

На правах рукописи

СИМОНЕНКО Александр Владимирович

**РОЛЬ ГЕНОВ *escargot* И *shuttle craft*,
КОДИРУЮЩИХ НЕЙРОНАЛЬНЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ
ФАКТОРЫ,
В КОНТРОЛЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

1.5.7 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в лаборатории геномной изменчивости Федерального государственного бюджетного учреждения Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

ПАСЮКОВА Елена Генриховна,

заведующий лабораторией геномной изменчивости Федерального государственного бюджетного учреждения Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, доцент

НЕФЕДОВА Лидия Николаевна,

профессор кафедры генетики Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

доктор биологических наук, профессор РАН

ШИДЛОВСКИЙ Юлий Валерьевич,

заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук, г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, д.3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН: <http://vigg.ru/>, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

И. И. Горячева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Большинство многоклеточных организмов подвержено процессу старения – постепенного нарушения и потери функций отдельных органов и организма в целом [López-Otín и др., 2013], которое приводит к смерти. Несмотря на характеризующий большинство количественных признаков низкий, обычно до 30%, уровень наследуемости [Finch, Tanzi, 1997]), продолжительность жизни контролируется геномом: у животных известно около двух тысяч влияющих на продолжительность жизни и процесс старения генов, у человека их, как предполагается, более трехсот [Tasutu и др., 2018; Vuni и др., 2020]. В настоящее время усилия ученых сосредоточены на выяснении того, какие межгенные взаимодействия, типы клеток и тканей, а также возрастные периоды в наибольшей степени влияют на длительность жизни.

Продолжительность жизни – сложный количественный признак, изучение генетического контроля которого важно для выяснения основополагающих принципов многоуровневого контроля реализации генетической информации у эукариот, обуславливающего их развитие и функционирование. Многосложность вклада генотипа в фенотип обусловлена не столько большим количеством генов в геноме, сколько изоцтренной регуляцией их экспрессии, что приводит к появлению многочисленных форм РНК и белков, точно соответствующих типу клетки, стадии развития/возрасту и информации, поступающей из окружающей среды. Регуляция транскрипции является важнейшим этапом, определяющим характер экспрессии генов. Она зависит от взаимодействия различных регуляторных элементов, локализованных, главным образом, в некодирующей части ДНК, и регуляторных белков, в том числе, транскрипционных факторов. Выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе взаимосвязи между транскрипцией генов и фенотипом, является фундаментальной научной задачей, решение которой принципиально важно для понимания основ развития, жизни и старения живых организмов.

Важность исследования контролируемых сложных количественных признаки генетических механизмов растет в случае значимых в биологическом и социальном отношении характеристик, в том числе продолжительности жизни. Продолжительность жизни человека увеличивается благодаря социальным и научным достижениям последнего времени, и становится ясно, что продление жизни имеет особую ценность, если оно связано с сохранением здоровья и возможностью отсрочить старение. В связи с этим, развитие методов замедления старения и достижения здорового долголетия, основанных на выявлении простых и эффективных мишеней на уровне клеток и отдельных молекул, приобретает большую актуальность.

Степень разработанности проблемы

Давно доказано, что нервная система играет ключевую роль в контроле продолжительности жизни, поскольку она координирует и регулирует взаимодействия между внешними для организма факторами окружающей среды и его внутренними системами и метаболизмом [Alcedo, Flatt, Pasyukova, 2013;

Pasyukova и др., 2015; Nassel, Zandawala, 2019]. Усиление экспрессии многих генов только в нервной ткани приводило к увеличению продолжительности жизни [Parkes и др., 1998; Wang и др., 2003; Rogina, Helfand, 2004; Fridell и др., 2005, 2009; Orr и др., 2005; Simonsen и др., 2008; Liao и др., 2008; Lee и др., 2009]. Изучение конкретных молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе такого влияния нервной системы на продолжительность жизни, представляется весьма важным. Один из механизмов, связанный с инсулиновым сигнальным путем и работой клеток нейросекреторного кластера мозга, был подробно исследован у *Drosophila melanogaster* [Broughton и др., 2005, 2008; Post и др., 2018, 2019]. Известно также, что определенную роль как в функционировании нервной системы, так и в контроле продолжительности жизни играют гены, кодирующие деацетилазы гистонов, белки сигнальных путей TOR, cAMP/PKA, и ряд других [Pasyukova и др., 2015]. Дальнейшее изучение этого вопроса представляется весьма важным и перспективным.

Ранее, с помощью методов рекомбинационного и делеционного картирования и комплементационных тестов, в результате сотрудничества лаборатории геномной изменчивости ИМГ РАН и кафедры генетики Государственного университета Северной Каролины (США) был определен набор генов, связанных с ранее неизвестными регуляторными путями, влияющими на продолжительность жизни дрозофилы [Pasyukova, Vieira, Mackay, 2000; Roshina и др., 2014]. Эти гены (*shuttle craft (stc)*, *escargot (esg)*, *Lim3*, *tail up (tup)* и *crooked legs (crol)*) кодируют нейрональные транскрипционные факторы, которые определяют развитие и формирование нервной системы дрозофилы. В лаборатории геномной изменчивости продолжается детальное исследование механизмов влияния этих генов на продолжительность жизни.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы являлось исследование влияния генов *esg* и *stc*, кодирующих нейрональные транскрипционные факторы, на продолжительность жизни, функцию нервной системы и транскрипцию генов-мишеней.

Для достижения поставленной цели планировалось решить следующие задачи:

1. Охарактеризовать влияние мутаций в генах *esg* и *stc* на уровень их транскрипции, продолжительность жизни и функциональный статус нервной системы.
2. Охарактеризовать влияние вызванного РНК-интерференцией нокдауна генов *esg* и *stc* в нервной системе на продолжительность жизни.
3. Охарактеризовать влияние вызванного РНК-интерференцией нокдауна гена *stc* на эмбриональной стадии на продолжительность жизни, функцию нервной системы и транскрипцию генов-мишеней.

Научная новизна полученных результатов

В диссертационной работе подробно исследовано влияние генов *esg* и *stc*, кодирующих нейрональные транскрипционные факторы, на продолжительность

жизни *D. melanogaster*. Впервые продемонстрировано влияние уровня экспрессии генов *esg* и *stc* на продолжительность жизни; выявлена специфика этого влияния в зависимости от ткани (стадии развития). Впервые выявлена взаимосвязь между индуцированным нарушением работы генов *esg* и *stc* и изменениями продолжительности жизни и подвижности мух, характеризующей функциональный статус нервной системы. Были получены новые факты, указывающие на половую специфичность контроля продолжительности жизни и продемонстрировано, что влияние гена *stc* на продолжительность жизни самок зависит от того, происходило ли скрещивание с самцами. Впервые показано, что снижение нейрональной экспрессии генов *esg* и *stc* влияет на продолжительности жизни. Впервые показано, что снижение эмбриональной транскрипции *stc* влияет на экспрессию ряда генов-мишеней, связанных с функциями нервной системы на стадии эмбрионального развития, и приводит к нарушению структуры нейромышечных соединений и уменьшению активности синапсов на более поздней стадии развития.

Положения, выносимые на защиту

Гены *esg* и *stc*, кодирующие нейрональные транскрипционные факторы, участвуют в контроле продолжительности жизни.

Снижение экспрессии исследованных генов во многих случаях благоприятно сказывается на продолжительности жизни.

Влияние исследованных генов на продолжительность жизни зависит от того, где и когда изменена их экспрессия.

Влияние исследованных генов на продолжительность жизни зависит от пола и физиологического статуса мух.

Нейрональная функция генов *esg* и *stc* важна для регуляции продолжительности жизни и старения.

Изменение экспрессии гена *stc* на эмбриональной стадии влияет на экспрессию ряда генов-мишеней, ответственных за свойства нервной системы, на эмбриональной стадии и приводит к изменению структурно-функциональных свойств нейронов на более поздней стадии развития и увеличению продолжительности жизни взрослых особей.

Научно-практическая значимость работы

Благодаря подробному исследованию двух генов дрозофилы, кодирующих нейрональные транскрипционные факторы, диссертационная работа внесла весомый вклад в исследование генетического контроля продолжительности жизни. Основываясь на новых, оригинальных фактах, она подтвердила связь между структурно-функциональными свойствами нервной системы и продолжительностью жизни, основополагающее значение пола в определении продолжительности жизни, связь между продолжительностью жизни и размножением. Впервые выявлены мишени гена *stc*. Принципиально новым важным итогом работы явилось выявление связи между экспрессией генов в раннем развитии и продолжительностью жизни взрослых особей.

