

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

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор Е. Г. Пасюкова

Москва – 2022

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ.....	7
1.1. Актуальность работы.....	7
1.2. Степень разработанности проблемы	8
1.3. Цели и задачи	10
1.4. Научная новизна работы	10
1.5. Положения, выносимые на защиту	11
1.6. Научно-практическая значимость.....	12
1.7. Степень достоверности и апробация результатов.....	12
1.8. Личный вклад автора.....	16
1.9. Структура и объём диссертационной работы.....	16
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
2.1. Эволюционная консервативность развития, структуры и функции нервной системы	17
2.1.1. Возникновение структурно-функциональных особенностей нервной системы в процессе эволюции.....	17
2.1.2. Консервативность структуры, функций и регуляции развития НС, показанная на моделях насекомых и позвоночных.....	20
2.1.2.1. Общие принципы консервативности НС	20
2.1.2.2. Общий план трехмерной организации НС закладывается в эмбриогенезе	22

2.1.2.3. Гомеобоксные гены, определяющие план строения и участвующие в развитии НС от дрозофилы до высших млекопитающих	25
2.1.2.4. Организация структур НС, закладываемых в эмбриональном развитии	27
2.1.2.5. Развитие структур НС у взрослых особей. Грибовидные тела.	30
2.1.2.6. Развитие новых структур НС у взрослых особей. Зрительные доли	41
2.2. Нервная система как ключевая ткань в контроле продолжительности жизни	47
2.2.1. Ключевая роль метаболизма и срока жизни клеток НС в определении ПЖ организма.....	47
2.2.1.1. Определяющее влияние срока жизни нейронов для ПЖ организма.....	47
2.2.1.2. Способы повлиять на популяцию нейронов организма.....	53
2.2.1.3. Определяющее влияние глиальных клеток НС для ПЖ организма.....	55
2.2.1.4. Способы повлиять на функционирование с возрастом НС и организма в целом посредством глиальных клеток.....	57
2.2.1.5. Нейродегенеративные заболевания определяют продолжительность жизни.....	59
2.2.2. Консервативная генетическая регуляция сенсорной функции НС в регуляции ПЖ животных	61
2.2.2.1. Нейроэндокринная регуляция, зависящая от пищевых, зрительных и хемосенсорных сигналов	61

2.2.2.2. Нейроэндокринная регуляция, зависящая от термосенсорных сигналов	62
2.2.3. Другие консервативные механизмы участия НС в контроле ПЖ..	63
2.2.3.1. Роль НС в ответе на стресс	64
2.2.3.2. Роль в контроле ПЖ генетической регуляции функционирования самой НС.	66
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	68
3.1 Линии <i>D. melanogaster</i> , использованные в работе	68
3.2. Измерение продолжительности жизни.....	70
3.3. Анализ подвижности линий дрозофил	71
3.4. Измерение плодовитости и жизнеспособности	72
3.5. ПЦР и количественная ПЦР с реакцией обратной транскрипции (ОТ-кПЦР).....	73
3.6. Секвенирование продуктов ПЦР.....	74
3.7. Иммуноокрашивание и световая микроскопия	77
3.8. Статистический анализ данных.....	78
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	80
4.1. Влияние гена <i>escargot</i> на продолжительность жизни <i>D. melanogaster</i>	80
4.1.1 Полученные результаты.....	81
4.1.1.1 Мутация <i>esg[BG01042]</i> увеличивает продолжительность жизни девственных самцов и самок	81
4.1.1.2. Мутация <i>esg[BG01042]</i> снижает относительную экспрессию <i>esg</i>	87

4.1.1.3. Мутация <i>esg</i> [BG01042] увеличивает продолжительность жизни скрещивавшихся самцов	89
4.1.1.4. Мутация <i>esg</i> [BG01042] увеличивает подвижность	92
4.1.1.5. Нейрональный нокдаун <i>esg</i> продляет жизнь девственных самцов и самок	93
4.1.2 Обсуждение результатов.....	96
4.1.2.1. <i>esg</i> влияет на продолжительность жизни дрософилы	96
4.1.2.2. Роль 3' регуляторной области в модуляции транскрипции <i>esg</i>	101
4.2. Влияние гена <i>shuttle craft</i> на продолжительность жизни <i>D. melanogaster</i>	104
4.2.1 Полученные результаты.....	105
4.2.1.1. Мутация <i>stc</i> [KG01230] увеличивает продолжительность жизни девственных самок.....	105
4.2.1.2. Мутация <i>stc</i> [KG01230] снижает экспрессию гена <i>stc</i>	112
4.2.1.3. Мутация <i>stc</i> [KG01230] снижает продолжительность жизни скрещивавшихся самок	115
4.2.1.4. Мутация <i>stc</i> [KG01230] влияет на подвижность.....	117
4.2.1.5. Мутация <i>stc</i> [KG01230] влияет на плодовитость самок и жизнеспособность их потомков	119
4.2.1.6. Нокдаун <i>stc</i> в эмбрионах влияет на продолжительность жизни девственных самцов и самок, но не их подвижность	120
4.2.1.7. Нокдаун <i>stc</i> в нервной системе эмбрионов влияет на экспрессию генов, регулирующих структурно-функциональные свойства нервной системы, и нейро-мышечного соединения	125

4.2.1.8. Нейрональный нокдаун <i>stc</i> изменяет локомоторную активность и продолжительность жизни у девственных самцов	129
4.2.1.9. Эффект нокдауна <i>stc</i> в нервной системе зависит от глутамата	133
4.2.2 Обсуждение результатов.....	137
4.2.2.1. <i>stc</i> влияет на продолжительность жизни дрозофилы	137
4.2.2.2. Роль 5' регуляторной и нетранслируемой области в модуляции транскрипции <i>stc</i>	144
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	146
6. ВЫВОДЫ.....	152
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	153
8. ПРИЛОЖЕНИЕ	220

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность работы

Подавляющая часть эукариот подвержена старению, фундаментальному процессу постепенного и приводящего к итоговой гибели организма накоплению нарушений в функционировании и морфологии отдельных органов и систем органов [López-Otín и др., 2013]. Несмотря на характеризующую большинство количественных признаков низкий, обычно до 30%, уровень наследуемости [Finch, Tanzi, 1997]), определяющим продолжительность жизни фактором является набор генов организма, у животных известно около двух тысяч влияющих на продолжительность жизни и процесс старения генов, у человека их, как предполагается, более трехсот [Tascutu 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, скорость старения и здоровое долголетие организма.

Современные авторы рассматривают продолжительность жизни как сложный количественный признак, для определения которого генетический контроль очень важен, и изучение его вносит важный вклад в наше общее понимание базовых, контролирующих реализацию генетической информации, принципов. У высших эукариот многоуровневый контроль этого процесса принципиально важен, поскольку обуславливает возможность развития и функционирования сложных многоклеточных систем органов и организма в целом. Важно, что не столько большое количество генов в геноме, сколько изощренная регуляция их экспрессии 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 в целом. 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 экспрессией генов и фенотипом, является фундаментальной научной задачей, принципиально важной для понимания основ развития, жизни и старения живых организмов.

Важность исследования контролируемых сложные количественные 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 нашего времени, но бесспорным остается факт, что продление жизни имеет особую ценность в тех ситуациях, когда это связано с более долгим сохранением здоровья и возможностью отсрочить старение. Поэтому все большую важность приобретает изучение факторов достижения здорового долголетия. И основой разработки позволяющих его достичь методов снижения скорости старения является определение простых и эффективных мишеней на уровне как тканей, так и отдельных молекул.

1.2. Степень разработанности проблемы

Давно сформулировано, 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 собственными внутренними системами и метаболизмом [Alcedo, Flatt, Pasyukova, 2013; Pasyukova и др., 2015; Nassel, Zandawala, 2019]. Исследования

показали, что целевое, только в нервной ткани [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] или даже специфически в мотонейронах [Parkes и др., 1998; Morrow и др., 2004], изменение экспрессии многих групп генов продляет жизнь модельных организмов. Таким образом, изучение конкретных молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе такого влияния нервной системы на продолжительность жизни, представляет для нас актуальный интерес.

Один из механизмов, связанный с инсулиновым сигнальным путем и работой клеток нейросекреторного кластера мозга, был подробно исследован у *Drosophila melanogaster* (*D. 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 белки TOR, сАМР/РКА и других сигнальных путей, деацетилазы гистонов и ряд других [Pasyukova и др., 2015]. Дальнейшее изучение этого вопроса и поиск других механизмов представляется весьма важным и перспективным.

Ранее, благодаря совместной работе Лаборатории геномной изменчивости ИМГ РАН и кафедры генетики Государственного исследовательского университета Северной Каролины (США), применяя методы рекомбинационного и делеционного картирования, а также комплементационные тесты, был определен набор связанных с неизвестными до того регуляторными путями генов, влияющих 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 структуры и функций нервной системы дрозофилы. В лаборатории геномной изменчивости продолжается детальное исследование механизмов влияния этих генов на продолжительность жизни.

1.3. Цели и задачи

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.

1.4. Научная новизна работы

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 индуцированными нарушением работы генов *esg* и *stc* изменениями продолжительности жизни и подвижности мух, характеризующей функциональный статус нервной системы. Были получены новые факты, указывающие на половую

специфичность контроля продолжительности жизни. Было показано, что влияние гена *stc* на продолжительность жизни самок зависит от того, происходило ли скрещивание с самцами. Впервые продемонстрировано, 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 нейромышечного соединения и уменьшению активности синапсов на более поздней стадии развития.

1.5. Положения, выносимые на защиту

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

Снижение экспрессии исследованных генов в большинстве случаев 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.

1.6. Научно-практическая значимость

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 факторы транскрипции, с характеристиками нервной системы, статусом размножения и полом, а также продолжительностью жизни, может быть использована в процессе преподавания 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.

1.7. Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена статистической достоверностью наблюдаемых эффектов, их воспроизведением в независимых опытах, а также, в некоторых случаях, независимых модельных системах.

Достоверность результатов подкрепляется также непротиворечивостью основных выводов работы.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на III Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» (Киев, Украина, 2012); II и III Международных конференциях «Genetics of aging and longevity» (Москва, Россия, 2012; Сочи, Россия, 2014); 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).

По теме диссертации опубликовано 3 оригинальные статьи в международных рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией, 1 обзорная статья, 9 тезисов докладов на конференциях, в том числе международных.

Статьи

Roshina N. V.*, **Symonenko A. V.***, Kremetsova 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**

Symonenko A. V., Roshina N. V., Kremetsova 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.

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.

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 // Healthy Ageing and Longevity 3, Life Extension: Lessons from *Drosophila*, Vaiserman A. M. et al. (eds.), Springer International Publishing, Switzerland, 2015, P. 3-37. doi: 10.1007/978-3-319-18326-8_1.

Тезисы

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», Abstracts – Moscow, Russia, 2012. – С. 73.

