием и стрессоустойчивостью [Murphy, et al., 2003; Halaschek-Wiener et al., 2005; Samuelson et al., 2007]. Предлагаемый NO-активируемый путь показан красным цветом.

Являясь сигнальной молекулой, оксид азота способен свободно диффундировать через мембраны, изменяя активность множества клеточных и внеклеточных белков [Foster et al., 2003; Thomas et al., 2008]. Эти уникальные качества NO могут способствовать раннему эволюционному возникновению передачи сигналов от бактерий к нематодам. Эукариоты, вероятно, приобрели NOS от бактерий (у последних самая древняя версия NOS) [Gusarov, Starodubtseva et al., 2008] путем горизонтального переноса гена. Также возможно, что *C. elegans* потеряли NOS из-за достаточного поступления NO от бактерий. Принимая во внимание высокую эволюционную консервативность HSF-1 и FOXO (от нематод до человека), вполне вероятно, что NO также участвует в активации цитопротекторных белков теплового шока млекопитающих и других генов. Оксид азота, полученный из микробиоты человека и пробиотиков, может вызывать положительный ответ в желудочно-кишечном тракте, аналогичный тому, который наблюдается у *C. elegans*.

2 Изучение влияния мутаций в генах, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, на продолжительность жизни нематод

На протяжении многих лет считалось общепризнанным, что энергетический метаболизм, сопровождающийся формированием активных форм кислорода (АФК), играет ключевую роль в регуляции процесса старения. Однако в последнее время традиционный взгляд на АФК как агенты, ответственные за процесс старения, изменился. Получены доказательства, что некоторый уровень АФК необходим как для нормальной жизнедеятельности, так и для увеличения продолжительности жизни [Bjelakovic et al., 2007; Yang, Hekimi, 2010; Ristow, Zarse, 2010; Lee et al., 2010; Van Raamsdonk, Hekimi, 2012; Shore, Ruvkun, 2013; Schmeisser et al., 2013].

Нематоды *C. elegans* использовались в качестве модели для исследования эффекта мутаций в генах *E. coli*, нарушающих аэробное дыхание бактерий, на продолжительность жизни особей. Были получены штаммы *E. coli* с мутациями в генах *cyoA* и *cydA*, нарушающих активность терминальных оксидаз *bo'* и *bd*-I, соответственно.

Геном *E. coli* содержит кластеры для трех цитохромоксидаз: цитохромоксидазы *bo'* (CyoABCD), цитохромоксидазы *bd-I* (CydABX) и цитохромоксидазы *bd-II* (AppCD). Эти три фермента являются основными участниками в аэробном дыхании *E. coli*. Гены цитохромоксидазы *bo'* (*cyoABCD)* экспрессируются при высоком уровне кислорода, в то время как *cydABX* работают при низких концентрациях кислорода. Оба фермента способствуют образованию «протон-движущей силы»; цитохромоксидаза *bo'* является переносчиком H^+, а цитохромоксидаза *bd-I* содержит активный центр для окисления убихинона. Цитохромоксидаза *bo'* состоит их 4-х субъединиц, кодируемых *cyoB, cyoA, cyoC* и *cyoD.*

В качестве газона для выращивания нематод использовали бактерий *E. coli* – производных штамма MG1655 дикого типа. В геном этого штамма с помощью трансдукции фагом P1 переносили инсерции *cyoA::kan* и *cydA::kan* из штаммов коллекции Keio [Baba et al., 2006].

Известно, что из-за нарушения процесса аэробного дыхания у этих мутантов наблюдается повышенный уровень генерации АФК [Brynildsen et al., 2013].

Как показано на рисунке 2.1, выращивание *C. elegans* N2 на газоне исследуемых штаммов *E. coli* MG1655 дикого типа и мутантов *cyoA::kan* и *cydA::kan (*А) и *cyoA::kan cydA::kan* (Б) приводит к увеличению продолжительности жизни нематод.

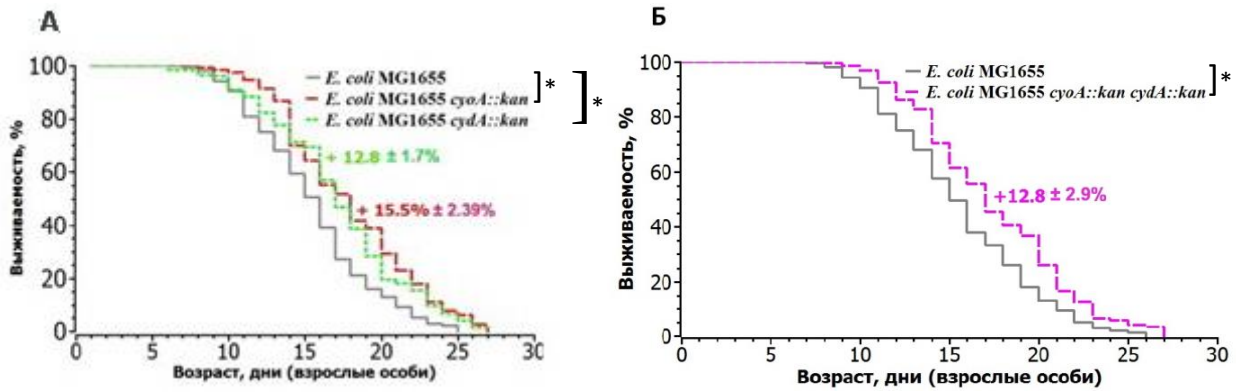

Рисунок 2.1 – Выращивание *C. elegans* на газоне штаммов *E. coli* MG1655 дикого типа и мутантов *cyoA::kan* и *cydA::kan (*А) и *cyoA::kan cydA::kan* (Б) увеличивает продолжительность жизни нематод. *C. elegans* N2 на стадии L4 пересаживали на чашки для опыта с NGM-средой в количестве не менее 100 особей на точку. Численность нематод контролировали ежедневно. *p<0.05