Совокупность полученных в работе данных, характеризующих комплексную взаимозависимость экспрессии генов, кодирующих нейрональные

транскрипционные факторы, продолжительности жизни, свойств нервной системы, пола и размножения может быть использована при чтении учебных курсов в университетах биологического, педагогического, медицинского профиля. Результаты работы имеют фундаментальный характер, однако могут послужить основой для выбора молекулярных и тканевых мишеней действия потенциальных вмешательств, направленных на продление жизни человека.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена статистической достоверностью наблюдаемых эффектов, их воспроизведением в независимых опытах, а также, в некоторых случаях, на независимых модельных системах. Достоверность результатов подкрепляется также непротиворечивостью основных выводов работы.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 2-й и 3-й Международных конференциях “Genetics of aging and longevity” (Москва, Россия, 2012; Сочи, Россия, 2014); 3-й Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» (Киев, Украина, 2012); Международной конференции “Biomedical Innovation for Healthy Longevity” (Санкт-Петербург, 2016); Всероссийской конференции “Дрозофила в генетике и медицине” (Гатчина, 2017); Международной конференции “Interventions to Extend Healthspan and Lifespan” (Казань, 2018); Международной конференции “Дрозофила в генетике и медицине” (Гатчина, 2020); 10-й, 11-ой, 12-ой Международных конференциях “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology” (Новосибирск, 2016, 2018, 2020).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них статей в иностранных рецензируемых журналах, соответствующих Перечню ВАК – 3, публикаций в других изданиях – 1, тезисов докладов и материалов конференций – 9.

Личный вклад автора

Симоненко А. В. внес основополагающий личный вклад в разработку задач исследования; статистическую обработку и обсуждение результатов; написание тезисов и статей, а также лично представлял результаты работы на всероссийских и международных конференциях. Соискатель лично провел все молекулярно-биологические и иммуногистохимические исследования, анализ подвижности дрозофилы и биоинформатический анализ. В сотрудничестве с Роциной Н. В. выполнены скрещивания и измерена продолжительность жизни.

Структура и объём работы

Диссертационная работа изложена на 153 страницах, содержит 17 рисунков и 1 таблицу, состоит из разделов Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы и дополнена Приложением на 19 страницах. Библиография включает 406 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *D. melanogaster*, использованные в работе, были получены из центров культур *Drosophila* (<https://bdsc.indiana.edu/index.html>; <http://stockcenter.vdrc.at/>), если не указано иначе.

- esgP и esgK1 – линия с мутацией *esg[BG01042]*, вызванной inserцией трансгена *P{GT1}* в 3' окружение гена *esg*, и ко-изогенная ей контрольная линия без inserции.
- stcP и stcK1 – линия с мутацией *stc[KG01230]*, вызванной inserцией трансгена *P{SUPor-P}* в 5' окружение гена *stc* и ко-изогенная ей контрольная линия без inserции.
- esgRev1.1, esgRev1.2, esgRev2.1, esgRev2.2, esgRev3, esgRev4, esgRev5 и stcRev1, stcRev3, stcRev4, stcRev5 – линии с реверсиями мутаций в генах *esg* и *stc*, получены в лаборатории геномной изменчивости ИМГ.
- esgНД1, esgНД2, esgНД3, stcНД1, stcНД2 – линии с трансгенами, кодирующими различные шпильки для РНК-интерференции *esg* и *stc*; esgK2 и stcK2 – ко-изогенные соответствующим линиям с трансгенами контрольные линии без inserций.

Линии-драйверы и бинарная экспрессионная система GAL4-UAS [Brand, Perrimon, 1993] были использованы для активации экспрессии трансгенов:

- HC1, HC2 – обуславливают экспрессию трансгенов в нервной системе; Эмб1, Эмб2 – обуславливают экспрессию трансгенов в эмбрионах; ЭмбHC – в нервной системе эмбрионов.

Продолжительность жизни, двигательную активность, плодовитость и жизнеспособность мух измеряли в соответствии с опубликованными методами [Roshina и др., 2014]. Двигательную активность в разном возрасте измеряли в одно время суток с использованием системы *Drosophila Population Monitor* (TriKinetics). В каждом опыте выборка составила 50-200 мух на пол/генотип. Опыты для сравнения мух разных генотипов проводили одновременно.

Количество транскриптов определяли методом ОТ-кПЦР в соответствии с опубликованными методами [Roshina и др., 2014; Symonenko et al., 2018], используя MiniOpticon Real-Time PCR Detection System и программу CFX Manager 3.1 Software (Bio-Rad). Каждый эксперимент был выполнен в 3-4 биологических повторностях.

Для секвенирования использовали смесь продуктов трех независимых ПЦР-реакций, очищенную на колонках CentriSep (Princeton Separations), и секвенатор ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Иммуноокрашивание препаратов нейромышечных соединений четвертой мышцы третьего и четвертого брюшных сегментов личинок 3-го возраста проводили в соответствии с опубликованными методами [Smith, Taylor, 2011]. Анализ проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 510 и программного обеспечения ImageJ и Zeiss LSM Image Browser (Zeiss). Выборка составила 10-15 особей на пол/генотип.

Статистический анализ проводили с помощью программ Tibco Statistica 14.0.0 (Cloud Software) и веб-приложения OASIS 2

(<https://sbi.postech.ac.kr/oasis2/surv/>, [Han и др., 2016]). Показатели, характеризующие продолжительность жизни, определяли в соответствии с [Carey, 2003; Wilmoth, Horiuchi, 1999]. Кривые выживания сравнивали, используя тесты Манна – Уитни, Колмогорова – Смирнова и Флеминга – Харрингтона. Уровень экспрессии генов, двигательную активность, плодовитость и другие признаки сравнивали, используя тесты Стьюдента и Краскела – Уоллиса. В случае множественности сравнений значимость результатов оценивали с учетом поправки Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние гена *escargot* на продолжительность жизни

Ген *esg* локализован на второй хромосоме, содержит один экзон и экспрессируется на эмбриональной стадии, в центральной нервной системе и кишечнике личинок, а также в кишечнике и семенниках взрослых мух. Транскрипционный фактор *Esg*, принадлежащий к консервативному семейству белков *Snail*, которые участвуют в развитии нервной системы членистоногих и хордовых [Manzanares и др., 2001], включает ДНК-связывающий домен и способен как репрессировать, так и активировать транскрипцию [Ashraf и др., 1999; Cai и др., 2001; Ashraf, Ip, 2001]

Мутация *esg*[BG01042] увеличивает продолжительность жизни

Мутация *esg*[BG01042], вызванная инсерцией, расположенной на расстоянии 602 п.н. от 3'-конца гена *esg*, увеличивала продолжительность жизни девственных самцов и самок (Рис.1). В трех повторных экспериментах увеличение средней продолжительности жизни мутантных самцов варьировало от 22% до 96% а девственных самок – от 4% до 33%, средний эффект составил 55% и 17%, соответственно. Мутация увеличила также среднюю продолжительность жизни скрещивавшихся самцов с чуть меньшим эффектом (в среднем 43%). Сравнение кривых выживания во всех экспериментах позволяет предположить, что мутация замедляет старение (Рис.1).

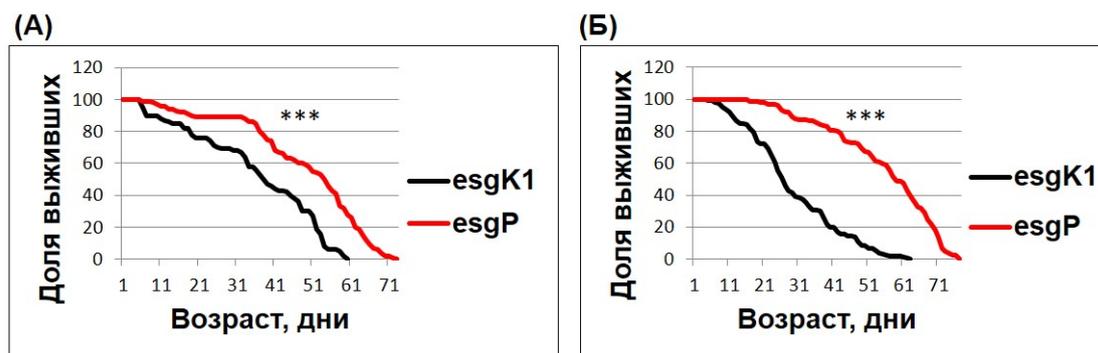


Рисунок 1 — Влияние мутации *esg*[BG01042] на продолжительность жизни девственных мух. (А) – кривые выживания самок. (Б) – кривые выживания самцов. Здесь и на всех последующих рисунках достоверность различия, тест Манна-Уитни (кривые выживания), тест Краскела-Уоллиса: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$.