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», Abstracts, – Moscow, Russia, 2012. – С. 90.

Pasyukova E. G., **Symonenko A. V.**, Rybina O. Y., Trostnikov M. V., Veselkina E. R., Krementsova A. V., Roshina N. V. Temporal requirements of lifespan-influencing genes in *Drosophila*. // 3rd International Conference «Genetics of aging and longevity», Abstracts – Sochi, Russia, 2014. – С. 24.

Symonenko A. V., Roshina N. V., Krementsova A. V., Pasyukova E. G. Embryonic transcription of a neuronal gene *shuttle craft* affects *Drosophila melanogaster* lifespan. // International Conference «Biomedical Innovation for Healthy Longevity». – St-Petersburg, Russia, 2016. – С. 103.

Rybina O. Y., **Symonenko A. V.**, Roshina N. V., Kremetsova 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.

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*. // Всероссийская конференция «Дрозофила в генетике и медицине», Сборник тезисов, – Гатчина, 2017. – С. 39.

Symonenko A. V., Roshina N. V., Kremetsova 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

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.

Symonenko A. V., Roshina N. V., Kremetsova A. V., Pasyukova E.G. Neuronal transcriptional factors in lifespan control. // The twelfth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology, Abstracts – Novosibirsk, Russia, 2020. – С. 664. doi 10.18699/BGRS/SB-2020-405

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ: 12-04-01182-а, 15-04-05797-а, 18-04-01127-а (Руководитель Пасюкова Е. Г.).

1.8. 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 опыты, иммуногистохимические исследования, анализ подвижности линий дрозофилы и биоинформатический анализ. В сотрудничестве с Рощиной Н. В. выполнены скрещивания и определение продолжительности жизни линий дрозофилы.

1.9. Структура и объём диссертационной работы

Диссертационная работа выполнена на 152 страницах, содержит 17 рисунков, 1 таблицу, состоит из разделов Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы; также она имеет Приложение на 19 страницах. Библиография работы содержит 407 источников.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Эволюционная консервативность развития, структуры и функции нервной системы

2.1.1. Возникновение структурно-функциональных особенностей нервной системы в процессе эволюции

Нервная система (НС) долгое время считается общепризнанным ключевым центром, определяющим функционирование и приспособление высших живых организмов к изменениям условий внутренней и внешней среды, окружающей их. Эту регуляторную роль она выполняет прямо или опосредованно в функциональном взаимодействии с эндокринной системой, из-за чего их часто объединяют в общую нейроэндокринную систему регуляции [Tortora, Derrickson, 2020; Stangor, Walinga, 2019]. Однако НС обрабатывает огромные объемы информации с большой скоростью передачи сигнала, что определяет беспрецедентное преимущество в скорости, точности реагирования на стимулы внешней и внутренней среды, а также межклеточной коммуникации внутри тех живых организмов, которые ее имеют, поднимая многоклеточные организмы на новый уровень организации [Arendt, 2021]. Таким образом, с момента ее возникновения в процессе эволюции НС стала ключевым и безальтернативным командным центром, определяющим характеристики реагирования, и в целом гомеостаз и возможность существования живых организмов [Erulkar, Lentz, 2022]. Предполагают, что первыми возникающими функциями НС могли быть доставка питательных веществ или подвижность организма [Jekely, 2011], также, возможно, иммунная функция ответа на бактериальные инфекции [Klimovich, Bosch, 2018].

Основные клетки нервной системы – нейроны, и также разработана теория, согласно которой гипотетические прото-нейроны были родственны секреторным клеткам [Maskie, 1990]. При этом многие авторы предполагают гетерогенное происхождение современных типов нейрональных клеток, представленных очень разными вариантами клеток, объединенных между собой только общей функцией передачи сигналов, от маленьких нейроноподобных клеток у личинок морских беспозвоночных, наиболее похожих на гипотетических предшественников, секретирующих сигнальные пептиды в открытые циркуляторные полости без сформированных синаптических структур, до экстремально специализированных примеров сложных нейронов с многочисленными высоко структурированными синаптическими бутонами у современных насекомых и позвоночных. Такое гетерогенное происхождение могло бы лучше объяснить все имеющееся разнообразие нервных клеток с различными механизмами функционирования и очень разнообразными системами сигнальных пептидов, начавших формироваться до 600 млн. лет назад [Moroz, 2015]. В рамках этой гипотезы развитие первичной нервной системы было подстегнуто необходимостью характерной для первичных нейронов системы передачи более сложных химических сигналов посредством нейропептидов соседним клеткам [Jekely, 2021; Vigh и др., 2004].

Альтернативная гипотеза предполагает, что нервная система эволюционировала не из отдельных секреторных клеток, а изначально представляла собой общую сеть горизонтально взаимосвязанных, объединенных в волнообразно движущиеся поля, реснитчатых клеток, отвечающим за скоординированное движение организма в пространстве. Следы организмов с такими стратегиями питания и передвижения предполагают в описанных остатках еще поздней вендской фауны [Ivantsov, 2011]. Такие системы, вероятно, осуществляли как транспорт частиц, так и двигательные движения, аналогичные скольжению или плаванию, и связи внутри сети неизбежно усложнялись по мере

увеличения размера таких организмов, самыми ранними кандидатами на роль которых являются эдиакарские кишечноротовые *Dickinsonia* и родственные им виды [Arendt и др., 2015; Sperling, Vinther, 2011], датируемые возрастом 567-550 млн. лет назад [Maslov, Podkovyrov, 2018]. И сейчас большое структурное сходство с реснитчатыми клетками имеют, например, фоторецепторы современных насекомых [Green, Hartenstein, Hartenstein, 1993].

В соответствии с этими теориями гетерогенного происхождения различных типов клеток нервной системы все эти, вероятно заложенные на самых ранних этапах возникновения из отдельных контактирующих клеток, связи и функции прото-НС, возможно имели место одновременно. Таким образом, часть нейронов современных организмов родственна по происхождению ранним секреторным клеткам, осуществлявшим коммуникацию с соседними, а другая часть – более родственна миоцитам, изначально существовавшим как координированная сеть реснитчатых клеток, осуществлявших движение [Arendt, 2021]. Также эти прото-нейроны, возможно, одновременно возникавшие у древних кишечноротовых, по-видимому, развивались из разных клеток, использующих различные типы пептидов и закладывали основу различающихся по нейромедиаторам сетей сигнализации [Moroz, 2015].

Следы биологических свидетельств, подкрепляющие теории о различном функционале и происхождении прото-нейронов отслеживаются и в современных, сильно усложнившихся взаимных связях сетей регуляции нейрональных генов с генами, регулирующими функции иммунной и эндокринной систем, например, при их анализе посредством базы данных KEGG Pathways [Kanehisa, Goto, 2000; Kanehisa, 2019; Kanehisa и др., 2022]. Также лучшим и универсальным индикаторным признаком, определяющим функциональное состояние и ресурс функционирования НС организмов, считается функциональный тест на подвижность [Jones, Grotewiel, 2011]. В связи с предполагаемой ключевой ролью

НС в определении продолжительности жизни (ПЖ) важно отметить, что такой тест на скорость движения является лучшим прогностическим признаком для определения скорости старения и вероятной ПЖ самых разных организмов, от *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) [Huang и др., 2004; Jushaj и др., 2020; Rollins и др., 2017] до человека [Argyridou и др., 2020; Celis-Morales и др., 2019; Studenski и др., 2011]. Также прослеживается четкая корреляция хронологически зависимых изменений подвижности с генетическими маркерами старения у модельных организмов и человека [Dempsey и др., 2022; Mundstock и др., 2015]. В связи с этим даже разрабатываются автоматизированные системы оценки двигательного статуса больших групп людей для предсказания их риска смертности [McIntyre и др., 2021].

2.1.2. Консервативность структуры, функций и регуляции развития НС, показанная на моделях насекомых и позвоночных

2.1.2.1. Общие принципы консервативности НС

Важной особенностью нервной системы является высокая консервативность ее структуры и выполняемых функций. Это объясняется сложностью структур, по-видимому, заложенных в период формирования НС, ее общей организации и особенностей генетической и физиологической регуляции развития и функционирования. В дальнейшем эти структуры и паттерны масштабировались, усложнялись, но, очевидно, сохраняли многие базовые черты, общие для всех эволюционно возникших организмов.

Что важно, наличие базовой масштабируемой структуры наблюдается не только в процессе филогенеза видов, но и в онтогенезе организмов. Так, в процессе роста и усложнения на различных стадиях личинки и куколки *Drosophila*

melanogaster (*D. m.*) нейрональные сети радикально усложняются: количество нейронов, синаптических структур и синапсов увеличивается в пять раз, но при этом они сохраняют базовые структурные единицы [Gerhard и др., 2017]. Нейронные сети насекомых часто используются как модель онтогенетического развития более сложных количественно, но структурно и онтогенетически похожих НС позвоночных. Большим преимуществом этих моделей при сложной и развитой структуре синапсов, аналогичной позвоночным, является то, что они содержат меньшее число крупных, хорошо отличимых нейронов, позволяющих на них аккуратно и с высоким разрешением изучать сложные процессы развития [Murphey, Chiba, 1990]. Например, большой ценностью обладает подробно изученная и задокументированная в процессе развития сеть нейрональных взаимодействий *D.m.* [Schneider-Mizell и др., 2016]. Такие нейрональные сети не просто максимально подробно документированы, но изучаются и их изменения в результате различных воздействий [Scheffer и др., 2020]. При этом более короткая ПЖ этих организмов не только не снижает роль происходящих в течение жизни процессов, но увеличивает их значение для эффективного формирования адаптивных структур и синаптических взаимодействий [Murphey, Chiba, 1990]. Отдельным вызовом для консервативной НС является процесс метаморфоза, который проходит организм насекомых, первоначально с эмбриональным развитием и ростом эмбриона в личинку, далее превращением личинки в куколку и образованием имаго. Эти драматические изменения, тем не менее, сложно и координированно регулируются выделением гормонов, которое запускает работу регуляторных генетических каскадов [Levine, Morton, Restifo, 1995]. Например, показано, что ключевую роль в метаморфозе НС играют регулируемые гормонами транскрипционные факторы Dfd (Deformed) и Br (Broad Complex) [Restifo, Merrill, 1994]. НС в процессе метаморфоза, тем не менее, сохраняет основные заложенные в эмбриогенезе структуры. Они растут, часть развившихся ранее нейронов проходит через два

раунда программируемой клеточной гибели, при окукливании и при вылуплении взрослого насекомого [Truman, 1990]. К существующим нервным узлам добавляется большое количество новых, специфически взрослых нейронов, тем не менее, развивающихся из заложенных ранее и остановившихся в развитии эмбриональных нейробластов. [Booker, Truman, 1987; Levine, Truman, 1982].

При этом, аналогично происходящему у позвоночных, у насекомых постэмбриональный нейрогенез окончательно останавливается в большинстве случаев в позднем личиночном и раннем периоде куколки, кроме небольших групп нейробластов в грибовидных телах.