Результаты экспериментов показали, что, несмотря на задержку в развитии нематод до стадии L4, СПЖ взрослых особей на мутанте *cyoA::kan* увеличивалась на 15.5% по сравнению с таковой на контрольном штамме MG1655 дикого типа (Рисунок 2.1А). Культивирование нематод на газоне мутанта *cydA::kan* также приводило к положительному эффекту: по сравнению с контрольным штаммом СПЖ возрастала на 12.8% (Рисунок 2.1А). Комбинация мутаций *cyoA::kan* и *cydA::kan* в одном геноме не приводила к дальнейшему повышению СПЖ нематод (Рисунок 2.1Б). Отсутствие кумулятивного эффекта мутаций *cyoA::kan* и *cydA::kan*, возможно, связано с существенным замедлением роста таких бактерий и, вследствие этого, снижением их способности служить эффективным источником питания для нематод.

Заключение. Полученные нами результаты демонстрируют положительное влияние мутаций в генах, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, на продолжительность жизни *C. elegans*. Мы предполагаем, что увеличение продолжительности жизни нематод, наблюдаемое при их культивировании на газоне бактерий, дефектных по терминальным оксидазам, обусловлено повышенным уровнем генерации АФК в клетках этих мутантных штаммов.

3 Влияние антиоксидантов на продолжительность жизни *C. elegans*

Известно, что антиоксиданты могут защищать от токсичности АФК. Однако, как показали эксперименты по изучению влияния антиоксидантных добавок на продолжительность жизни нематод, обработка *C. elegans* глутатионом и N-ацетилцистеином не приводила к увеличению жизнеспособности особей, а напротив – вызывала ее снижение. Добавление NAC в концентрациях 5 и 15 мМ приводит к уменьшению продолжительности жизни

C. elegans на 10.7% и 27.2% соответственно. Добавление глутатиона (5 мМ) снижает продолжительность жизни нематод на 13.9% (Рисунок 3.1).

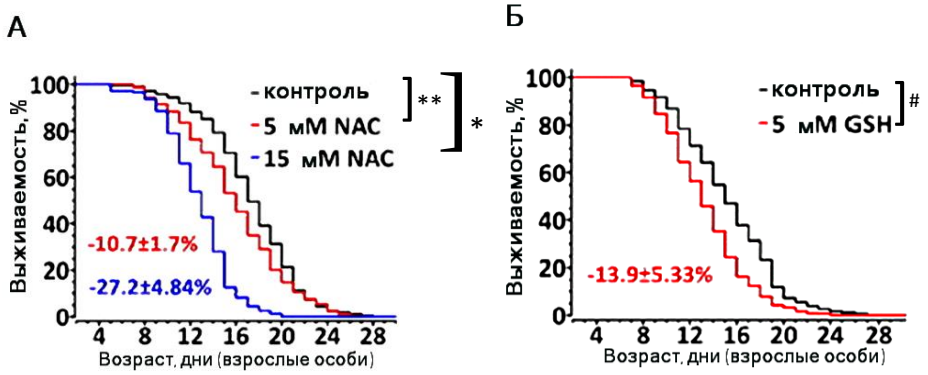

Рисунок 3.1 – Тиоловые антиоксиданты сокращают продолжительность жизни *C. elegans*. Хроническое добавление N-ацетилцистеина (NAC) (A) или глутатиона (GSH) (B) в среду NGM снижает продолжительность жизни *C. elegans* N2, выращенных на газоне живых бактерий *E. coli* OP50. *$p<0.05$, **$p<0.01$, $^{\#}p=0.1714$.

Негативное действие глутатиона на продолжительность жизни нематод подтверждается результатами опытов с ацивицином, который является ингибитором его накопления. Добавление ацивицина как на стадии яиц, так и на стадии L4, приводит к существенному увеличению продолжительности жизни *C. elegans* (на 31.7% и 18.27% соответственно, $p<0.01$).

Заключение. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что, хотя антиоксиданты и защищают организмы от действия экзогенных активных форм кислорода, их добавление в избыточных концентрациях приводит к сокращению продолжительности жизни нематод *C. elegans*. Напротив, ограничение потребления диетических тиолов, включая те, которые получены естественным путем из микробиоты, увеличивает продолжительность жизни особей.

Наши результаты демонстрируют необходимость сбалансированности уровня глутатиона для поддержания гомеостатической передачи сигналов АФК. Таким образом, для обеспечения нормальной жизнедеятельности особей требуется ограничение употребления экзогенных антиоксидантов и поддержание собственного внутреннего биосинтеза глутатиона, настроенного в соответствии с окислительно-восстановительным статусом клеток.

4 Изучение механизмов ингибирующего действия глюкозы на продолжительность жизни нематод

Нематоды *C. elegans* являются хорошей моделью для исследования эффекта глюкозы на физиологию и старение. Глюкоза играет очень важную роль в жизнедеятельности всех организмов, однако ее избыток приводит к серьезным патологиям и сокращению продолжительности жизни. Напротив, ограниченная

по калориям диета увеличивает продолжительность жизни как нематод, так и млекопитающих. Несмотря на многочисленные исследования, фундаментальные механизмы негативного эффекта глюкозы на жизнедеятельность организмов до сих пор остаются неясными.

Глюкоза обеспечивает устойчивость *C. elegans* к окислительному стрессу. Глюкоза существенно сокращает продолжительность жизни нематод *C. elegans* N2 при их выращивании на стандартной среде NGM.