У мутантных девственных и скрещивавшихся самцов и девственных самок максимальная продолжительность жизни была в среднем на 40%, 40% и 17% выше, чем у контрольных. Индикатором замедления старения является также увеличенная по сравнению с контролем двигательная активность старых мух с мутацией (Рис.2).

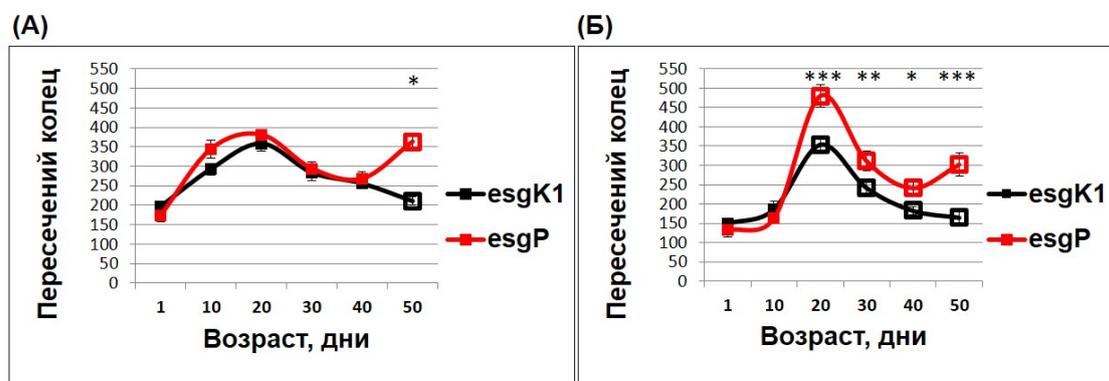


Рисунок 2 — Влияние мутации *esg[BG01042]* на подвижность девственных мух. (А) – самки. (Б) – самцы.

Для подтверждения причинно-следственной связи мутации с изменением продолжительности жизни мы изучили природу и фенотип ко-изогенных линий с реверсией инсерционной мутации *esg[BG01042]*, полученных ранее [Рощина, 2008; Magwire и др., 2010]. ПЦР с фланкирующих инсерцию праймеров показала, что в контрольной линии и в двух линиях с реверсиями размеры фрагментов ПЦР были одинаковы (Рис.3А, треки 3, 8, 9), а последующее секвенирование подтвердило, что в линии *esgRev3* последовательность была идентична стандартной последовательности гена (<http://flybase.org/reports/FBgn0001981.html>), а в линии *esgRev4* отличалась лишь тремя нуклеотидными заменами. В пяти других линиях с реверсиями были обнаружены вставки длиной от 30 до 162 п.н. Продолжительность жизни самцов линии *esgRev3* с полным восстановлением исходной структуры генома была измерена ранее и оказалась такой же, как у самцов контрольной линии [Рощина, 2008; Magwire и др., 2010]. Мы подтвердили этот результат и показали, что такой же эффект наблюдался у самок (Рис. 3Б, В). Полученные результаты доказали причинно-следственную связь между мутацией и изменением продолжительности жизни. Интересно, что в линии *esgRev5* вставка размером 32 п.н., расположенная на 602 п.н. дальше 3' конца гена *esg*, оказывала практически такое же влияние на продолжительность жизни самцов и самок, как и вставка размером 8500 п.н. в линии *esgP*.

Мутация *esg[BG01042]* снижает экспрессию гена *esg*

Чтобы понять молекулярную основу различий в продолжительности жизни, вызванных мутацией, мы оценили влияние *esg[BG01042]* на количество транскрипта *esg*, которое оказалось сниженным у 14-20-часовых мутантных эмбрионов и 10-дневных девственных самцов по сравнению с контролем (в 1,75 и 1,5 раза, соответственно, $P < 0,05$). Точная реверсия мутации сопровождалась реверсией уровня транскрипции до контрольного. Следовательно, снижение

транскрипции *esg* лежит в основе уменьшения продолжительности жизни мутантов. У самцов с неточной реверсией наблюдался уровень транскрипции *esg*, характерный для мутантов. Таким образом, вставка размером 32 п.н. и вставка размером 8500 п.н., расположенные в 3' окружении *esg*, одинаково влияют не только на продолжительность жизни, но и на экспрессию гена. Это означает, что на экспрессию влияет нарушение нормальной геномной последовательности, а не свойства вставленного фрагмента. Сайт инсерции локализуется с возможной горячей точкой расположения сайтов связывания транскрипционных факторов (TFBS) [Gramates и др., 2022; modENCODE Consortium и др., 2010], структура которой нарушается в результате инсерций.

Нокдаун гена *esg* в нейронах влияет на продолжительность жизни

Мутация *esg* снижала уровень экспрессии гена и увеличивала продолжительность жизни. Снижение экспрессии гена может быть также достигнуто в результате его нокдауна. В зависимости от использованной линии, обуславливающей РНК-интерференцию, нокдаун гена *esg* в нейронах приводил к летальности (*esg*НД1), а также к достоверному и воспроизводимому снижению (*esg*НД2) или увеличению (*esg*НД3) продолжительности жизни самцов и самок (Рис.4). Учитывая свойства использованных нами линий (http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/RNAi/RNAi_D_M.php), можно предположить, что умеренный нокдаун гена *esg*, индуцированный линией *esg*НД3, обеспечивает необходимый для продления жизни уровень снижения экспрессии гена в нейронах. Важно, что полученные результаты свидетельствуют о значимости нейрональной функции *esg* в контроле продолжительности жизни.

Влияние гена *shuttle craft* на продолжительность жизни

Ген *stc* локализован на второй хромосоме, содержит пять экзонов и экспрессируется на всех стадиях развития, преимущественно в нервной системе и яичниках. Транскрипционный фактор *Stc* включает ДНК-, РНК- и белок-связывающие домены и гомологичен транскрипционному фактору NF-X1 человека [Stroumbakis, Li, Tolias, 1996; Tolias, Stroumbakis, 1998].

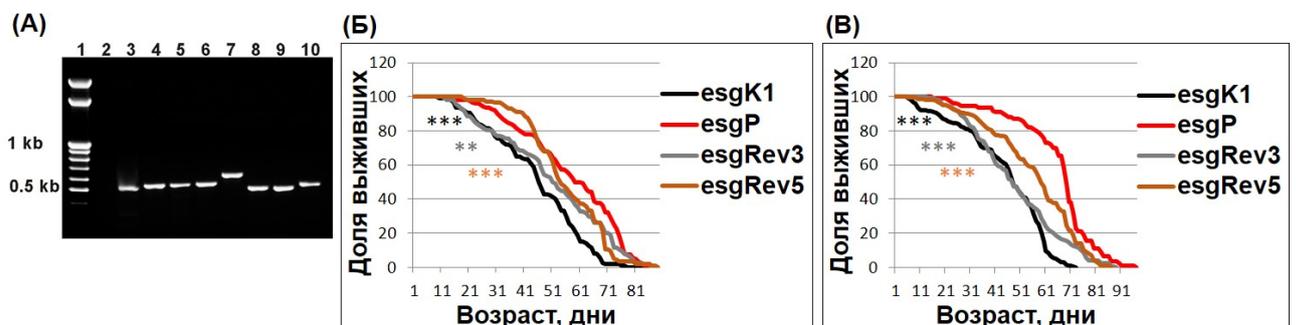


Рисунок 3 — Влияние мутации *esg*[*BG01042*] и ее реверсий на структуру гена и продолжительность жизни девственных мух. (А) — ПЦР-анализ с фланкирующих праймеров: 1 – маркер длины фрагментов; 2 - *esg*P (отрицательный контроль, ожидаемый ПЦР-продукт размером около 9 тпн не

образуется при использованных условиях ПЦР), 3 – *esgK1*; 4 – 10 - ревертанты. (Б) – кривые выживания самок. (В) – кривые выживания самцов.