2.1.2.2. Общий план трехмерной организации НС закладывается в эмбриогенезе

Первый этап, определяющий спецификацию нейронов проходит в эмбриональном нейроэпителии, где уже на ранних этапах закладываются паттерны пространственной поляризации и сегментации. Эмбриональная НС дрозофилы считается классическим примером этого механизма, где молекулярная система координат закладывается посредством полярной оси первичной сегментации с участием семейства регуляторных генов *Gap* и дорсовентрального градиента при помощи консервативного семейства транскрипционных регуляторов *Нох* [Technau, 2008; Urbach, Technau, 2003]. Эта система закладывает трехмерную пространственную сеть координат, определяющую уникальную судьбу каждого нейробласта, и соответственно, тип нейронов, которые возникнут в ходе дальнейшего развития НС в каждой точке нейроэктодермы, в зависимости от уникального паттерна экспрессии регуляторных генов, создающегося для каждого отдельного нейробласта. Эти регуляторные гены запускают уникальные генетические каскады в каждом нейробласте, и, в конечном итоге, экспрессия групп

регуляторных генов точно определяет судьбу каждого производного нейрона личинки или имаго с уникальной морфологией и системой нейротрансмиттеров. Так, в каждом гемисегменте брюшного нервного тяжа дрозофилы 30 нейробластов формируют набор материнских ганглиозных клеток (ganglion mother cells, GMC), из которых образуется более 400 постмитотических нейронов и клетки глии. В результате, за сутки эмбриогенеза общее поле недифференцированной нейроэктодермы превращается в сложную, точно пространственно организованную и функционально связанную личиночную ЦНС, далее развивающуюся во взрослую ЦНС имаго [Skeath, 1999; Skeath, Thor, 2003]. Изначально, судьба отдельного нейробласта рассматривалась как относительно случайная в зависимости от стохастических колебаний экспрессии этих регуляторных каскадов в пределах его группы принадлежности (в частности, групп генов *Achaete-Scute* (*ac-sc*) и *Notch*). Однако, позднее стало все более очевидно, что пространственное расположение клеток и сопоставленные ему уровни экспрессии генов на самом деле с намного большей определенностью задают уникальную судьбу каждой отдельной клетки в нервной системе развивающегося эмбриона [Cubas и др., 1991]. Кроме этого, показано, что у нуль-мутантов, несмотря на отсутствие транскрипционных регуляторов *Ac-Sc* и *Notch*, определяющих гибель части нейробластов на разных этапах эмбриогенеза, все равно происходит формирование как минимум половины нейробластов, что подтверждает наличие разных, вероятно, эволюционно возникших, групп клеток НС с отличными друг от друга и не до конца изученными системами генетической регуляции, определяющими их судьбу [Jimenez, Campos-Ortega, 1990].

Еще одним высококонсервативным семейством генов, определяющим сегментную полярность эмбриональной НС у разных классов живых организмов считаются гены *ht-en*, представителем которых у дрозофилы является *engrailed* (*en*) [Ramirez и др., 1995]. Показаны гомологи *en*, выполняющие сходные функции как

в регуляции развития НС у низших беспозвоночных, так и в развитии ЦНС у мыши (ген *En-2*, [Millen и др., 1994]), хотя ее НС имеет, казалось бы, принципиально другую, несегментированную, структуру. Это еще один интересный пример того, что генетические факторы, определяющие принципиальную структуру НС, могут сохранять не только структурную, но и функциональную консервативность у всех животных, имеющих филетическое сходство [Ramirez и др., 1995]. Накапливается все больше свидетельств в пользу того, что НС беспозвоночных имеет, несмотря на кажущееся разноплановым строение, большое структурное и функциональное сходство, позволяющее говорить как о едином плане строения, так и сходной генетической регуляции базовых процессов ее развития. Одним из таких, базовых и высококонсервативных для животных механизмов развития НС, по-видимому, является процесс аксоногенеза [Whittington, Leach, Sandeman, 1993]). В дальнейшем изучение общих механизмов и принципов нейрогенеза позволит продолжить аналогии, касающиеся происхождения, структуры и функции НС позвоночных [Strausfeld, 1998].

Неожиданное открытие, сделанное в 1980-е годы, что основные группы транскрипционных регуляторов, определяющих эмбриональное развитие НС дрозофилы, консервативны и существуют у многих высших позвоночных, вплоть до мышей и человека, стимулировало развитие эволюционной биологии развития (эво-дево, *evolutionary developmental biology*). Замечательно, что даже некоторые функции этих консервативных генетических регуляторов развития сохраняются при переносе соответствующих трансгенов мыши дрозофиле. Основным положением подхода эво-дево в нейробиологии является то, что эволюционно консервативное сходство в развитии (прежде всего НС) следует рассматривать как основную базу, прежде чем переходить к специфическим особенностям, характерным для отдельных таксонов [Striedter, 2011]. Этот подход открывает не только надежду на открытие систематических эволюционно консервативных

принципов развития НС у разных видов, от насекомых до человека, но также и на моделирование на основе опытов на дрозофиле как модельном объекте новых возникающих, общих для живых организмов особенностей развития и характеристик НС, вплоть до моделирования путей развития поведения и реакций видов в перспективных экосистемах, которые будут сформированы в результате продолжающейся эволюции в новых условиях других планет и космоса [Marco и др., 2003]. Более того, высокий уровень обобщения и интегральный подход позволяют рассматривать с эволюционной точки зрения влияние ключевых систем, в частности, НС на такие интегральные показатели живых организмов, как поведение и ПЖ [Marco и др., 1999].

2.1.2.3. Гомеобоксные гены, определяющие план строения и участвующие в развитии НС от дрозофилы до высших млекопитающих

Впервые гомеобоксные гены, высококонсервативно регулирующие ключевые процессы развития и функционирования организмов в разных таксонах, были открыты именно у дрозофилы, когда в процессе клонирования генов было показано, что два гена комплексов *bithorax* и *Antennapedia* содержат общие консервативные последовательности длиной 180 нуклеотидов [McGinnis и др., 1984б]. Почти сразу же было проведено обобщение, что такие мотивы содержатся в кластерах генов, кодирующих консервативные белки, контролирующие развитие дрозофилы [Scott, Weiner, 1984], и также других сегментированных многоклеточных [McGinnis и др., 1984а]. В целом, такие, найденные у дрозофилы, белковые домены размером около 60 аминокислот или 180 нуклеотидов, называемые гомеобоксами или гомеодоменами оказались высококонсервативны, и проведенный поиск обнаружил их в важных белках, контролирующих развитие и функционирование у таксонов всех царств многоклеточных животных, от

кукурузы, грибов и губок до лягушки и человека, что явилось важным доказательством их общего монофилетического происхождения, а также важности функций, регулируемых этими высококонсервативными белками [Carrasco и др., 1984; Gehring, Affolter, Burglin, 1994; Levine, Rubin, Tjian, 1984; Seimiya и др., 1998; Schulz и др., 1990; Vollbrecht и др., 1991]. Следующим важным общим принципом, обнаруженным также изначально у дрозофилы оказалось то, что такие гены часто организованы в геномные кластеры, контролирующие последовательные этапы развития [Gehring, Affolter, Burglin, 1994]. Одним из примеров такого комплекса генов является семейство из 8 *Hox*-генов дрозофилы, объединенных в два генных комплекса: в пространственном и временном порядке участия в эмбриогенезе это комплекс *Antennapedia* (ANT-C), из контролирующих развитие головы и переднего торакса генов *lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr*, *Antp*, и комплекс *Vithorax* (VX-C) из трех генов *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B*, контролирующих развитие заднего торакса и абдоминальных сегментов. Ген *Zen*, по-видимому, находившийся в этой последовательности между *pb* и *Dfd*, в процессе эволюции необходимый уровень гомологии утратил [McGinnis, Krumlauf, 1992]. Еще более интересным, хотя и ожидаемым, фактом оказалась высокая консервативность *Hox*-генов, контролирующих развитие. Так, у человека из более чем двухсот гомеобоксных генов 39 относятся к семейству *Hox* [Holland, Booth, Bruford, 1994]. Поразительное сходство у всех многоклеточных программы, контролируемой группой *Hox*-генов позволяет говорить о гомологии и консервативности генетической программы развития НС, позволяющей переносить детали и общие закономерности такого генетического контроля, обнаруженные у дрозофилы, на развитие НС человека [Held, 2017]. Гомеобоксных генов в виде жестко организованной, контролирующей развитие последовательности нет у прокариот, но и там находят важные белки с гомеобоксными структурными доменами, из которых они, вероятно, и эволюционировали [Kissinger и др., 1990; Otting и др., 1990]. Сложно установить точный переходный этап, но предполагают,

что *ProtoHox* кластер из нескольких организованных гомеотических генов, произошедших в результате дупликации одного предкового гена, уже существовал у общего предка кишечноротовых и билатеральных многоклеточных животных, не менее, чем 600 миллионов лет назад [Holland, 2013; Pearson, Lemons, McGinnis, 2005].

2.1.2.4. Организация структур НС, закладываемых в эмбриональном развитии

Не только изначально заданная и реализованная под генетическим контролем общая организация НС, но также общие характеристики отдельных важных нейрональных структур и узлов сохраняются на протяжении всего онтогенеза, невзирая на прохождение этапов метаморфоза. Также сохраняется в целом распределение и функционал нейротрансмиттеров в конкретных отделах НС. Так, личиночные нейроны, происходящие из эмбриональных нейробластов и останавливающиеся на каких-то этапах в развитии, но затем снова активирующиеся и проходящие процесс нового роста и образования связей, составляют, несмотря на интенсивные перестройки органов и систем, основную массу нейронов во многих нервных узлах [Gendre и др., 2004]. Взрослая нервная система строится на основе ранее заложенных структурных групп, сформированных из личиночных сенсорных нейронов, интернейронов и мотонейронов [Levine, Morton, Restifo, 1995]. В некоторых случаях такие, эмбрионального происхождения, нейроны с образованием новых связей приобретают новый функционал, но структурно и по происхождению они закладываются в эмбриогенезе и продолжают развиваться в процессе роста личинки. Это становится очевидной проблемой в случаях, когда необходимой смены функционала не происходит, заложенные ранее нейроны продолжают выполнять свои первичные функции. Интересным открытием

оказалось то, что и в таких случаях взрослый функционал уже присутствует в заложенных синаптических связях нейронов, но подавляется сложной системой ингибиторных воздействий, которые координированно снимаются при перестройке, вызванной гормонально активированными генетическими сетями регуляции при вылуплении имаго. Это происходит, в частности, при реорганизации функций мотонейронов в процессе развития. Функции личиночных синапсов мотонейронов часто бывают избыточными и разнонаправленными, часть передающихся сигналов может взаимно гаситься, и проходят только некоторые из потенциально заложенных. Впоследствии взрослый организм теряет часть взаимно ингибирующих друг друга синаптических связей, заложенных на ранних этапах развития, в результате чего передача сигнала упрощается до однонаправленной, с видимым изменением итоговых суммарных эффектов этих нейронов [Levine, Truman, 1982].