Было обнаружено, что глюкоза оказывает защитное действие при обработке нематод такими известными окислителями, как диамид и паракват, индуцирующими генерацию АФК (Рисунок 4.1А). Поскольку глюкоза проявляла защитный эффект в отношении диамида и в случае использования мутантных нематод *C. elegans daf-16*, было сделано заключение, что антиоксидантное действие глюкозы осуществляется независимо от ILS-зависимого транскрипционного фактора DAF-16. Более того, снижение продолжительности жизни нематод при их культивировании в присутствии диамида супрессируется глюкозой (Рисунок 4.1Б). Совокупность полученных данных позволила сделать заключение о том, что глюкоза защищает *C. elegans* от окислительного стресса.

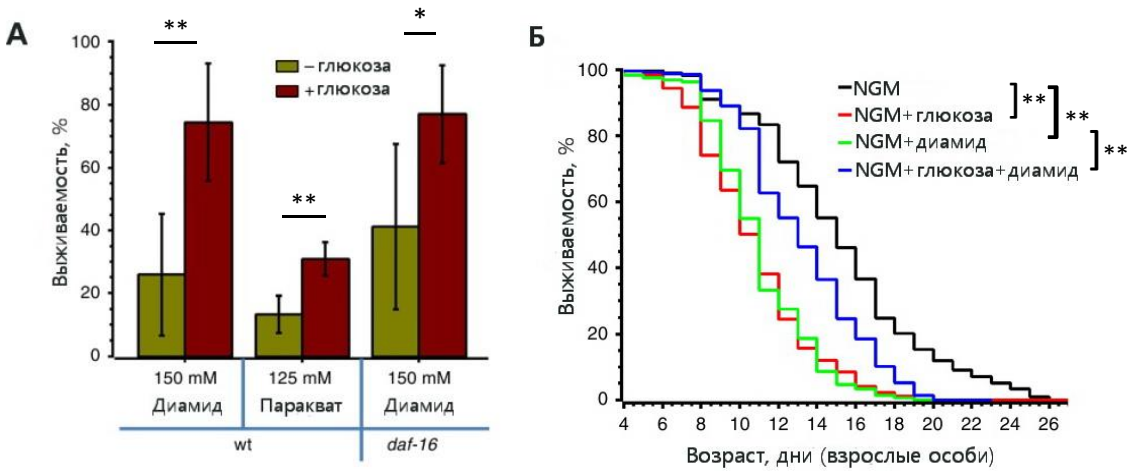

Рисунок 4.1 – Высокий уровень глюкозы в среде защищает нематод *C. elegans* дикого типа и мутантный штамм *daf-16* от действия диамида и параквата (А); негативный эффект диамида на продолжительность жизни нематод *C. elegans* wt и его супрессия в присутствии глюкозы (Б). *p<0.05, **p<0.01.

Гликоген является универсальным антиоксидантом. У большинства организмов избыток глюкозы быстро накапливается в виде гликогена (Рисунок 4.2). Синтез и фосфоролиз гликогена регулируется путем фосфорилирования с участием соответствующих ферментов (гликогенсинтазы (Gsy-1) и гликогенфосфорилазы (Pgy-1)) и не требует активации генов или синтеза ферментов *de novo*. Поэтому уровень глюкозы может быть быстро восстановлен путем ее высвобождения из гликогена.

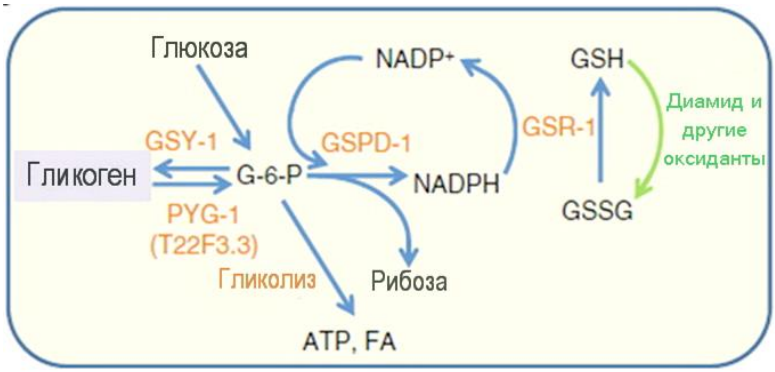

Рисунок 4.2 – Главные пути утилизации и запасания глюкозы у *C. elegans*. После попадания в клетку глюкоза фосфорилируется и используется для генерации АТФ и биосинтеза макромолекул. Избыток глюкозы запасается в клетке в виде гликогена и может превращаться в жирные кислоты. Существенная часть глюкозы используется для восстановления $NADP^+$, который необходим для последующего восстановления окисленного глутатиона и тиоредоксина. Поэтому глюкоза действует как мощный (хотя и непрямой) антиоксидант. Блокирование глутатион-восстанавливающих ферментов резко повышает чувствительность нематод к окислительному стрессу. GSY-1 – гликогенсинтаза, PYG-1 – гликогенфосфорилаза, GSPD-1 – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, GSR-1 – глутатионредуктаза, GSH – глутатион восстановленный, GSSG – глутатион окисленный.

Инактивация гена *gsy-1* с помощью антисмысловой РНК (RNAi) блокирует накопление гликогена несмотря на избыток глюкозы. В отсутствии GSY-1 нематоды становятся очень чувствительными к диамиду, и глюкоза перестает эффективно защищать особей от окислительного стресса. В соответствии с этим, инактивация гена *pyg-1* приводит к увеличению накопления гликогена, однако не обеспечивает защиты от окислительного стресса.

Таким образом, увеличение содержания гликогена является движущей силой, обеспечивающей быстрое восстановление $NADP^+$ и глутатиона, что приводит к детоксикации оксидантов у нематод.