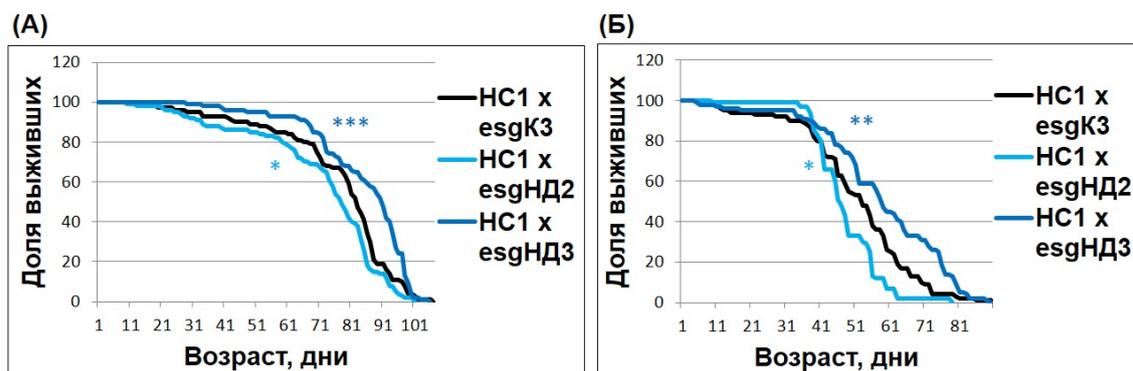


Рисунок 4 — Влияние нокдауна *esg* в нейронах на продолжительность жизни девственных мух. (А) — кривые выживания самок. (Б) — кривые выживания самцов.

Мутация *stc/KG01230* увеличивает продолжительность жизни

В проведенном ранее в лаборатории геномной изменчивости скрининге мутация, вызванная инсерцией в 5'-нетранслируемую область *stc*, увеличивала продолжительно жизни девственных самок (Рис. 5 А). В отличие от мутации *esg*, проведенные нами повторные эксперименты подтвердили эффект у самок, но не выявили эффекта у самцов (Рис. 5 Б). Зависимое от пола влияние различных факторов и генов на продолжительность жизни описано во многих исследованиях [Tricoire и др., 2009; Ruiz и др., 2011; Roshina и др., 2014; Schriener и др. 2014; Shaposhnikov и др. 2015]. Положительный эффект мутации у самок в течение ряда лет варьировал от 22% до 96%, средний эффект составил 55%. У мутантных девственных самок максимальная продолжительность жизни была в среднем на 40% выше, чем у контрольных, а подвижность во всех экспериментах снижалась с возрастом медленнее, чем у контрольных. Эти факты указывают на замедление старения, вызванное мутацией (Рис.5 Г, Д).

Продолжительность жизни скрещивавшихся самок, измеренная ранее [Рощина, 2008] и в данной работе, была в среднем на 15% меньше у мутантов, чем у контрольных особей, тогда как у самцов этот эффект не был выявлен. Мы предположили, что разнонаправленное влияние мутации на продолжительность жизни девственных и скрещивающихся самок может быть связано с репродуктивной функцией последних, и охарактеризовали их плодовитость и жизнеспособность их потомства. Количество яиц, отложенных в возрасте 3 и 40 дней, и взрослых потомков в возрасте 20 и 40 дней было значительно ниже у мутантных самок. Жизнеспособность "яйцо-взрослая особь" в потомстве мутантных самок в возрасте 3, 40 и 60 дней также была ниже (Рис. 6). В целом, репродуктивная способность мутантных самок была снижена по сравнению с контролем. Таким образом, наши данные не подтвердили предположение, о том, что снижение продолжительности жизни компенсирует повышение расхода ресурсов организма на репродукцию. Такой эффект был описан ранее [Flatt, 2011]. Известно, что спаривание повышает риск инфекционного заражения [Zhong и др., 2013], а *stc*, как гомолог транскрипционного фактора NF- κ B

человека, может играть роль в контроле иммунного ответа. Дальнейшие исследования необходимы для выяснения причин положительной корреляции между репродуктивным статусом самок и продолжительностью жизни.

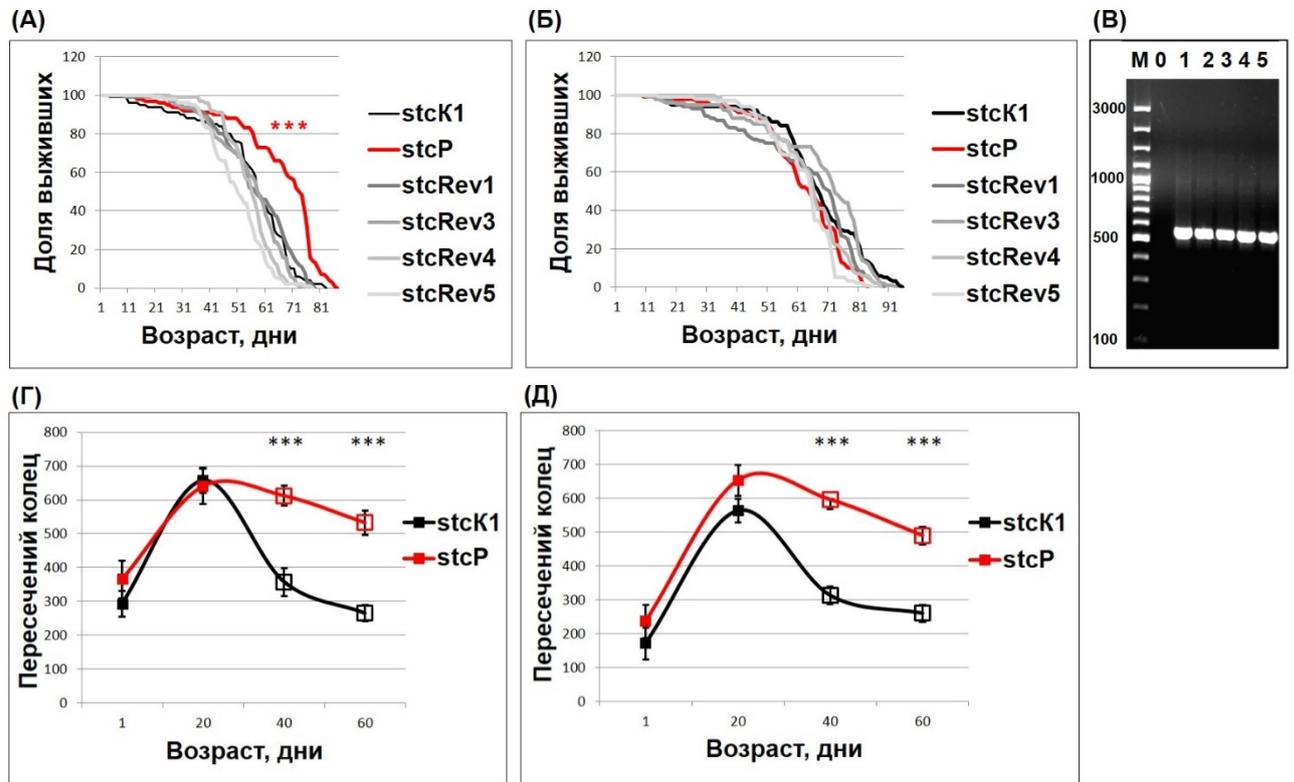


Рисунок 5 — Влияние мутации *stc[KG01230]* и ее реверсий на продолжительность жизни, подвижность девственных мух и структуру *stc*. (А) – кривые выживания самок (результаты этих опытов входят в диссертационную работу Рожиной Н. В., 2008). (Б) – кривые выживания самцов. (В) – ПЦР ревертантов с фланкирующими праймеров: М – маркер длин фрагментов; 0 – *stcP* (отрицательный контроль); 1 – *stcK1*; 2-5 – *stcRev1*, *stcRev3*, *stcRev4*, *stcRev5*. (Г) и (Д) – подвижность самок и самцов разного возраста.