В последнее время одним из важных направлений стало построение максимально возможно полных моделей синаптических взаимодействий модельных организмов в рамках ЦНС, других отдельных участков или НС в целом. Это направление требует взаимодействия многих специализированных коллективов экспериментаторов и биоинформатиков, но обещает более полное понимание взаимосвязи структуры и функций НС, связанных с развитием и поведением. Этот процесс начался около 40 лет, назад, но первые попытки построить даже схему взаимодействий сравнительно простых НС, как у *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*), состоящей из 302 простых и незначительно ветвящихся нейронов, примерно 5000 синапсов и 2000 нейромышечных соединений [White и др., 1986], заняли почти десятилетие и продемонстрировали необходимость в развитии экспериментальных и биоинформатических технологий [Pirkin, 2020]. Так, важным достижением современного большого коллектива участников проектов FlyEM и Janelia с участием коллабораторов Google стало

построение схемы связей большей части одной из половин мозга взрослой *D.m.*, идентифицирующей более 25000 нейронов и 20 миллионов синапсов, подробно аннотированной и доступной онлайн [Scheffer и др., 2020]. При этом, полное количество нейронов мозга мухи оценивают более чем в 100000, вместе с более 100 миллионов синапсов. Мозг дрозофилы кажется хорошим компромиссным объектом изучения на текущем этапе развития нейробиологии и информатики, обладая достаточно большой, сравнимой с позвоночными, сложностью синаптических контактов, и при этом оставаясь еще доступным для изучения и систематизации с помощью имеющихся сейчас методов и технических средств. Удобство использования НС дрозофилы для исследования подкреплено также легко выявляемой взаимосвязью его структуры с поведением модельного объекта, его отлично изученными генетическими особенностями и наличием разработанного набора генетических инструментов [Meinertzhagen, 2018].

Параллельно возникают как общие обзоры принципов организации (например, [Iyer, Tole, 2020]), так и подходы к изучению отдельных участков коннектома позвоночных. Например, многолетним продолжающимся проектом института Макса Планка является дополняемая схема с клеточным разрешением до 2000 индивидуально меченных GFP нейронов головастика *Danio rerio* [Kunst и др., 2019], также производятся описания принципов построения коннектома различных участков и разрешения мозга мыши [Coletta и др., 2020] и крысы [Noori и др., 2017; Schmitt и др., 2012 Schmitt и др., 2014]. Обратным процессом, не детализирующим, но максимально обобщающим сходство таксонов может служить создание максимально общих, но также насколько возможно подробных интегральных схем НС больших таксонов, в частности, систематической номенклатуры мозга насекомых [Ito и др., 2014].

2.1.2.5. Развитие структур НС у взрослых особей. Грибовидные тела

Как было упомянуто ранее, аналогично происходящему у позвоночных, у насекомых постэмбриональный нейрогенез окончательно останавливается в большинстве случаев в позднем личиночном и раннем куколичном периоде, кроме небольших групп нейробластов в грибовидных телах и оптических долях. Это фактически одни из самых заметных структур НС, развивающихся в течение жизни имаго насекомых, возможно, наиболее важных в возникновении новых форм поведения. Интересно определить, возникают ли они *de novo*, как структура, не зависящая от заложенного на предшествующих этапах развития.

Грибовидные тела – очень заметные структуры НС насекомых, впервые описанные еще в 1850 году у пчел, и уже тогда было замечено, что они больше у социальных насекомых, чем у ведущих одиночный образ жизни, предположительно, являясь центром интеллекта [Dujardin, 1850]. Любопытно, что многие более поздние исследователи затруднялись найти зависимость между их размером и предполагаемой ими сложностью поведения изучаемого вида насекомых, и только исследования последних лет, учитывающие многие аспекты поведения, позволяют достаточно точно понять эту их важнейшую роль [Strausfeld, Buschbeck, Gomez, 1995]. С появлением современных методов исследований оказалось возможным более точно изучить роль этих структур в поведении и их изменения в течение жизни имаго. Это позволяет сделать более детальный, но похожий вывод: они являются интегратором прижизненного, преимущественно ольфакторного, опыта, накапливаемого в течение жизни имаго насекомых, тем, что можно определить, как центр ассоциативной памяти [Perisse и др., 2013]. Было показано, что роль этих структур в обучении, подкрепляемом как положительными, так и отрицательными стимулами у дрозофилы, как и у млекопитающих, играют одни и те же дофаминергические нейроны, в связи с чем выдвигают

предположение, что процессы обучения и образования ассоциативной памяти в этих структурах являются консервативной особенностью НС, общей для всех живых организмов, что позволяет изучать грибовидные тела у дрозофилы и обобщать найденные закономерности [Waddell, 2013]. Функциональным аналогом грибовидных тел у позвоночных, в частности, млекопитающих может считаться гиппокамп, участвующий в обработке новых сигналов и формировании памяти и сложных моделей поведения в течение жизни организма благодаря сохраняющейся пластичности НС (например, для навигации в пространстве) [Muller, 1996; Strausfeld и др., 1998]. Также, проводятся структурные и функциональные аналогии, согласно которым функция грибовидных тел в части формирования реакций на обонятельные стимулы может быть сходна с функциями мозжечка или полосатого тела мозга высших позвоночных [Mizunami и др., 1997]. Так же, как и в аналогичных структурах мозга млекопитающих, в дофаминергических нейронах грибовидных тел дрозофилы происходит обеспечиваемый обратными связями между нейронами сложный, точно выдержанный по времени, процесс постоянного формирования новых типов памяти и поведения, их проверки, закрепления или модификации, требующий высокой степени синаптической пластичности НС, стимулируемой выделением дофамина [Cognigni, Felsenberg, Waddell, 2018; Felsenberg и др., 2017]. Эта аналогия прослеживается не только структурно, но и глубже, вплоть до сходства биохимических механизмов и гомологичности пептидных нейротрансмиттеров, участвующих у дрозофилы и человека в образовании памяти под воздействием дофамина [Kandel, Abel, 1995].

Такое сходство с высшими животными и человеком, преимущественно оперирующим зрительной информацией как субстратом памяти [Brady и др., 2008], кажется неожиданным, из-за очевидной ориентации грибовидных тел современных насекомых на обработку обонятельных стимулов. Однако следует заметить, что у предков членистоногих и древнекрылых насекомых, у которых обоняние не играло

такой заметной роли, грибовидные тела также существовали, вероятно, как центры обработки механосенсорных стимулов, так что первичной для них является не ольфакторная функция (значение которой, как стимула, выросло только для регуляции поведения современных насекомых), а интегративные процессы обработки и передачи информации между отделами НС [Strausfeld, 1998]. Показано, что эти структуры могут в процессе эволюции таксонов подвергаться экстремальному уменьшению, даже потере или включению в состав других регионов мозга, однако общий принцип их происхождения и функциональная преемственность прослеживается на очень широком спектре эволюционно родственных видов даже когда кажется невозможным их выделить структурно в составе НС [Strausfeld, Wolff, Sayre, 2020].

Адаптивность и пластичность – основные и необходимые принципы работы НС, обуславливающие ее ключевую функцию в течение жизни животных [La Rosa, Bonfanti, 2018]. В качестве модели структур, накапливающих индивидуальный жизненный опыт имаго, грибовидные тела, казалось бы, являются полной противоположностью эмбрионально закладываемых структур, развитие которых жестко регулируется генетически. Однако многие исследования показывают, что и в определении рамок развития этих структур у имаго ключевую роль играют факторы, закладываемые на ранних этапах развития.

Так, у дрозофилы структура грибовидных тел полностью описана и картирована на клеточном уровне, что позволяет детально изучать происходящие в них процессы и изменения. Грибовидные тела состоят из примерно 2200 нейрональных клеток, 2000 из которых составляют клетки Кеньона (основные интернейроны грибовидных тел насекомых), объединенные в 15 компартментов, каждый из которых является полуавтономным центром обработки и передачи сигналов [Aso и др., 2014]. Каждая отдельная клетка Кеньона конвергентно собирает сигналы с уникальной для нее и, по-видимому, случайным образом

сформированной группы в среднем из 6 ольфакторных гломерул, находящихся в антенных долях мозга дрозофилы и, в свою очередь, собирающих сигнал с сенсорных клеток в антеннах [Caron и др., 2013; Gruntman, Turner, 2013]. Далее сигналы клеток Кеньона интегрируются 21 типом выходных нейронов грибовидного тела (каждый отдельный тип выходных нейронов представлен, чаще всего, одной-двумя клетками) и передаются наружу грибовидного тела для исполнения, а сигнал сенсорных клеток подавляется. При этом точная схема суммирования и передачи сигналов в грибовидном теле определяется образующимися синаптическими контактами между всеми группами клеток, вовлеченных в обработку и передачу сигналов через грибовидное тело. Эта схема и итоговый результат на выходе из грибовидного тела уникальны для каждой отдельной дрозофилы, система синаптических контактов в грибовидном теле должна быть сформирована как часть процесса обучения в течение жизни имаго и требует значительной степени пластичности НС. Дрозофила представляется золотой серединой для изучения процессов, происходящих при перестройках синаптических контактов, между беспозвоночными, например, моллюском *Aplysia* с совсем простой НС [Hawkins, Byrne, 2015] и высшими позвоночными с избыточно сложной для изучения современными методами, но, по-видимому, принципиально сходно устроенной НС, сохраняющей пластичность и накопление опыта в течение жизни [Hige и др., 2015; Kandel и др., 2000].

Ключом к пониманию непрерывно формируемой в течение жизни структуры грибовидных тел является их общее происхождение из эмбриональной нейроэктодермы. Каждая доля грибовидных тел образуется из 4 нейробластов, для которых полностью отслежено происхождение и последовательность клеточных поколений в процессе развития. Деления их происходят независимо от системы сигналов Notch, и каждый нейробласт образует свою независимую клеточную линию, состоящую как минимум из трех последовательных, морфологически

отличающихся типов нейронов [Kunz и др., 2014; Lee, Lee, Luo, 1999]. Образующиеся из нейробластов нейроны определяют поведение личинки, и последовательно и закономерно реорганизуются при переходе к имаго. Одни и те же, образованные в процессе эмбриогенеза нейроны могут участвовать как в личиночных, так и во взрослых нейронных цепях (на примере грибовидного тела преимущественно ольфакторных), формирование которых происходит в результате запускаемой воздействием экдизона жестко заданной генетически контролируемой программы перестройки связей, определяющих поведение и процессы, происходящие в организме личинки и, впоследствии, имаго. [Marin и др., 2005].