Заключение. В настоящей работе мы показали, что накопление внутриклеточного гликогена играет принципиальную роль в сокращении продолжительности жизни в условиях высокого потребления глюкозы. На рисунке 4.3 представлена модель, объясняющая взаимосвязь между накоплением гликогена и функционированием ILS-зависимого сигнального пути [Gusarov, 2017]. Согласно модели, гликоген и ILS являются двумя различными сигнальными путями, контролирующими продолжительность жизни. При высоком содержании глюкозы в пище ILS активируется и подавляет DAF-16-зависимую транскрипцию. Одновременно накопление гликогена ингибирует активность АМРК. В совокупности это приводит к существенному сокращению продолжительности жизни. Ингибирование синтеза гликогена с помощью антисмысловой РНК (*gsy-1* RNAi) снимает ингибирование АМРК и увеличивает

продолжительность жизни нематод дикого типа и мутантов *daf-2* и *daf-16* на среде с высоким содержанием глюкозы. Из этого следует, что гликоген и DAF-16 являются независимыми факторами контроля продолжительности жизни.

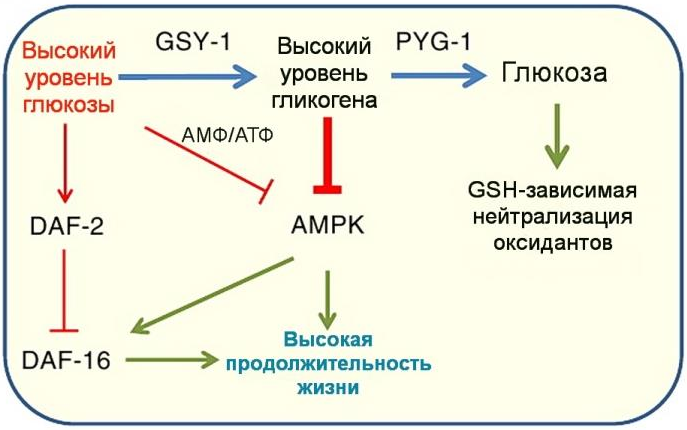

Рисунок 4.3 – Взаимосвязь между гликогеном и инсулиноподобным сигнальным контролем продолжительности жизни у *C. elegans*. При выращивании нематод на средах с высоким содержанием глюкозы активируется инсулиноподобный сигнальный путь и одновременно индуцируется процесс запасания гликогена. ILS супрессия DAF-16-опосредованной транскрипции и ингибирование AMPK гликогеном сокращает продолжительность жизни. Способствующая старению сигнальная функция гликогена преодолевает антивозрастной эффект ингибирования ILS (*daf-2*). Инактивация синтеза гликогена (*gsy-1*) предотвращает накопление гликогена, снимает ингибирование активности AMPK и увеличивает продолжительность жизни нематод дикого типа и мутантов *daf-2* и *daf-16* на среде с высоким содержанием глюкозы. Оксиданты стимулируют поток глюкозы через пентозофосфатный путь, что приводит к регенерации восстановленного глутатиона, снижают накопление гликогена и, тем самым, обеспечивают увеличение продолжительности жизни.

5 Изучение влияния АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans*

C. elegans является перспективным модельным организмом для изучения сигналов AMPK, играющей роль «индикатора энергии» и «основного метаболического переключателя». Активация AMPK увеличивает продолжительность жизни животных (от нематод до млекопитающих) и лежит в основе положительных эффектов тренировок, ограничения калорийности питания и широко применяемого противодиабетического препарата метформина [Garcia, Shaw, 2017]. Неудивительно, что AMPK рассматривается как привлекательная терапевтическая мишень для коррекции различных метаболических и возрастных заболеваний [Kim, Yang et al., 2016].

Большое внимание привлекает возможность замещения АМФ в реакциях активации AMPK его аналогами. Мощным активатором AMPK является нуклеозид 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибофуранозид (АИКАР), который в клетках быстро фосфорилируется с образованием АИКАР-Р – природного аналога АМФ. Таким образом, присутствие АИКАР имитирует накопление

АМФ и провоцирует перестройку энергетических процессов, направленную на преодоление мнимого энергетического стресса.

Общепринятым считается представление о том, что продолжительность жизни различных организмов увеличивается при некотором ограничении калорийности питания, т.е. при умеренном энергетическом стрессе, и в связи с этим представляется логичным исследовать свойства АИКАР как вещества с геропротекторной активностью широкого спектра действия.

Влияние препарата АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans* при выращивании на стандартной подложке *E. coli* OP50. В ходе работы было исследовано влияние различных концентраций препарата АИКАР на продолжительность жизни нематод, выращенных на стандартной подложке *E. coli* OP50 (среда NGM).

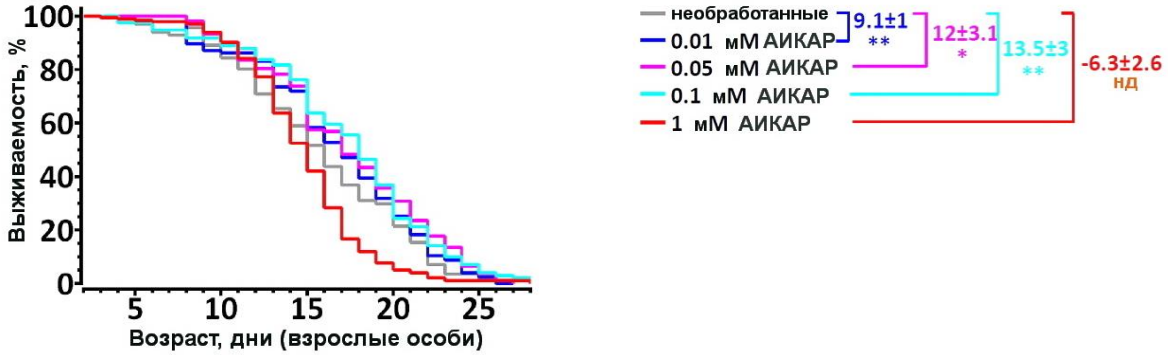

Рисунок 5.1 – Влияние препарата АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans* N2 зависит от концентрации. Нематод в возрасте L4 переносили на чашки со средой NGM с указанной концентрацией АИКАР, засеянные *E. coli* OP50. Среднее процентное изменение ± стандартное отклонение продолжительности жизни по сравнению с необработанным контролем показано цветом, совпадающим с цветом соответствующей кривой. *p<0.05, **p<0.01, нд – не достоверно