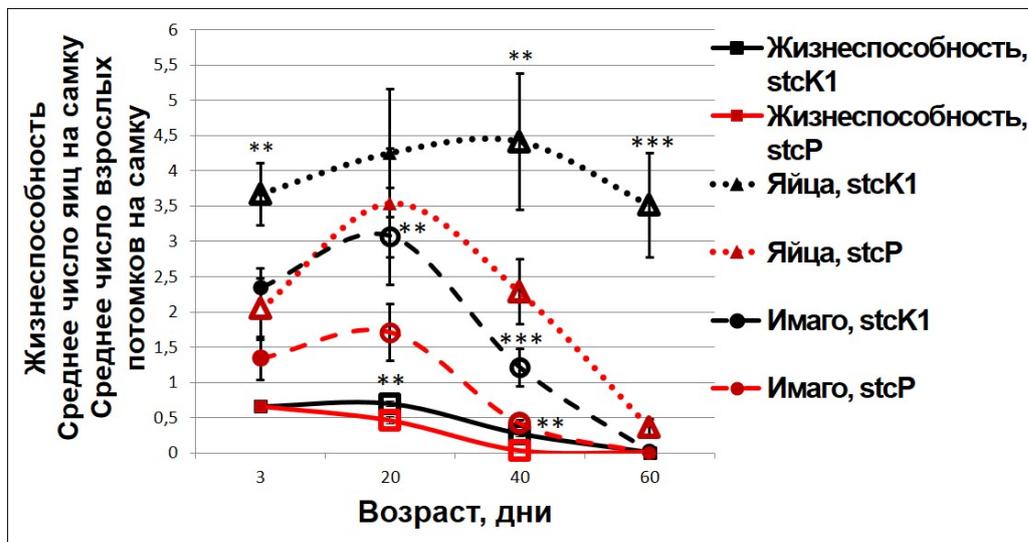


Рисунок 6. Влияние мутации *stc[KG01230]* на плодовитость скрещивавшихся мух, а также жизнеспособность их потомства.

Мы исследовали структуру и эффекты ранее полученных [Рощина, 2008] ко-изогенных линий с реверсией *stc*[KG01230]. Во всех четырех случаях реверсии были вызваны точным вырезанием инсерции, что было подтверждено с помощью ПЦР с фланкирующих инсерцию праймеров (Рис. 5 В) и последующим секвенированием. Продолжительность жизни девственных и скрещивавшихся самок с реверсиями была измерена ранее и была такой же, как у контрольной линии [Рощина, 2008]. Мы показали, что продолжительность жизни девственных и скрещивавшихся самцов с реверсиями соответствовала контрольному фенотипу (Рис.5 Б). Полученные результаты окончательно подтвердили, что реверсия мутации сопровождалась реверсией мутантного фенотипа, и доказали причинно-следственную связь между мутацией и ее эффектами на продолжительность жизни.

Мутация *stc*[KG01230] снижает экспрессию гена *stc*

Чтобы понять молекулярную основу различий в продолжительности жизни, вызванных мутацией, мы оценили влияние *stc*[KG01230] на количество транскрипта *stc*. Суммарное количество двух альтернативных транскриптов гена, RA и RB, отличающихся на 21 п.н., было измерено у личинок и имаго разного возраста обоих полов, а также в тканях, связанных с предполагаемыми функциями *stc* – мозге личинок и головах девственных самок, яичниках девственных и скрещивавшихся самок. Во всех случаях не было обнаружено отличий между контрольными и мутантными особями.

Уровень мРНК *stc* высок на протяжении всего эмбриогенеза до 18 часов развития (<https://flybase.org/reports/FBgn0001978>). Мы оценили количество транскриптов *stc* в мутантных и контрольных эмбрионах (Рис. 7). Во всех случаях количество мРНК *stc* было ниже в эмбрионах *stcP*. Точная реверсия мутации сопровождалась реверсией количества транскрипта, следовательно, именно снижение эмбриональной транскрипции *stc* лежит в основе увеличения продолжительности жизни мутантов.

Примеры такого раннего влияния генов на продолжительность жизни известны, но пока редки [Alcedo, Flatt, Pasyukova, 2013]. Инсерция, вызвавшая мутацию, находится в области старта эмбриональной транскрипции (5' RACE modENCODE) и может прямо обрывать часть возможных стартовых транскриптов. В этой области находится также «горячая» область связывания как минимум семи транскрипционных факторов TFBS_HSA_004897 (modENCODE), поэтому, более вероятно, снижение транскрипции гена объясняется тем, что инсерция отдаляет важный регуляторный район от старта транскрипции.

Нокдаун *stc* в нейронах влияет на продолжительность жизни и подвижность девственных самцов

У дрозофилы *Stc* был описан как нейрональный транскрипционный фактор [Tolias, Stroumbakis, 1998]. Учитывая этот факт, мы проанализировали влияние нокдауна *stc* в нейронах на продолжительность жизни. Мы подтвердили, что у самцов с нокдауном *stc* в нейронах снижено количество мРНК *stc* в голове, без изменений в теле, где относительное число нейронов невелико (рис. 8А).

Паннейрональный нокдаун уменьшил продолжительность жизни девственных самцов, но увеличил их подвижность в позднем возрасте (рис. 8Б, В). Эти результаты показали, что, несмотря на снижение продолжительности жизни, функциональный статус нервной системы у девственных самцов с нокдауном *stc* в нейронах был улучшен по сравнению с контролем. У самок продолжительность жизни и подвижность не изменилась.

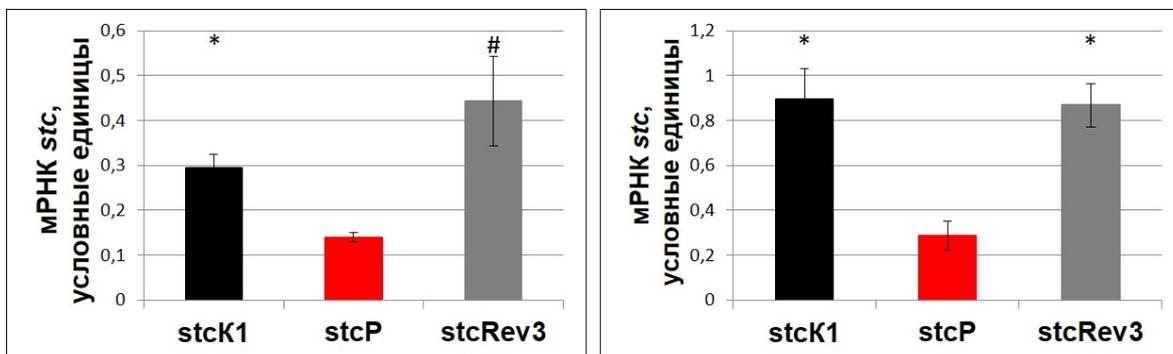


Рисунок 7. Влияние мутации *stc[KG01230]* и ее реверсий на экспрессию гена *stc* в эмбрионах. (А) – 0-12 часов. (Б) – 12-18 часов. Достоверность отличия от *stcP*, тест Краскела-Уоллеса: # - $P < 0,10$; * - $P < 0,025$ (с учетом поправки Бонферрони).

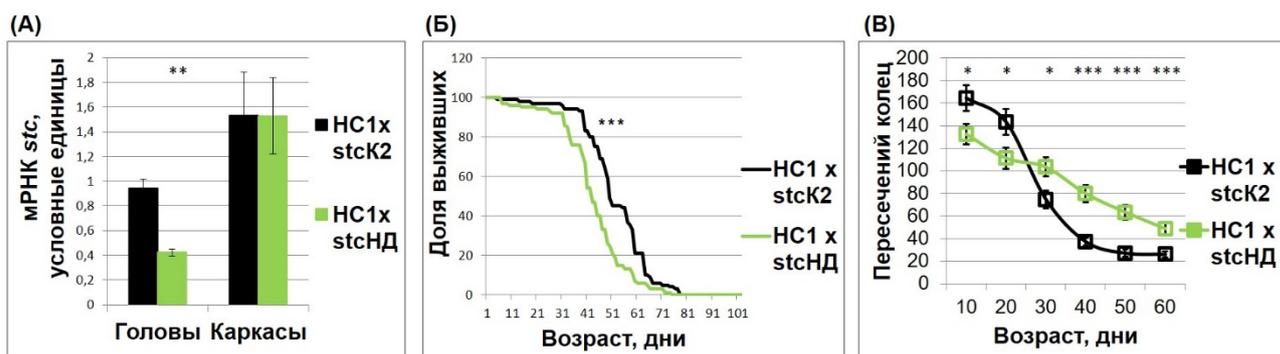


Рисунок 8 — Влияние нокдауна *stc* в нейронах на количество мРНК *stc*, продолжительность жизни и подвижность девственных самцов. (А) – количество транскрипта *stc* в головах и каркасах. (Б) - кривые выживания самцов. (В) – подвижность самцов.