Прошедшие через период покоя нейробласты, заложенные еще в процессе развития эмбрионального мозга и теперь называемые постэмбриональными, продолжают последовательно реактивироваться в определенные моменты развития НС личинки и, после метаморфоза, в постмитотическом организме имаго в гораздо меньшей степени, только в грибовидных телах и оптических долях мозга, создавая большое количество производных от них новых, вторичных нейрональных клеточных линий, характерных для взрослого организма [Ito, Hotta, 1992; Pereanu, Hartenstein, 2006]. В процессе метаморфоза взрослая НС значительно увеличивается количественно, благодаря этим новым поколениям вторичных нервных клеток, присоединяющихся, тем не менее, к ранее существовавшим (и также задающим итоговую организацию структур НС личинки и имаго) первичным нервным клеткам [Truman, 1990; Truman, 1996].

Показано, что у дрозофилы структура волокон клеток Кеньона, благодаря таким, сохранившимся от эмбриогенеза, нейробластам продолжает усложняться на протяжении всей жизни имаго, в зависимости от пола (у самок волокон Кеньона больше, чем у самцов), возраста (как правило, она резко, в первую неделю жизни имаго, возрастает на 15%, с тенденцией к снижению после 3-4 недель жизни имаго) и социальных взаимодействий (социальная и сенсорная ольфакторная, но не

визуальная, депривация сильно снижает количество волокон клеток Кеньона, и наоборот, обогащенная стимулами и социальными взаимодействиями среда способствует сохранению их числа без уменьшения даже в позднем возрасте имаго) организма. [Technau, 1984; Balling, Technau, Heisenberg, 2007]. У имаго сверчков в грибовидных телах также показано развитие функционирующих интернейронов из ранее остановившихся в развитии нейробластов, активирующихся в том числе под воздействием ювенильного гормона, в процессе откладывания яиц или при искусственном его введении, что является необходимым ключевым фактором адаптации к изменениям физиологии и программ поведения взрослых особей [Cayre, Strambi, Strambi, 1994].

Очевидно, эта сохраняющаяся пластичность взрослой ЦНС коррелирует с приобретаемым опытом и изменением поведения особей в течение жизни, таким образом опосредуя необходимое адаптивное изменение их поведения. При этом, самое большое увеличение волокон клеток Кеньона, с примерно 300 у только что вылупившейся после эмбриогенеза личинки, до 2100, происходит в процессе онтогенеза личинок. В процессе развития куколки многие из этих волокон разрушаются и нарастают снова, на месте существовавших ранее. Дальнейшее, зависящее от опыта, нарастание их количества у имаго ограничивается интервалом от 200 до 400 возникающих новых волокон [Technau, Heisenberg, 1982]. Это показывает, что несмотря на важность для развития НС опыта, тем не менее, даже структуры грибовидных тел, общепризнанно с ним коррелирующие, в значительной и, вероятно, определяющей степени зависят от процессов эмбриогенеза и продолжающегося постэмбрионального личиночного развития НС. Эти, не изученные до конца факторы раннего развития, определяют то, что в популяциях дрозофил дикого типа взрослые особи одних линий в разные годы могут отличаться в 1,5 раза по базовому, заложенному в процессе предшествующего вылуплению развитию, количеству волокон клеток Кеньона в

грибовидных телах, хотя при дальнейшем их существовании в одинаковых условиях среды это отличие в количестве волокон, по-видимому, несколько компенсируется и становится менее выраженным [Balling, Technau, Heisenberg, 2007].

Показано, что процессы развития грибовидных тел дрозофилы контролируются генетически. В частности, важную роль в раннем развитии всех типов нейронов грибовидных тел и наведении их аксонов играет ядерный гормональный рецептор Hr51, соответствующий ему ген также известен как *unfulfilled (unf)*. Несмотря на то, что точное направление образующихся в раннем развитии аксонов этих нейронов, по-видимому, не контролируется генетически, поскольку у генетически одинаковых особей оно может отличаться, сама экспрессия этого гена необходима. Более того, эти аксоны самых первых образующихся в грибовидном теле нейронов, являются пионерными. От них зависит принципиальная возможность и направление наведения аксонов в развивающихся в грибовидном теле на более поздних этапах онтогенеза нейронов [Bates, Sung, Robinow, 2010]. Существуют также данные, что экспрессия Hr51 может определять спецификацию нейронов грибовидных тел [Lin, Huang, Lee, 2009]. Показано, что ген Hr51 контролирует спонтанную локомоцию у имаго дрозофилы [Beuchle, Jaumouille, Nagoshi, 2012], и также является ключевым звеном генетической сети регуляции циркадных ритмов [Kozlov и др., 2017]. Ген *Hr51* дрозофилы высококонсервативен, его гомологи существуют у позвоночных, включая мышей, обезьян и человека. Изучение генных сетей гена *Hr51* привело к открытию множества его мишеней, определяющих развитие организма. Дальнейшее изучение регуляторных генных сетей *Hr51*, вероятно, может позволить расширить наше понимание основ генетической регуляции развития НС и сложных аспектов функционирования и поведения животных [Bates, Molnar, Robinow, 2015].

Ген *eyeless* (*ey*) дрозофилы относится к еще одному высококонсервативному семейству транскрипционных регуляторов Рах-6, являющихся мастер-контролерами развития глаз и необходимыми регуляторами процесса нейрогенеза в целом. При эктопической экспрессии *ey* у дрозофилы запускается каскад более 2000 генов, обеспечивающий формирование составного глаза *de novo* в других частях организма [Halder, Callaerts, Gehring, 1995; Callaerts, Halder, Gehring, 1997, Gehring, Ikeo, 1999].

Вторым таким мастер-контролером развития глаза оказался открытый чуть позже *twin of eyeless* (*toy*), другой ген дрозофилы из семейства Рах-6, очевидно, оба гена образовались эволюционно в результате дупликации в линии насекомых. Однако *toy* действует выше в запускаемом генном каскаде, прямо регулируя энхансер, находящийся во втором интроне гена *ey* *D.m.*, и он оказался даже более близок структурно к гомологичному семейству Рах-6 высших позвоночных, в частности, мыши [Czerny и др., 1999]. Анализ данных Flybase демонстрирует контакты белка *Toy* с сетями транскрипционных факторов *Dpp*, *Hr51* и *Stc* (рис.1).

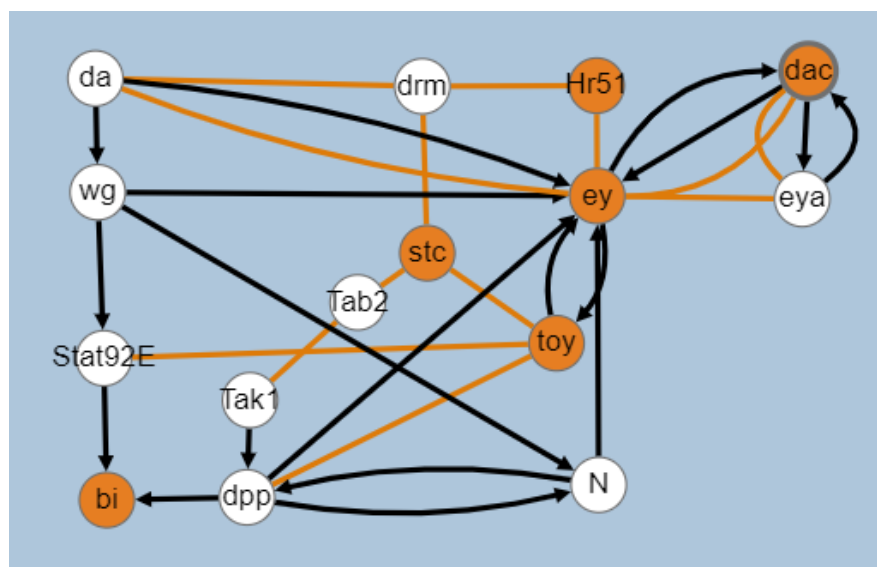


Рисунок 1 — Возможные связи с *stc* консервативных сетей генов *ey*, *toy* и *dac*. Построен на основе данных Flybase и BioGRID. Черными стрелками обозначены известные генетические воздействия, оранжевые линии – взаимодействие белков.

Оба гена обладают схожим паттерном эмбриональной экспрессии в нейроэктодерме, и эмбриональная оверэкспрессия *toy* может до определенной степени компенсировать нуль-мутацию *ey* [Jacobsson и др., 2009]. Однако они отличаются локализацией экспрессии в личиночной ЦНС, очевидно, выполняя несколько отличные функции в процессе развития мозга. В частности, показано, что нарушения экспрессии *ey* характеризуются значительными нарушениями развития аксонов в эмбриональном мозге и брюшной нервной цепочке [Kammermeier и др., 2001]. То, что точная доза и паттерн экспрессии обоих генов дрозофилы имеет важное значение для правильного развития НС, хорошо согласуется с известной высокой дозозависимостью их гомологов *Pax-6* у позвоночных, образующих целый ряд фенотипов, от летальных до жизнеспособных с различными нарушениями развития структур головы и глаз, в частности, у мышей (фенотип *Small eye, Sey*) [Hill и др., 1991; Glaser и др., 1994] и человека (фенотип *Aniridia* с отсутствием радужной оболочки глаза [Топ и др., 1991]). Известные данные о консервативности и функциях этих генов в нейрогенезе дрозофилы позволяют также предположить, что оба гена, *toy* и *ey*, в процессе эволюции не только дублировали, но в некоторой степени разделили между собой функции этого высоко консервативного гена нейрогенеза [Jacobsson и др., 2009]. Такое дублирование и высоко консервативное сохранение схожего функционала разных генов в процессе эволюции известно только для наиболее важных генов. Поскольку из-за сложности структуры и регуляции, общее понимание функций генов *Pax-6* у позвоночных до сих пор не сформировано [Noveen, Daniel, Hartenstein, 2000], дальнейшее изучение специфических генетических механизмов действия *toy* и *ey* дрозофилы будет иметь большое значение для общего понимания значения этого высококонсервативного семейства транскрипционных регуляторов в контроле ключевых этапов развития НС [Friedrich, 2017]. Интересными примерами такой консервативности является то, что трансгенная экспрессия конструкций на основе мышинового *Pax-6* гена *Sey*

вызывает образование эктопического глаза у дрозофилы (состоящего при этом из специфических омматидиев дрозофилы [Halder, Callaerts, Gehring, 1995]), а энхансер гена *ey D.m.* активирует экспрессию *Pax-6* у мыши [Xu и др., 1999]. Аналогичные эксперименты по запуску эктопической экспрессии *Pax-6* у лягушки *Xenopus laevis*, создающие полноценные структуры глаз [Altmann и др., 1997; Chow и др., 1999], показывают, что речь идет не просто о консервативности отдельных генов или механизмов нейрогенеза, а о сохранении от простых беспозвоночных до высших млекопитающих полноценной программы развития сложных структур НС, запускаемой генами высококонсервативного семейства *Pax-6* [Baker и др., 2018]. Эта программа, среди прочего, включает в себя миграцию предшественников нейронов [Engelkamp и др., 1999], наведение прорастающих аксонов [Engelkamp и др., 1999; Kawano и др., 1999], а также дифференцировку и пролиферацию нейронов и глиальных клеток [Gotz, Stoykova, Gruss, 1998; Warren и др., 1999] и образование границ между образующимися из разных типов клеток структурами НС [Charouton, Gartner, Gotz, 1999; Kioussi и др., 1999].