Выявлен эффект препарата АИКАР, заключающийся в умеренном (хотя и статистически значимом) увеличении продолжительности жизни особей, при этом выяснилось, что экзогенный АИКАР оказывает слабое геропротекторное действие, причем только при концентрации не выше 0.1 мМ (Рисунок 5.1).

Конструирование штамма *B. subtilis*, продуцирующего АИКАР: штамм *B. subtilis* АМ2020 АИКАР↑. Учитывая имеющиеся в литературе данные о быстром внутриклеточном превращении препарата АИКАР в инозин-монофосфат, мы предположили, что пролонгированное действие АИКАР может быть обеспечено при кормлении нематод живым штаммом *B. subtilis* с повышенной продукцией АИКАР. Такой штамм при выращивании на нем нематод мог бы обеспечить непрерывную наработку и поддержание достаточно высокого уровня АИКАР для достоверной оценки его влияния на жизнеспособность нематод. *B. subtilis* – признанный пробиотик [Cutting, 2011], а

также естественный источник пищи для *C. elegans* [Felix, Braendle, 2010; Dirksen et al. 2016; Samuel, 2016]

Для увеличения продукции АИКАР-Ф необходимо было усилить экспрессию генов, вовлеченных в биосинтез пуриновых нуклеотидов, которые в геноме *B. subtilis* объединены в *pur*-оперон. Поэтому на первом этапе работы был инактивирован репрессор пуринового оперона (ген *purR*), а также удален аттенюатор рибопереключателя, расположенный в лидерной области *pur*-оперона. Затем был сконструирован синтетический оперон, содержащий гены *prs, purF и udhA E. coli* под контролем сильного рибосомного промотора P_{rpsF}. Усиление экспрессии этих генов необходимо, поскольку рибозофосфатпирофосфокиназа (*prs*) и глутаминфосфорибозил-дифосфатамидотрансфераза (*purF*) являются первыми ключевыми ферментами биосинтеза пуринов и увеличивают поток глюкозы на синтез пуринов. В свою очередь, растворимая пиридиннуклеотидтрансгидрогеназа (*udhA*) регенерирует $NADP^+$, тем самым устраняя NADPH-опосредованную репрессию глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD), которая является ферментом, ограничивающим скорость пентозофосфатного пути. Для усиления экспрессии G6PD кодирующий ее ген *zwf* был подставлен под контроль сильного промотора P_{rpsF}. Кроме того, чтобы предотвратить расход глюкозы на путь биосинтеза левана, была проведена инактивация гена *sacB*. Наконец, было заблокировано преобразование АИКАР в IMP путем инактивации в составе *pur*-оперона гена *purH*, кодирующего фосфорибозиламиноимидазолкарбоксамид формилтрансферазу, что приводило к существенному накоплению АИКАР в культуральной жидкости при выращивании полученного штамма на полноценной среде с глюкозой. Продукция АИКАР у этого штамма-продуцента в несколько раз превышала таковую у контрольного штамма *ΔpurF* (AM1182) и проявляла строгую зависимость от количества добавленной глюкозы (Рисунок 5.2А и Б).

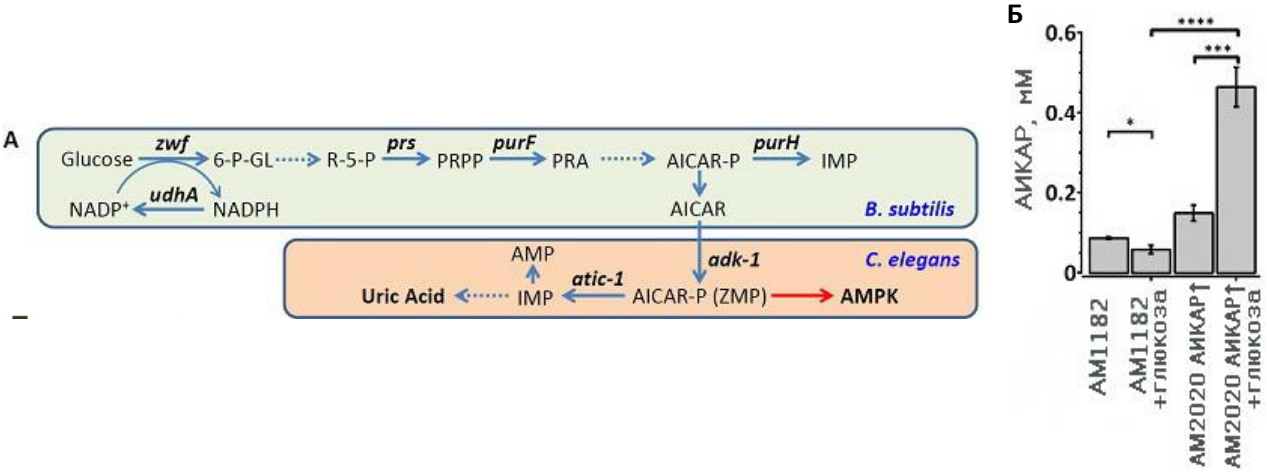

Рисунок 5.2 – Конструирование штамма AM2020 АИКАР↑. (А) Биосинтез и метаболизм АИКАР у *B. subtilis* и *C. elegans*. Удаление *purH* в *B. subtilis* предотвращает преобразование АИКАР в IMP. Активация AMPK показана красной стрелкой. *adk-1* – аденилаткиназа, *atic* – 1-5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид формилтрансфераза/IMP-циклогидролаза, PRA – 5'-