Нокдаун *stc* в нервной системе модулирует эксайтотоксические эффекты у самцов

Глутаматная эксайтотоксичность – один из механизмов гибели мозга, в том числе, при старении, связанный с неспособностью организма снизить нарастающую концентрацию глутамата в синаптических щелях [Belov и др., 2020]. Учитывая, что нейрональный транскрипционный фактор *Stc* играет важную роль в мотонейронах [Stroumbakis, Li, Tolia, 1996], гибель мух при избытке глутамата вызвана усиливающимся синаптическим возбуждением, главным образом, в мотонейронах [Peng и др., 2019], а уменьшение экспрессии *stc* приводит к снижению активности синапсов (см. ниже), мы предположили, что нейрональный нокдаун *stc* может смягчать эксайтотоксичность, вызванную избытком глутамата.

При добавлении в корм глутамата в потенциально провоцирующей эксайтотоксическую реакцию концентрации 10 мМ, самки и самцы с нокдауном *stc* в нервной системе жили не меньше контрольных (рис.9 А). Этот результат был особенно заметен в раннем и среднем возрасте и соответствует предложенной гипотезе о том, что уменьшение экспрессии *stc* в нервной системе способно предотвратить индуцированную глутаматом гибель особей (рис.9 Б). Можно предположить, по аналогии с другими данными, что специфический нокдаун в эмбриональной нервной системе будет оказывать большее положительное влияние в позднем возрасте. Смягчение возрастной эксайтотоксичности может служить одним из механизмов, обуславливающих снижение вероятности смерти в позднем возрасте у особей с уменьшенной экспрессией *stc*.

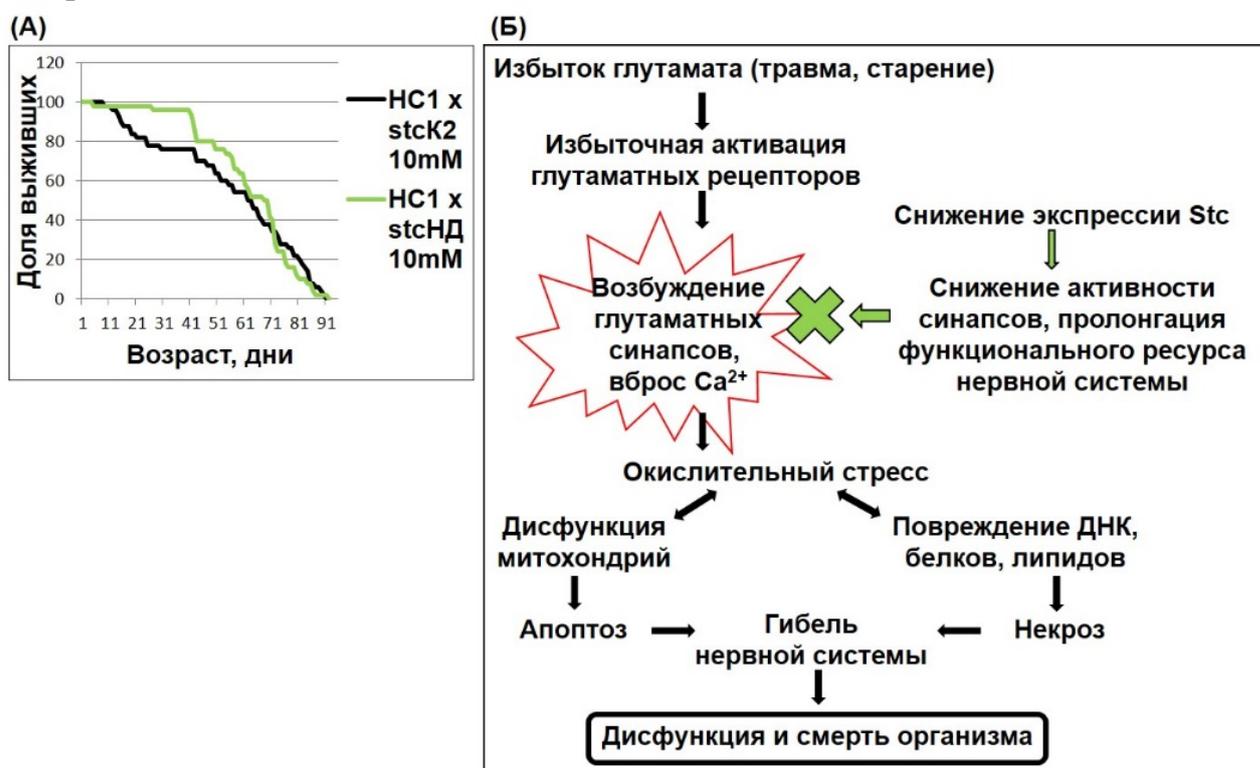


Рисунок 9 — Влияние глутамата на продолжительность жизни девственных самцов с нокдауном *stc* в нервной системе. (А) – кривые выживания самцов с 10 мМ глутаматом. (Б) – гипотетический механизм влияния сниженной экспрессии гена *stc* на глутаматную эксайтотоксичность.

Нокдаун *stc* в эмбрионах влияет на продолжительность жизни девственных самцов и самок, но не их подвижность.

Чтобы подтвердить или опровергнуть тот факт, что изменение работы гена на ранней стадии развития приводит к изменению фенотипа взрослых особей, мы проанализировали влияние на продолжительность жизни эмбрионального нокдауна *stc* в пяти независимых экспериментах с различными линиями-драйверами. Для одного эксперимента мы подтвердили, что в эмбрионах с нокдауном снижено количество мРНК *stc* (рис. 10Ж). Нокдаун *stc* в эмбрионах увеличил продолжительность жизни девственных самок в двух случаях (Рис.10

А, В), а девственных самцов во всех (Рис.10 Б, Г, Е). Также, во всех случаях, независимо от пола, согласно тесту Флеминга-Харрингтона, происходило увеличение выживания в позднем возрасте, что свидетельствует о замедлении старения. Сходство полученных результатов во всех исследованных случаях позволяет говорить о положительном влиянии нокдауна *stc* в эмбрионах на продолжительность жизни. Влияние на подвижность выявлено не было.