Для этой высоко консервативной генной сети у дрозофилы также показано участие гена *eyes absent (eya)*, осуществляющего взаимодействие с другими консервативными сетями, участвующими в развитии НС, *decapentaplegic (dpp)* и *wingless (wg)*. [Hazelett и др., 1998]. В целом вся высоко консервативная для всех животных система регуляции развития зрительных структур НС, связанных с транскрипционными регуляторами класса *Pax-6*, является важным доказательством их монофилетического происхождения в процессе общего эволюционного филогенеза НС, вопреки более ранним общим теориям, которые из условной систематизации структурных групп предполагали, что такой сложный орган НС, как глаз, мог возникать независимо не менее 40 раз [Gehring, 2001].

У дрозофилы показано, что гены этого пути *ey* и *dachshund (dac)* могут иметь более четкую, чем у позвоночных, пространственно локализованную экспрессию в

отдельных группах клеток ЦНС [Mardon, Solomon, Rubin, 1994; Quiring и др., 1994]. Позднее было показано, что экспрессия этих генов в более значительной степени, чем при образовании глаз, также происходит в клетках-предшественниках и нейронах грибовидного тела эмбрионов и личинок *D.m.*, причем экспрессия *eu*, и *dac* начинается в соответствующем кластере пронеурональных клеток, начиная с самых ранних этапов, прямо предшествующих образованию нейробластов грибовидного тела и выделению их из нейроэктодермы, и при их специфическом раннем нокдауне образуется гораздо меньше нейробластов и производных от них клеток грибовидных тел. Второе поколение нейронов грибовидных тел образуется в позднем эмбриогенезе с продолжением в личиночном развитии, представляя собой классические клетки Кеньона. Эти клетки экспрессируют *Fas2*, на уровень которого также оказывают влияние мутации *eu* [Kurusu и др., 2000], так же как экспрессию гомологичных ему адгезивных белков аксонов N-CAM и L1 в НС позвоночных контролирует *Pax-6* [Holst и др., 1997; Meech и др., 1999]. А при специфическом для них нокдауне или оверэкспрессии *eu* и *dac* возникают разнообразные нарушения развития грибовидных тел со значительным снижением количества клеток Кеньона и образуемых ими аксонов. Нарушение паттернов образующихся при этом аксонов позволяет предположить, что и *eu*, и *dac* необходимы для выбора пути и структуры образующихся аксонов клеток Кеньона [Noveen, Daniel, Hartenstein, 2000], аналогично одной из функций *Pax-6* позвоночных [Mastick и др., 1997; Engelkamp и др., 1999]. При том, что *eu* и *dac* действуют синергично в нейрогенезе [Holst и др., 1997], *dac* действует ниже в том же генетическом пути, что и *eu*. Нуль-мутации *dac* не летальны, в отличие от *eu*, что объясняется тем, что *eu* имеет и другие функции, в частности, необходим для пролиферации нейробластов грибовидных тел [Noveen, Daniel, Hartenstein, 2000], также аналогично функциям *Pax-6* позвоночных [Warren и др., 1999]. В целом, генетическая сеть регуляции развития клеток грибовидных тел отличается

детальными взаимодействиями с другими генами от генной сети, контролирующей развитие глаз, возможно, менее консервативна и не включает, в отличие от нее, участие гена *eyes absent (eya)*, осуществляющего взаимодействие с другими консервативными сетями *dpp* и *wg* [Hazelett и др., 1998; Noveen, Daniel, Hartenstein, 2000].

2.1.2.6. Развитие новых структур НС у взрослых особей. Зрительные доли

При общей высокой сложности изучения устройства зрительной системы у млекопитающих [Kandel и др., 2000], дрозофила также представляется удачным объектом ее изучения, несмотря на то, что, по-видимому, ольфакторные стимулы играют более важную роль в ее обучении [Busto, Cervantes-Sandoval, Davis, 2010]. Самые крупные нервы мозга имаго насекомых – ольфакторные, но на втором месте – передающие зрительную информацию [Ito и др., 2014; Strausfeld, 1976]. Грибовидные тела, возможно, обеспечивают более сложные формы поведения и обучения (например, обучение, обеспечивающее предсказывающие реакции на обонятельные стимулы, вероятно, обеспечивается пластичностью синапсов нейронов грибовидного тела [Zhao и др., 2021]). При этом визуальное восприятие, реакции на него и основанное на них обучение у насекомых все равно остаются основой достаточно сложных в сравнении с позвоночными, и приобретенных в течение жизни реакций. Например, пчелы могут обучаться навигации по картине звездного неба и положению солнца в течение дня [Collett, 2008]. Консервативность базовых управляющих структуры НС и сложность поведения насекомых, аналогичная сложности поведения млекопитающих, позволяют рассматривать зрительные доли НС насекомых как лучшую модель для изучения молекулярных и клеточных основ такого сложного поведения [Neriec, Desplan, 2016]. Интересно, что грибовидные тела, несмотря на предполагаемую относительную специализацию,

по-видимому, берут на себя часть более сложных функций по пространственному обучению и реакциям на ольфакторные факторы, необходимым для пространственной ориентации насекомых и возникающим в течение жизни имаго, функционально взаимодействуя со зрительными долями насекомых [Buehlmann и др., 2010]. Зрительные доли дрозофилы так же образуются в ходе четырех делений нейробластов под контролем *Notch* от задней части эмбрионального мозга, теряющей связь с поверхностью и образующей везикулу, от которой впоследствии отделяются и 12 фоторецепторных клеток, по происхождению и структуре аналогичных реснитчатым и образующих рудиментарный орган Больвига, становящийся основным источником визуальных стимулов личинки. У нуль-мутантов *Notch* в процессе развития клетки оптической доли не дифференцируют, не мигрируют и остаются не отличимы от окружающих производных от нейроэпителия нейронов ЦНС. Нокдаун *Notch* в разное время в период 6-10 часов эмбрионального развития вызывает серьезные нарушения развития оптической системы дрозофилы, показывающие, что высокий уровень *Notch* необходим для определения судьбы клеток зрительной системы. И хотя будущие омматидии глаз имаго начинают отличаться от клеток органа Больвига в позднем личиночном возрасте, а личиночные светочувствительные органы позднее деградируют, зрительные доли мозга, заложенные в эмбриональном развитии, остаются основой этих структур мозга насекомого на протяжении всего онтогенеза [Green, Hartenstein, Hartenstein, 1993]. Более того, в мозге имаго зрительные доли являются самой заметной частью протоцеребрума, крупнейшего отдела мозга [Strausfeld, 1976].

Важным маркером для изучения онтогенеза структур мозга насекомых и, в частности, дрозофилы является белок фасцилин 2 (*Fas2*), гомолог нейронального белка адгезии у позвоночных N-CAM, необходимый для опознания эмбриональными конусами роста аксонов друг друга и правильного объединения

их в аксональные тракты. [Crews, 2001; Grenningloh, Rehm, Goodman, 1991]. Сначала он экспрессируется в телах делящихся эмбриональных нейронов, потом основное количество его молекул мигрирует на прорастающие аксоны соответствующих нейронов, позволяя точно идентифицировать и картировать важнейшие образующиеся в процессе эмбрионального развития центральных отделов НС структуры, характеризующиеся активной экспрессией *Fas2* и отследить их дальнейшее развитие в образовании структур НС личинки и имаго, в которых он также сохраняется. Из аналогичных белков *Fas3* имеет более специфический паттерн и экспрессируется в отдельных нейронах, а *Fas1*, наоборот, экспрессируется более широко в разных типах нейронов, но в меньших количествах [Nassif, Noveen, Hartenstein, 1998]. Важнейшими структурами, в которых необходима активная экспрессия *Fas2*, являются грибовидные тела и зрительные доли, в аксональных трактах которых он сохраняется, несмотря на активные перестройки в процессах метаморфоза структур протоцеребрума, на всех стадиях личиночного и имагинального развития НС [Nassif, Noveen, Hartenstein, 1998; Nassif, Noveen, Hartenstein, 2003]. Анализ данных Flybase о генетических и физических связях транскрипционных регуляторов, контролирующих развитие грибовидных тел и оптических долей мозга дрозофилы демонстрирует сложные сети взаимодействий, включающие среди прочих также *Hr51*, *N*, *Dpp*, *Stc* и *Esg* (рис.2).

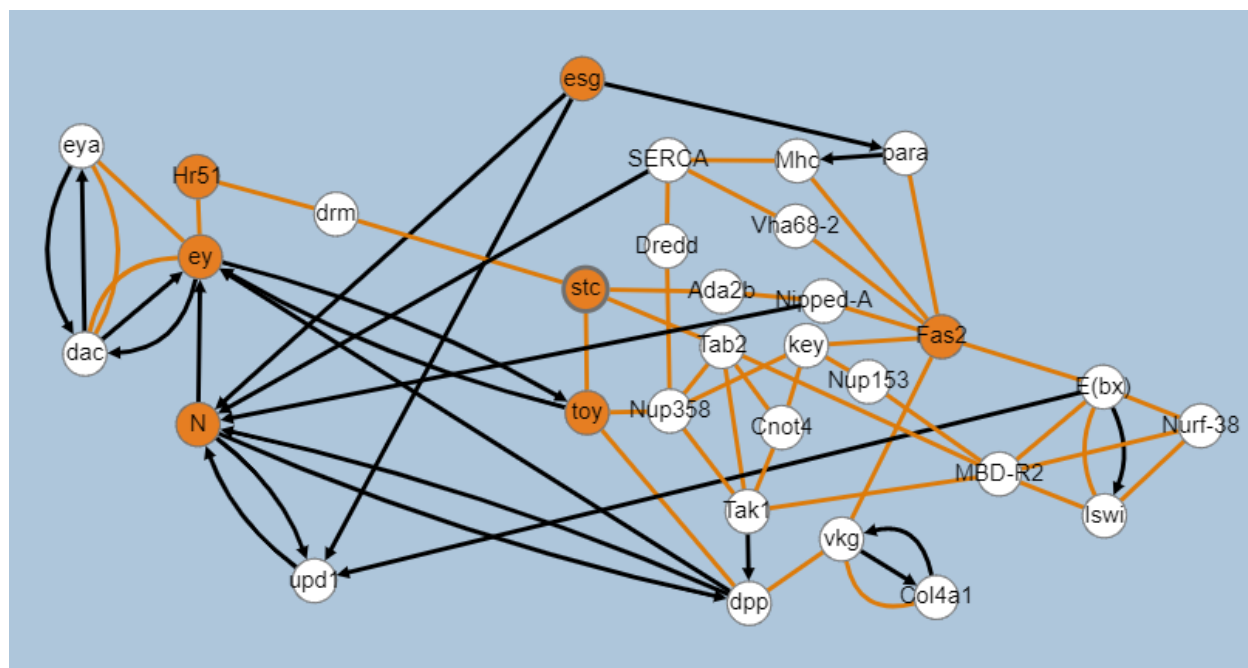


Рисунок 2 — Возможное участие *stc* и *esg* в генетических путях контроля развития оптических долей и грибовидного тела *D.m.* Построен на основе данных Flybase и BioGRID. Черными стрелками обозначены известные генетические воздействия, оранжевые линии – взаимодействие белков.