фосфорибозиламин. (Б) Глюкоза необходима для высокого уровня продукции АИКАР. Штаммы AM1182 и AM2020 АИКАР↑ выращивали в LB с глюкозой (2%) или без нее в течение 12 часов; концентрацию АИКАР измеряли с использованием метода диазотирования в осветленных супернатантах. *p<0.05; ***p<0.001; ****p<0.0001.

Изучение влияния глюкозы и эндогенного АИКАР, продуцируемого штаммом AM2020 АИКАР↑, на продолжительность жизни *C. elegans*. Полученный штамм-продуцент AM2020 АИКАР↑ был использован для культивирования *C. elegans* с целью оценки возможного увеличения геропротекторного эффекта, обнаруженного при использовании очищенных препаратов АИКАР в концентрации до 0.1 мМ (Рисунок 5.1).

Как упоминалось ранее, снижение продолжительности жизни *C. elegans* при высокоглюкозной диете частично связано с ингибированием AMPK за счет накопления гликогена [Gusarov et al., 2017; Gusarov, Nudler, 2018]. АИКАР предположительно может противодействовать гликоген-опосредованной инактивации AMPK и обращать вспять негативный эффект глюкозы.

Описанные ранее эксперименты показали, что экзогенный АИКАР, добавленный в чашки с NGM, засеянные диким штаммом *B. subtilis*, устраняет негативный эффект глюкозы. Кроме того, экзогенный АИКАР незначительно увеличивал продолжительность жизни нематод, выращенных на чашках NGM без глюкозы, засеянных штаммом *E. coli* OP50. В связи с этим представляло интерес сравнить продолжительность жизни нематод, выращенных на штамме AM2020 АИКАР↑, продуцирующем АИКАР, и штамме AM1182 с нарушенной продукцией АИКАР (Рисунок 5.3). Поскольку глюкоза необходима для повышенной продукции АИКАР, были использованы чашки с добавлением глюкозы и без нее.

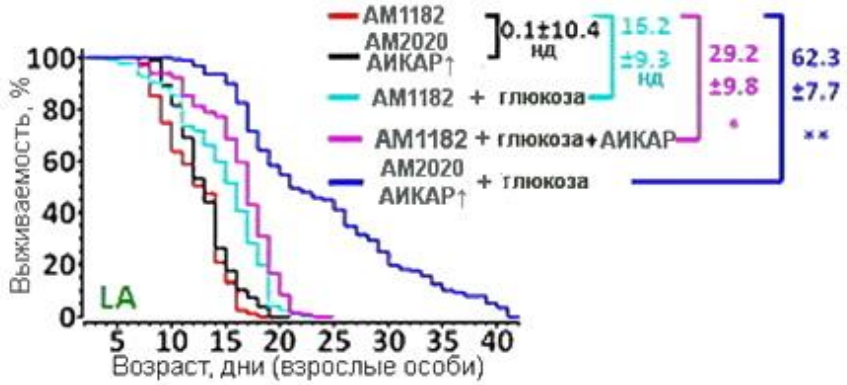

Рисунок 5.3 – Изучение влияния глюкозы и эндогенного АИКАР, продуцируемого штаммом AM2020 АИКАР↑, на продолжительность жизни *C. elegans* N2. Показаны результаты по крайней мере трех независимых экспериментов. Среднее процентное изменение ± стандартное отклонение продолжительности жизни относительно AM1182 указано цветом, совпадающим с соответствующей кривой. *p<0.05, **p<0.01, нд – не достоверно.

Как следует из данных, представленных на рисунке 5.3, на чашках со средой LA без глюкозы нематоды, питавшиеся AM2020 АИКАР↑ и AM1182, имели аналогичную продолжительность жизни. Из этого следует, что небольшое увеличение продукции АИКАР штаммом AM2020 АИКАР↑ без глюкозы недостаточно для увеличения продолжительности жизни *C. elegans*. В то же время, добавление глюкозы увеличивало на ~ 62% продолжительность жизни особей, выращенных на штамме-продуценте AM2020 АИКАР↑, по сравнению с нематодами, выращенными на контрольном штамме AM1182 (Рисунок 5.3). Совокупность полученных результатов демонстрирует, что живой штамм-продуцент AM2020 АИКАР↑ наиболее эффективен для увеличения продолжительности жизни *C. elegans* независимо от используемых сред. Важно отметить, что этот эффект AM2020 АИКАР↑ не может быть полностью воспроизведен экзогенным АИКАР, который становится токсичным при более высоких дозах.

Влияние штамма-продуцента AM2020 АИКАР↑ на продолжительность жизни мутантов *C. elegans aak-2* и *daf*-16. Поскольку AMPK является основной внутриклеточной мишенью АИКАР, ее активация может объяснять эффекты положительного влияния штамма AM2020 АИКАР↑ на продолжительность жизни [Riedinger et al., 2018]. Для проверки этого предположения было проведено сравнение продолжительности жизни AMPK-дефицитных мутантных линий нематод *C. elegans aak-2*, выращенных на штаммах AM2020 АИКАР↑ или AM1182. Как и ожидалось, продолжительность жизни мутантных нематод *aak-2* (как на чашках со средой LA, так и на чашках со средой NGM) существенно не отличалась, независимо от бактериального штамма, который они употребляли в пищу. Более того, добавление экзогенного АИКАР не увеличивало продолжительность жизни *C. elegans aak-2*.