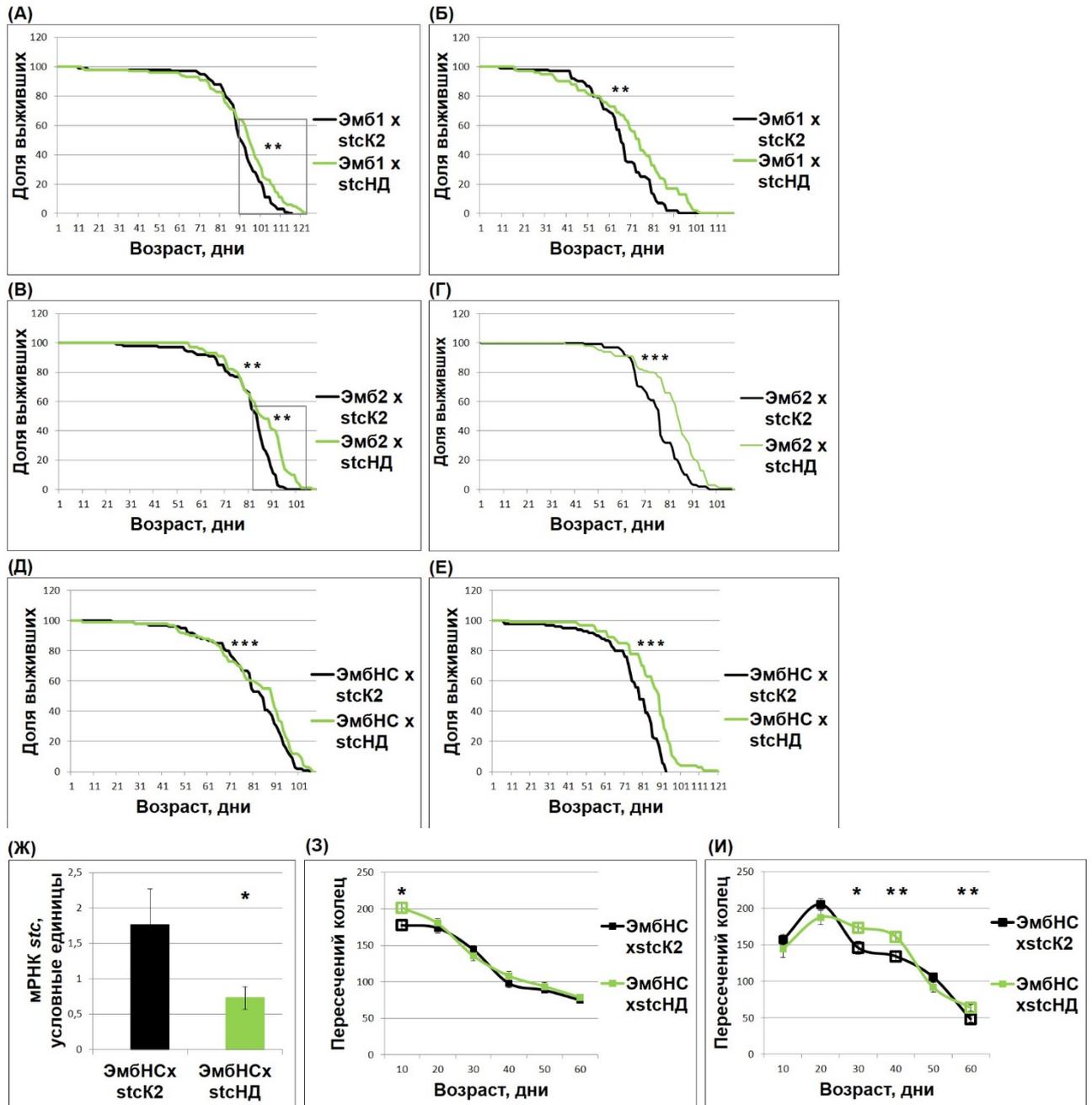


Рисунок 10 — Влияние нокдауна *stc* на эмбриональной стадии на количество мРНК *stc* и продолжительность жизни девственных самцов и самок. (А, В) – кривые выживания самок с нокдауном *stc* в эмбрионе. (Б, Г) - кривые выживания самцов с нокдауном *stc* в эмбрионе. (Д) – кривая выживания самок и (Е) - самцов с нокдауном *stc* в нервной системе эмбриона. (Ж) – количество мРНК *stc* в эмбрионе. (З) – подвижность самок и (И) - самцов с нокдауном *stc* в нервной системе эмбриона. Рамки обозначают поздние эффекты (достоверные по тесту Флеминга-Харрингтона).

Для того, чтобы понять, влияет ли уменьшение экспрессии *stc* в нервной системе эмбрионов не только на продолжительность жизни взрослых особей, но и на структурно-функциональные свойства постэмбриональной нервной системы, мы оценили структуру нейромышечных связок у особей с нокдауном *stc* и показали, что морфология синаптических бутонов была изменена (рис.11 А), а количество синаптически активных зон, связанных со скоплениями белка Bruchpilot (Bp) [Wagh и др., 2006], оказалось сниженным в два раза ($P=0,0057$, Рис.11 Б). Известно, что Bp накапливается с возрастом [Gehring и др., 2017], и это приводит к снижению пластичности синапсов [Gupta и др., 2016]. Более низкое количество Bp у особей с нокдауном *stc* может обеспечивать больший ресурс пластичности нервной системы с возрастом. Известно, что у мух с мутацией в гене *sleepless* увеличена синаптическая активность, снижен ресурс пластичности синапсов [Huang и др., 2020] и уменьшена продолжительность жизни [Bushey и др., 2010]. У человека когорты долгожителей характеризуются снижением экспрессии генов, связанных с синаптической активностью [Zullo и др., 2019]. Можно предположить, что у дрозофилы снижение экспрессии *Stc* обуславливает уменьшение базовой активности синапсов и, как следствие, увеличение пластичности нервной системы и продолжительности жизни.

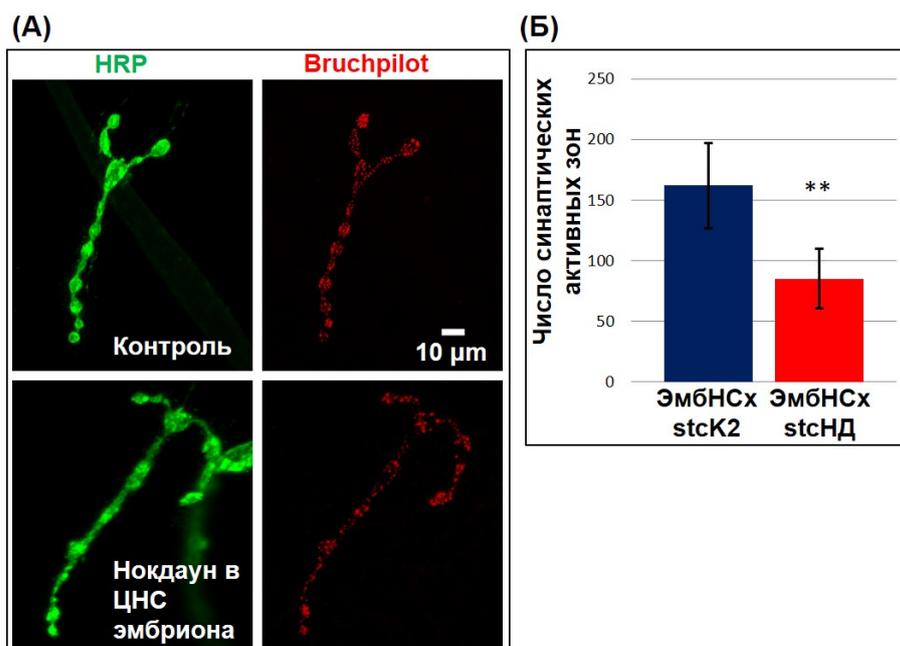


Рисунок 11. Влияние нокдауна *stc* в нервной системе эмбрионов на морфологию нейромышечных связок личинок. (А) – сравнение типичной структуры, окраска антителами к пероксидазе хрена, маркеру пресинаптических мембран (зеленый), и белку Bruchpilot (красный). (Б) – число зон активных синаптических контактов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нервная система, с момента возникновения ее предковых вариантов около 600 миллионов лет назад, является ключевым звеном, контролирующим все функции многоклеточных организмов и их реакции на изменения внутренней и внешней среды [Arendt, 2021; Moroz, 2015]. В связи с этим, очевидной является ее ключевая роль в определении такого значимого признака, как продолжительность жизни [Alcedo, Flatt, Pasyukova, 2013].

Базовые генетические процессы, лежащие в основе развития и функции нервной системы, сохраняются от первых многоклеточных до высших млекопитающих [Arendt и др., 2015; Arendt, 2021; Striedter, 2011]. В частности, нервная система насекомых и высших позвоночных имеет существенное структурное и функциональное сходство общей организации и конкретных элементов, в том числе, высокодифференцированных нейронов [Moroz, 2015]. Такое сходство позволяет переносить основные свойства нервной системы, изученные на более простой модели насекомых, на нервную систему высших позвоночных, избыточно сложную для детального изучения современными методами [Murphey, Chiba, 1990].

Мы показали, что инсерционные мутации в регуляторных областях генов, кодирующих нейрональные транскрипционные факторы *Stc* и *Esg*, снижают транскрипцию этих генов. Вероятно, нарушение структуры регуляторных областей изменяет их взаимодействие с регуляторными белками. Точное восстановление структуры ДНК в обоих случаях приводит к восстановлению уровня транскрипции, что доказывает причинно-следственную связь между наблюдаемыми структурными и функциональными изменениями.

Мы показали, что мутации, умеренно снижающие уровень транскрипции нейрональных генов *stc* и *esg*, увеличивают продолжительность жизни дрозофилы. Точные реверсии мутаций возвращают продолжительность жизни к уровню, характерному для контрольных линий, что доказывает существование причинно-следственной связи между уровнем транскрипции и продолжительностью жизни. Влияние сниженной экспрессии исследованных генов на продолжительность жизни было подтверждено благодаря использованию тканеспецифического нокдауна генов *stc* и *esg*. Полученные нами результаты позволяют глубже осознать фундаментальные генетические основы контроля продолжительности жизни.