Аналогично ольфакторным стимулам для грибовидных тел, визуальные стимулы вызывают аналогичное усложнение структуры зрительных долей у дрозофилы [Kikuchi и др., 2012].

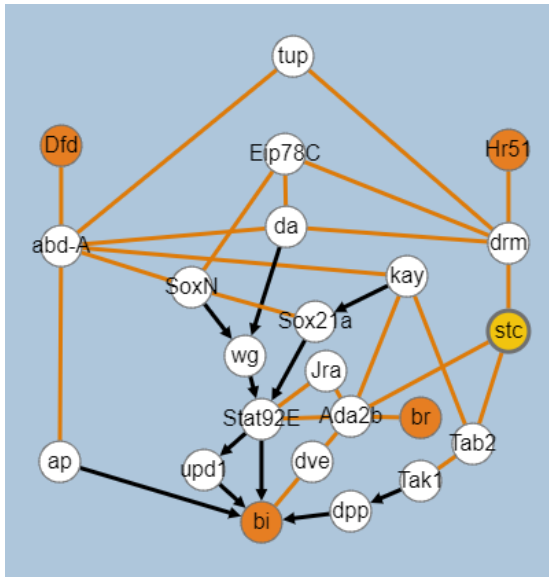
Показано, что этот процесс также находится под генетическим контролем, и для него необходимо участие транскрипционного фактора *bi* (*bifid*, синоним *optomotor blind, omb*) [Pflugfelder, Heisenberg, 1995]. Транскрипционный фактор *bi* у дрозофилы участвует во многих процессах развития, включая путь генетической регуляции *wingless (wg)* и относится к эволюционно высококонсервативному семейству T-box транскрипционных регуляторов. Наиболее вероятным ортологом его у человека, содержащим общий консервативный мотив является TBX2 [Campbell и др., 1995], мутации которого со снижением экспрессии вызывают

мультисистемные нарушения развития, влияющие на сердечно-сосудистую, эндокринную системы и обуславливают иммунодефицит [Liu и др., 2018].

Для правильного наведения аксонов во внутренней оптической доле необходима также правильная экспрессия в процессе развития куколки транскрипционного фактора *bi* и в окружающих глиальных клетках, причем нарушения границ компартментов взрослых оптических долей также может быть вызвано нарушениями при перестройке заложенных ранее структурных единиц внутренней оптической системы у личинок [Hofmeyer, Kretzschmar, Pflugfelder, 2008]. Этот экспериментальный факт иллюстрирует важный принцип: структурные компартменты взрослого мозга имаго присутствуют в виде небольших структур, заложенных уже в постэмбриональной НС у ранних личинок первого возраста, разделенных листками глиальной септы. И именно они позднее превращаются в полноценные структуры НС у имаго, определяющие положение нейронов и проекции аксонов [Younossi-Hartenstein, Salvaterra, Hartenstein, 2003]. Схожие структурные компартменты и принципы их развития наблюдают и в центральной НС (ЦНС) позвоночных и млекопитающих [Mori, Nagao, Yoshihara, 1999; Mombaerts, 2001].

Анализ сетей взаимодействия нейрональных генов, вовлеченных в контроль аксоно- и нейрогенеза показывает сети сложных взаимодействий транскрипционных факторов, включающих, среди прочих, *Dfd*, *Dpp*, *Br*, *Hr51*, *Stc*, *Esg* и другие известные гены нейрогенеза (рис.3 А, Б).

(A)



(B)

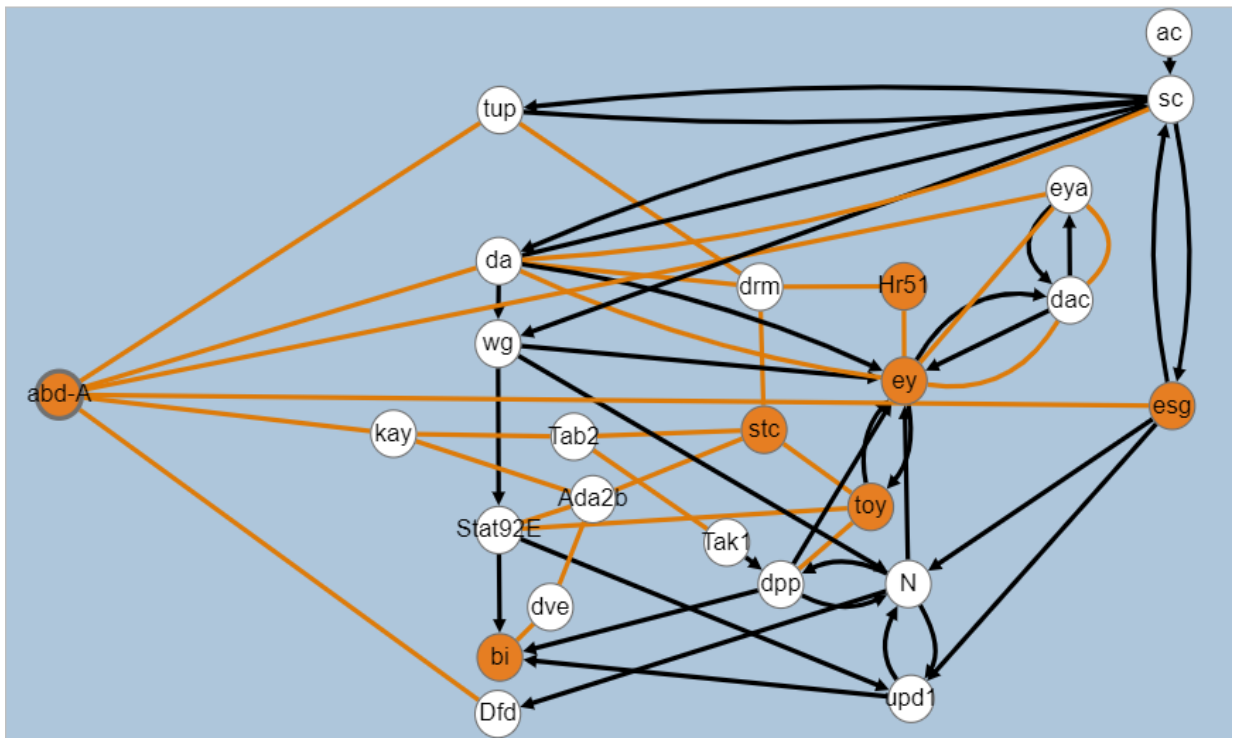


Рисунок 3 (А, Б) — Возможные схемы взаимодействий *stc* и *esg* с консервативными транскрипционными факторами, влияющими на развитие НС. Построен на основе данных Flybase и BioGRID. Черными стрелками обозначены известные генетические воздействия, оранжевые линии – взаимодействие белков.

2.2. Нервная система как ключевая ткань в контроле продолжительности жизни

Роль НС в контроле продолжительности жизни многообразна и объединяет как интеграцию сенсорных сигналов из окружающей организм среды, так и ответ на эти сигналы, требующий общего контроля всех основных функций метаболизма и гомеостаза организма. Также важным звеном оказывается сохранение сложного и меняющегося баланса экспрессии нейрональных генов, необходимого как для постоянного ответа на меняющиеся сигналы внешней среды, так и для сохранения собственного гомеостаза клеток НС [Alcedo, Flatt, Pasyukova, 2013; Lin и др., 2017; Wolkow, 2002]. Открытия последних лет только демонстрируют новые механизмы, в соответствии с которыми сохранение баланса экспрессии нейрональных генов и метаболизма нейронов может позволить продлить жизнь модельных организмов и человека [Lin и др., 2017; Nassar и др., 2023; Tavernarakis, 2019].

2.2.1. Ключевая роль метаболизма и срока жизни клеток НС в определении ПЖ организма

2.2.1.1. Определяющее влияние срока жизни нейронов для ПЖ организма

В процессе онтогенеза многоклеточного организма, преимущественно в ходе его раннего развития, клетки нервной системы дифференцируются из предшественников в нейроны и глиальные клетки. Эти высокодифференцированные клетки больше не делятся и в общем случае имеют срок жизни, сравнимый со сроком жизни организма [Kandel и др., 2020]. Существуют механизмы и преждевременной запрограммированной гибели

нейронов, часто играющих положительную роль с целью исключения неправильно образовавшихся аксональных связей, избыточных или ошибочных сигнальных цепей [Carlson, 2014]. Образующиеся на ранних этапах развития НС нейроны и связи избыточны, и на определенных этапах образования синаптических связей в НС наблюдаются даже «волны» массовой гибели нейронов. Такая массовая гибель нейронов в процессе нормального развития наблюдается как в периферической, так и в центральной НС разных видов, вплоть до высших позвоночных. Уже несколько десятилетий как было установлено, что каждая индивидуальная клетка имеет свою эндогенную программу, но также определение групп гибнущих нейронов контролируется распределением экзогенных трофических факторов и факторов роста нервов, хотя изучение точных механизмов действия этих факторов продолжается в деталях до сих пор [Varon, Adler, 1980].

Известные механизмы запрограммированной гибели нейронов относятся к макроаутофагии – процессу разрушения больших агрегатов, органелл и целых клеток через образование аутофагосом. Нормальная макроаутофагия, тем не менее, может быть усилена стрессовыми сигналами. В целом это нормальный физиологический процесс, обеспечивающий поддержание в течение жизни функционального состояния организма и тканей, в условиях ограниченных ресурсов или возникающих оксидативных повреждений отдельных молекул и клеток [Clarke, 2009]. Поскольку срок существования нейронов – долгоживущих постмитотических клеток - должен совпадать со временем функционирования организма, триггеры аутофагии, работающие в клетках НС особенно важны и механизмы ее подразделяются на конститутивные и вызванные стрессом [Stavoe, Holzbaaur, 2019]. Основные гены, участвующие в процессе аутофагии, в настоящее время объединяют в семейство *atg*, и влияние на их экспрессию может модулировать и предотвращать эти процессы [Clarke, 2009]. Основные регуляторы

процесса аутофагии хорошо изучены на дрожжах, и показано, что в основных чертах они остаются консервативными у эукариот, вплоть до высших млекопитающих [Ohsumi, 2014].