Связывание AMP или ZMP с γ-субъединицей AMPK вызывает конформационное изменение, которое способствует ключевому регуляторному фосфорилированию Thr и активации AMPK [Mihaylova, Shaw, 2011]. Действительно, в своих исследованиях коллеги наблюдали значительно более высокое фосфорилирование AAK-2 у нематод, получавших AM2020 АИКАР↑, по сравнению с таковыми при выращивании особей на контрольном штамме AM1182.

Полученные результаты показывают, что штамм-продуцент AM2020 АИКАР↑ увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* путем активации AMPK.

Заключение. Таким образом, результаты проведенной работы демонстрируют преимущества использования пробиотиков на модели нематод *C. elegans* по сравнению с использованием выделенных из них активных метаболитов для продления жизни организма-хозяина. Сконструированный нами продуцент АИКАР обнаруживает свойства пробиотика и существенно увеличивает продолжительность жизни особей по сравнению с действием

очищенного препарата АИКАР. Показано, что увеличение продолжительности жизни *C. elegans* при их культивировании на газоне штамма-продуцента опосредовано активацией АМРК нематод. Нематоды, выращиваемые на газоне штамма-пробиотика, демонстрируют устойчивость к репрессирующему рост действию глюкозы. На основе полученных данных можно предположить, что супрессия негативного действия высоких концентраций глюкозы пробиотиком обусловлена снижением активности системы передачи сигналов инсулиноподобного фактора роста, ответственной за утилизацию глюкозы нематодами. Полученный штамм-пробиотик доказывает перспективность использования искусственно сконструированных бактерий для коррекции различных метаболических нарушений и осуществления положительного влияния на жизнедеятельность организма-хозяина.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы с использованием комбинированной межвидовой модели «*C. elegans* – бактерия» были исследованы различные пути влияния микробиоты на продолжительность жизни нематод, что расширяет представление о молекулярных механизмах влияния бактериального метаболизма на жизнеспособность организма-хозяина.

Впервые влияние метаболизма микробиоты на организм хозяина было показано в нашей работе, демонстрирующей, что продуцируемая бактериями *Bacillus subtilis* окись азота (NO) увеличивает продолжительность жизни и термотолерантность *C. elegans.* Установлено, что позитивное действие NO на жизнеспособность нематод зависит от активности глобальных регуляторов DAF-16 и HSF-1 и полностью устраняется при их нарушении. Результаты проведенного транскриптомного анализа выявили группу генов, характеризующихся повышенной экспрессией в присутствии NO, включающую гены, вовлеченные в контроль долгожительства (*mtl-1, ctl-2, gei-7, nlp-29,* T19B10.2) [Murphy et al., 2003; Halaschek-Wiener et al., 2005; Samuelson et al., 2007].

Далее мы показали, что не только активные формы азота, но и активные формы кислорода (АФК), играют ключевую роль в регуляции процесса старения. Была исследована зависимость времени жизни нематод от двух терминальных оксидаз – *bo'* и *bd*-I, локализованных в клетках бактерий *E. coli*. С этой целью были получены мутанты *E. coli* дефектные по генам *cyoA* (оксидаза *bo'*) и *cydA* (оксидаза *bd*-I), которые использовались в качестве газона для культивирования нематод. Мы предполагаем, что увеличение продолжительности жизни особей, наблюдаемое при их культивировании на газоне бактерий, дефектных по терминальным оксидазам, обусловлено повышенным уровнем генерации АФК в клетках этих мутантов. Выявленный позитивный эффект может быть интерпретирован в рамках концепции «митохондриального гормезиса», согласно которой умеренные дозы АФК приводят к усилению аэробного дыхания, индукции защитных механизмов организма от окислительного стресса

и, в конечном счете, к увеличению продолжительности жизни [Tapia, 2006; Schulz et al., 2007; Ristow, Schmeisser, 2014].

Этой концепции соответствуют результаты наших исследований по воздействию антиоксидантов на нематод. Так, обработка *C. elegans* глутатионом и N-ацетилцистеином не приводила к увеличению жизнеспособности особей, а напротив, вызывала ее уменьшение. Эти данные указывают на то, что продолжительность жизни *C. elegans* зависит от содержания АФК, тогда как антиоксиданты, очевидно, существенно снижают как уровень АФК, так и продолжительность жизни нематод.

Важное место в работе занимает исследование механизма негативного эффекта глюкозы на продолжительность жизни нематод. Мы показали, что накопление внутриклеточного гликогена играет принципиальную роль в сокращении продолжительности жизни в условиях высокого потребления глюкозы. На основании полученных данных мы предполагаем, что синтез гликогена и система передачи сигналов инсулиноподобного фактора роста являются двумя различными сигнальными путями, контролирующими продолжительность жизни. При высоком содержании глюкозы в пище ILS активируется и подавляет DAF-16 – зависимую транскрипцию. Одновременно накопление гликогена ингибирует активность АМРК. В совокупности это приводит к существенному сокращению продолжительности жизни. Ингибирование синтеза гликогена с помощью антисмысловой РНК (*gsy-1* RNAi) снимает ингибирование АМРК и увеличивает продолжительность жизни нематод дикого типа и мутантов *daf-2* и *daf-16* на среде с высоким содержанием глюкозы. Из этого следует, что гликоген и DAF-16 являются независимыми факторами контроля продолжительности жизни. Таким образом, негативный эффект глюкозы на продолжительность жизни супрессируется отсутствием ее запасания в форме гликогена, т. е. ее неограниченной метаболизацией, которая приводит к активации дыхания и образования АФК. Как было отмечено выше, образование АФК является позитивным фактором продления жизни нематод.