Мы показали, что продолжительность жизни прошедшего полный метаморфоз имаго может зависеть от эмбриональной экспрессии нейронального гена. Передача эффектов мутации между стадиями развития может объясняться сохранением в ряду клеточных поколений индуцированных в ходе эмбриогенеза эпигенетических изменений или поддержанием заложенных структурно-функциональных изменений нервной системы. Изучению роли эпигенетики в контроле важнейших биологических процессов уделяется большое внимание, и наша экспериментальная модель может быть использована для углубленного

анализа роли различных эпигенетических модификаций, возникающих в раннем развитии, в контроле продолжительности жизни.

Исследованные нами гены участвуют в контроле различных структурно-функциональных свойств нейронов. Принципиальной задачей нашей работы было выяснить, связано ли влияние этих генов на продолжительность жизни с их нейрональной функцией. Мы показали, что нокдаун *esg* во всех нейронах может как увеличивать, так и уменьшать продолжительность жизни. Эффект, по-видимому, определяется степенью снижения экспрессии гена, при этом для продления жизни необходимо умеренное снижение его транскрипции. Нокдаун *stc* во всех нейронах на всех стадиях развития уменьшил продолжительность жизни, а на эмбриональной стадии – увеличил, что может быть связано с дополнительными функциями имагинальной экспрессии *stc*. Более того, нокдаун *stc* в эмбриональной нервной системе увеличил продолжительность жизни в той же степени, что и нокдаун в целом эмбрионе, что позволяет говорить о исключительной роли нейрогенеза в контроле продолжительности жизни.

Оба исследованных нами гена влияют на продолжительность жизни зависящим от пола образом: эффект мутации *esg* сильнее проявляется у самцов, мутация *stc* продлевает жизнь только самок. Половая специфичность может быть связана, например, со специфическими для самцов эффектами сниженной экспрессии *esg* в семенниках. В случае *stc* причины половой специфичности менее очевидны и могут быть связаны с неизвестными эпистатическими взаимодействиями. Зависимое от пола действие различных факторов на продолжительность жизни широко известно, но механизмы этой специфичности требуют дальнейшего изучения.

В целом, полученные нами данные позволяют лучше понять, каковы конкретные молекулярно-генетические механизмы, ключевые ткани и стадии развития, определяющие продолжительность жизни. Такое понимание необходимо для выбора потенциальных геропротекторных интервенций, в том числе влияющих на консервативные пути нейрогенеза, определения их тканевых и клеточных мишеней и времени их применения с учетом пола.

ВЫВОДЫ

1. Мутация гена *esg* приводит к снижению количества транскрипта гена и увеличению продолжительности жизни девственных самцов и самок *D. melanogaster*. Полная реверсия восстанавливает оба признака до контрольного уровня, неполная реверсия приводит к их частичному восстановлению. Мутация также улучшает подвижность мух в старости.

2. Мутация гена *stc* приводит к снижению количества транскрипта гена в эмбрионах и увеличению продолжительности жизни девственных самок *D. melanogaster*. Полная реверсия восстанавливает оба признака до контрольного уровня. Мутация также улучшает подвижность мух в старости.

3. Вызванный РНК-интерференцией нокдаун гена *esg* в нервной системе может приводить как к уменьшению, так и к увеличению продолжительности жизни девственных самцов и самок *D. melanogaster*. Эффект, вероятно, зависит от уровня снижения экспрессии гена.

4. Вызванное РНК-интерференцией снижение количества транскриптов гена *stc* в нервной системе приводит к уменьшению продолжительности жизни девственных самцов *D. melanogaster*.

5. Вызванное РНК-интерференцией снижение количества транскриптов гена *stc* на эмбриональной стадии приводит к увеличению продолжительности жизни самцов и, в меньшей степени, самок *D. melanogaster*, но не влияет на их подвижность.

6. Вызванное РНК-интерференцией снижение количества транскриптов гена *stc* на эмбриональной стадии влияет на экспрессию ряда генов-мишеней, ответственных за свойства нервной системы и приводит к изменению структуры нейромышечных связок и активности синапсов на более поздней стадии развития.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК

1. Roshina N. V.*, **Symonenko A. V.***, Kremntsova A. V., Trostnikov M. V., Pasyukova E. G. Embryonic expression of shuttle craft, a *Drosophila* gene involved in neuron development, is associated with adult lifespan // *Aging* (Albany NY). – 2014. – Т. 6, № 12. – С. 1076-93. doi: 10.18632/aging.100712.
* - равный вклад авторов
2. **Symonenko A. V.**, Roshina N. V., Kremntsova A. V., Pasyukova E. G. Reduced Neuronal Transcription of *Escargot*, the *Drosophila* Gene Encoding a Snail-Type Transcription Factor, Promotes Longevity // *Front Genet.* – 2018. – Т. 9. – С. 151. doi: 10.3389/fgene.2018.00151.
3. **Симоненко А. В.**, Рощина Н. В., Кременцова А. В., Рыбина О. Ю., Пасюкова Е. Г. Ген *shuttle craft* влияет на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*, контролируя раннее развития и модифицируя программу старения // *Биохимия.* – 2022. – Т. 87, № 12. – С. 1985-1997. doi: 10.31857/S0320972522120156.

Статьи и тезисы в других изданиях

1. Pasyukova E. G., Symonenko A. V., Roshina N. V., Trostnikov M. V., Veselkina E. R., Rybina O. Y. Neuronal Genes and Developmental Neuronal Pathways in *Drosophila* Life Span Control // *Life Extension.* 2015. – С. 3-37.
2. Roshina N. V., Symonenko A. V., Pasyukova E. G. *Drosophila melanogaster* lifespan is associated with genes controlling asymmetric neuroblast division. 2nd International Conference “Genetics of aging and longevity”, Abstract book, Moscow, Russia, 2012, С. 73.
3. Symonenko A. V., Roshina N. V., Pasyukova E. G. Embryonic transcription of genes involved in neuron development and *Drosophila melanogaster* lifespan. 2nd International Conference “Genetics of aging and longevity”, Abstract book, Moscow, Russia, 2012, С. 90.
4. Pasyukova E. G., Symonenko A. V., Rybina O. Y., Trostnikov M. V., Veselkina E. R., Kremntsova A. V., Roshina N. V. Temporal requirements of lifespan-influencing genes in *Drosophila*. 3rd International Conference “Genetics of aging and longevity”, Abstract book, Sochi, Russia, 2014, С. 24.
5. Symonenko A. V., Roshina N. V., Kremntsova A. V., Pasyukova E. G. Embryonic transcription of a neuronal gene *shuttle craft* affects *Drosophila melanogaster* lifespan. International Conference “Biomedical Innovation for Healthy Longevity”. Abstracts, St-Petersburg, Russia, 2016, С. 103.
6. Rybina O. Y., Symonenko A. V., Roshina N. V., Kremntsova A. V., Veselkina E. R., Schelkunov M. I., Sarantseva S. V., Pasyukova E. G. Neuronal transcriptional regulation of *Drosophila* life span. The tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology, Abstracts, Novosibirsk, Russia, 2016, С. 263.
7. Рыбина О. Ю., Рощина Н. В., Симоненко А. В., Кременцова А. В., Веселкина Е. Р., Пасюкова Е. Г. Роль нейрональных транскрипционных факторов в

- контроле продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*. Всероссийской конференции “Дрозофила в генетике и медицине”, Сборник тезисов, Гатчина, 2017, С. 39.
8. Symonenko A. V., Roshina N. V., Kremntsova A. V., Veselkina E. R., Rybina O.Y., Pasyukova E.G. Neuronal transcriptional networks in lifespan control. The eleventh International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology, Abstracts, Novosibirsk, Russia, 2018, С. 256. doi 10.18699/BGRSSB-2018-224
 9. Рощина Н. В., Симоненко А. В., Кременцова А. В., Пасюкова Е. Г. Нейрональные транскрипционные факторы в контроле продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*. Международная конференция “Дрозофила в генетике и медицине”, Тезисы, Гатчина, Россия, 2020, С. 35.
 10. Symonenko A. V., Roshina N. V., Kremntsova A. V., Pasyukova E.G. Neuronal transcriptional factors in lifespan control. The twelvth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology, Abstracts, Novosibirsk, Russia, 2020, С. 664. doi 10.18699/BGRS/SB-2020-405