Наиболее важным практическим результатом настоящей работы является демонстрация преимущества использования пробиотиков на модели нематод *C. elegans* по сравнению с использованием выделенных из них активных метаболитов для продления жизни хозяина. Было проведено сравнение эффективности действия препарата АИКАР и штамма-продуцента АИКАР, используемого в качестве газона для культивирования нематод, на продолжительность их жизни. Совокупность полученных результатов позволяет заключить, что сконструированный нами продуцент АИКАР обнаруживает свойства пробиотика и существенно увеличивает продолжительность жизни особей по сравнению с действием очищенного препарата АИКАР. Показано, что увеличение продолжительности жизни нематод при их культивировании на газоне штамма-пробиотика опосредовано активацией АМРК нематод. Действительно, при выращивании *C. elegans* на газоне штамма-пробиотика содержание активной формы АМРК в организме особей возрастает в несколько раз. Кроме того, показано, что инактивация гена *aak-2*, кодирующего одну из

субъединиц АМРК нематод, препятствует проявлению позитивного эффекта пробиотика.

Важной характеристикой нематод, выращиваемых на газоне штамма-пробиотика, является их устойчивость к репрессирующему действию глюкозы. Известно, что АМРК является важным компонентом системы передачи сигналов инсулиноподобного фактора роста. Мы показали, что сверхэкспрессия конститутивно активной AMPK в штамме-пробиотике увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* дикого типа, но не мутантной линии *C. elegans daf-16.* Эти данные позволяют предположить, что супрессия негативного действия высоких концентраций глюкозы пробиотиком обусловлена снижением активности ILS-системы, ответственной за утилизацию глюкозы нематодами. Полученный пробиотик служит примером перспективности использования искусственно созданных бактерий в качестве микробиоты для коррекции метаболических нарушений и замедления процесса старения организма хозяина.

ВЫВОДЫ

1. Бактериальный оксид азота как сигнальная молекула играет важную роль в физиологии нематод, увеличивает термотолерантность и продолжительность жизни особей, индуцируя специфический ответ, зависящий от активности DAF-16 и HSF-1.
2. Инактивация генов *cyoA* и *cydA*, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, демонстрирует положительное влияние на продолжительность жизни *C. elegans*, связанное с эффектом митохондриального гормезиса.
3. Постоянное употребление экзогенных антиоксидантных добавок приводит к сокращению продолжительности жизни нематод *C. elegans*, подтверждая важную роль наличия сбалансированного уровня антиоксидантов для поддержания нормальной жизнедеятельности организма.
4. Гликоген ответственен за устойчивость к оксидантам и сокращение продолжительности жизни нематод в условиях высокого потребления глюкозы.
5. Регуляторный экзогенный метаболит АИКАР обладает геропротекторным эффектом на модели *C. elegans,* увеличивая продолжительность жизни особей на 13%. Полученный штамм-продуцент АИКАР *B. subtilis*, обладающий свойствами пробиотика, значительно увеличивает продолжительность жизни особей (на 62%). Отсутствие влияния экзогенного и эндогенного АИКАР на жизнедеятельность AMPK-дефицитных нематод с инактивированным геном *aak-2* свидетельствует об участии AMPK-зависимого пути в контроле продолжительности жизни.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Gusarov I., Pani B., Gautier L., Smolentseva O., Eremina S., Shamovsky I., Katkova- Zhukotskaya O., Mironov A., Nudler E. Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress // Nat. Commun. – 2017. – V. 8. – P. 15868.

2. Каткова-Жукоцкая О.А., Еремина С.Ю., Шакулов Р.С., Миронов А.С. Выращивание *Caenorhabditis elegans* на газоне бактерий *Escherichia coli*, дефектных по синтезу терминальных оксидаз *bo'* и *bd-I*, увеличивает продолжительность жизни нематод // Генетика. – 2019. – Т. 55, N 12. – С. 1487-1490.

3. Gusarov I., Shamovsky I., Pani B., Gautier L., Eremina S., Katkova-Zhukotskaya O., Mironov A., Makarov A.A., Nudler E. Dietary thiols accelerate aging of *C. elegans* // Nat. Commun. – 2021. – V. 12. – P. 4336.

Патенты

1. Еремина С.Ю., Шостак Н.Г., Зеленцова Е.С., Каткова-Жукоцкая О.А., Лобанов К.В., Шакулов Р.С., Фуников С.Ю., Миронов А.С., Евгеньев М.Б., Карпов В.Л., Нудлер Е.А. Геропротектор для модельных животных. Патент РФ №2639500 от 21.12.2017.

Материалы научных конференций

1. Katkova-Zhukotskaya O., Eremina S., Mironov A. The influence of purine metabolism damages in *Bacillus subtilis* on *Caenorhabditis elegans* lifespan // Proceedings of the International Conference «Biomedical Innovation for Healthy Longevity». – 2016. – P. 94.

2. Каткова-Жукоцкая О.А., Еремина С.Ю., Миронов А.С. Изучение геропротекторной активности 5-амино-имидазол-4-карбоксамид-рибофуранозида (АИКАР) на модельном организме *Caenorhabditis elegans* // 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». – 2018. – С. 348.

3. Каткова-Жукоцкая О.А., Еремина С.Ю., Шакулов Р.С., Миронов А.С. Влияние антиоксидантов и мутаций в генах, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, на продолжительность жизни нематод *Caenorhabditis elegans* // Конгресс «VII съезд ВОГиС, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы». – 2019. – С. 1050.