Помимо этого, собственно необходимая для функционирования НС активность нейронов, сопряженная с повышенным метаболизмом, повышает уровень окислительного стресса, разрушающего структурные молекулы и сами нейроны, с прогрессивным накоплением окислительных повреждений в мозге со временем. Одной из основных мишеней таких повреждений является собственно митохондриальная ДНК, что может дополнительно увеличивать уровень окислительного стресса [Mecocci и др., 1993]. Окислительные повреждения ДНК нейронов в первую очередь поражают промоторы активных генов, в том числе отвечающих за синаптическую пластичность и защиту от окислительного стресса. В свою очередь, это снижает экспрессию этих генов, ухудшая такие показатели как синаптическая пластичность нейронов и, собственно, защита нервных клеток от окислительного стресса. Также снижается активность групп генов, необходимых для аксонального транспорта и оборота белков [Lu и др., 2004].

Помимо того, что нейрональная активность стимулирует окислительный стресс, она специфически вызывает генерируемые топоизомеразой II типа в нейронах двухцепочечные разрывы ДНК. Они необходимы и неизбежны, поскольку показано, что двухцепочечные разрывы ДНК – специфический нейрональный механизм, необходимый для быстрого повышения активности многих важных для функционирования НС генов раннего ответа, таких как Fos, Npas4, Egr1 и Nr4a1. Транскрипция этих генов активируется двухцепочечными разрывами в районе промотора очень быстро, в течение минут после стимуляции, и уже эти гены являются преимущественно транскрипционными факторами, активирующими нейрональные гены второй очереди, Bdnf, Homer1, Nrn1 и Rgs2. При этом репарация таких разрывов ингибируется на время активности

работающих генов, однако обычно она все равно происходит в течение последующих двух часов [Madabhushi и др., 2015]. У человека активность примерно 30% генов нейрогенеза является зависимой от топоизомеразы TopIIbeta, что обуславливает важность образования таких разрывов в том числе в процессе позднего нейрогенеза [Lyu и др., 2006]. Таким образом, весь этот механизм необходим для формирования НС и сохранения синаптической пластичности с постоянно формируемым балансом между возбуждением и торможением в мозге в ответ на нейрональные стимулы [West, Greenberg, 2011].

Двухцепочечные разрывы ДНК в нейронах возникают в процессе физиологически нормальной деятельности мозга, однако они же ускоряют потенциальные нейродегенеративные процессы и накопление амилоидных белков в НС. Так, даже у молодых животных двухцепочечные разрывы образуются в процессе нормальной когнитивной деятельности и изучения нового окружения, а репарация таких разрывов в результате замедляется на срок до 24 часов [Madabhushi и др., 2015; Suberbielle и др., 2013]. В процессе физиологического старения мозга происходит неизбежное накопление двухцепочечных разрывов ДНК [Lu и др., 2004]. Показано, что такие разрывы совпадают с местами обогащения генома фосфорилированной формой гистона H2AX (γ H2AX), которая, с одной стороны, характерна для активных генов быстрого ответа на нейрональный стимул, с другой стороны, это маркер, обеспечивающий перестройку хроматина с образованием стабилизирующих его структур, необходимых для последующей репарации двухцепочечных разрывов. Такой же механизм работает, по многим свидетельствам, с гомологичными белками в клетках не только млекопитающих, но и других позвоночных и насекомых, представляя консервативные процессы, вероятно, общие для всех эукариот [Baldi, Becker, 2013; Fernandez-Capetillo и др., 2004; Rogakou и др., 1999].

Хотя эти процессы репарационные, их активацию часто ассоциируют со стрессовыми процессами окислительной природы или глутаматной эксайтотоксичностью, в конечном итоге приводящими к нейродегенерации, если ресурса репарации организма недостаточно [Crowe и др., 2006]. Глутаматная эксайтотоксичность это один из самых известных механизмов гибели нейронов в результате старения, ишемии или травмы. В процессе ее избыточная активация глутаматных рецепторов может активировать серьезную потерю нейронов в мозге, опосредуя нейродегенерацию вследствие заболеваний или старения [Nicotera, Leist, Manzo, 1999]. Парадоксально, в процессе старения одним из известных признаков снижения эффективности репарации и накопления недоступных репарации двухцепочечных разрывов является обогащение ДНК нейронов маркером репарации γ H2AX, который в молодых нейронах практически не регистрируется. При этом могут полностью отсутствовать признаки реальной репарации повреждений, что может являться одним из индикаторов старения НС и предвестников нейродегенерации [Ren, Pena de Ortiz, 2002; Sedelnikova и др., 2004; Sedelnikova и др., 2008]. Это может являться специфическим для НС вариантом связанного со старением фенотипа, связанного с накоплением воспаления и нерепарируемых клеточных повреждений и быть самостоятельным индикатором старения [Rodier и др, 2011; Slawinska, Krupa, 2021]. Единственным альтернативным вариантом для таких накопивших повреждения ДНК и обогащенных γ H2AX стареющих клеток считается апоптоз [Polo, Jackson, 2011; White и др., 2015].

Возрастные изменения экспрессии генов не ограничиваются только изменением уровней экспрессии мРНК. Показано, что, вследствие изменений экспрессии факторов сплайсинга с возрастом в мозге изменяется даже паттерн сплайсирования мРНК многих белков, связанных преимущественно со структурой и функционированием синапсов и НС в целом [Liu и др., 2012]. Изменения

сплайсирования в НС в 30% показанных случаев затрагивают белок-кодирующую область нейрональных генов и в значительной степени могут также быть связаны с возрастными нейродегенеративными процессами, включая, в частности, болезнь Альцгеймера [Mazin и др., 2013; Stegeman, Weake, 2017].

Таким образом, с возрастом действуют петли обратной связи, усиливающие процессы деградации в нейронах. Эти процессы в человеческом мозге очевидно изменяют паттерны экспрессии генов уже с 40 лет и, собственно, запускают или усиливают основные процессы старения НС, хотя скорость этих процессов в возрасте от 40 до 70 лет в человеческой популяции очень значительно отличается и является, очевидно, важным индивидуальным фактором, определяющим состояние организма [Lu и др., 2004]. Несмотря на это, нужно заметить, что специфическая локализованная потеря нейронов с возрастом является серьезным фактором не во всех отделах мозга, и в общем во всей НС часто при нормальном старении не наблюдается [Bishop, Lu, Yankner, 2010]. Однако общим фактором является потеря баланса и координации между различными структурами мозга, что однозначно выражается как в истощении синатической сети, так и в специфической потере нейронов, осуществляющих координационные функции. Так, в мозге млекопитающих наиболее серьезные потери, по-видимому, относятся к клеткам Пуркинье, осуществляющим связь между слоями мозжечка. Их потеря происходит сравнительно быстрее, чем у остальных нейронов, и снижение количества может достигать 40% в течение жизни мышей, сопровождаясь значительным снижением координации отделов мозга, и как следствие, когнитивных способностей модельных объектов [Andersen, Gundersen, Pakkenberg, 2003; Woodruff-Pak, 2006]. Возможным компенсаторным механизмом в позднем возрасте может быть перераспределение и делокализация активности в отделах мозга, что позволяет сохранить когнитивные способности, но требует,

одновременно, сохранения высокого уровня синаптической пластичности [Cabeza и др., 2002].

2.2.1.2. Способы повлиять на популяцию нейронов организма.

Существуют способы предотвратить или уменьшить гибель клеток (в том числе нейронов в течение онтогенеза) путем прямого воздействия на механизмы апоптоза посредством как фармакологических [Varon, Adler, 1980], так и генетических [Shimizu и др., 2004; Yu и др., 2004] интервенций.

Возможны также и альтернативные подходы к увеличению активно функционирующей популяции нейронов. В частности, активно изучаются способы активизировать рост нейритов у существующих нейронов фармакологическим воздействием на пан-нейротрофические сигнальные пути, в результате чего когнитивные способности в текущем возрасте и состоянии увеличиваются, без изменения числа нейронов [Martinez-Marmol и др., 2023].

Как было описано выше, физиологическое функционирование нейронов сопровождается необходимыми двухцепочечными разрывами ДНК в районе промоторов активных нейрональных генов быстрого ответа на нервные стимулы, функционирование которых необходимо и в процессе позднего нейрогенеза, и в процессах развития синаптических сетей в течение жизни. [Madabhushi и др., 2015; Suberbielle и др., 2013]. Как следствие, накопление unrepaired двухцепочечных повреждений ДНК является причиной старения нейронов, делающим неизбежным их апоптоз для сохранения функциональности организма и предотвращения рака [Polo, Jackson, 2011; White и др., 2015]. Тем не менее, сравнительно недавно было показано, что нейроны обладают достаточно эффективным механизмом репарации повреждений ДНК, связанных с их активностью. Ацетилтрансферазный комплекс NPAS4–NuA4, высоко специфически

действующий в нейронах, связывает двухцепочечные повреждения ДНК, связанные с активностью генов раннего ответа в нейронах и специфически привлекает к этому месту белки аппарата репарации. Эта функция NPAS4–NuA4 частично снижает эффекты старения нейронов, также снижая в них возраст-зависимое накопление соматических мутаций. Важной особенностью этого механизма репарации ДНК является не только то, что он специфичен для НС, но и то, что, как и специфические двухцепочечные повреждения ДНК, он также связан с синаптической активностью нейронов и активируется пропорционально ей. Показано, что нуль-мутации по нейрональным факторам, входящим в этот комплекс, наоборот, снижает продолжительность жизни независимо от пола [Pollina и др., 2023]. Интересные предположения о роли этого механизма следуют еще из того, что мутации многих компонентов этого комплекса (*Erp400*, *Trrap*, *Actl6b* и *Tip60*) связывают с аутизмом. Соответственно, очевидно, что данный механизм репарации в нейронах важен не только для предотвращения развивающихся с возрастом нейродегенеративных заболеваний, но и возникающих в процессе активного пренатального нейрогенеза синдромов аутизма [Chahrouh и др., 2012; Pollina и др., 2023].

Несмотря на однозначную важность процессов стресса и репарации, происходящих в самих нейронах, для срока их существования, окружающая среда, внешняя и внутренняя для целого организма, представляется, возможно, даже более важным фактором. Так, показано, что при ксенотрансплантации мышинных нейронов в эмбрион крысы, живущей в два раза дольше, эти нейроны полностью принимают на себя функции более долгоживущих крысиных нейронов и существуют в течение всей жизни крысы. Хотя при этом структурные и функциональные показатели трансплантированных нейронов с возрастом падают быстрее, чем у нативных нейронов крысы, но срок существования таких нейронов под воздействием внешних для них факторов и сигналов внутренней среды

организма более долгоживущего вида продляется практически в два раза [Magrassi, Leto, Rossi, 2013].

2.2.1.3. Определяющее влияние глиальных клеток НС для ПЖ организма

Современные исследования показывают, что именно глия определяет функциональное состояние, иммунный ответ и энергетический метаболизм нервной ткани и его изменения с возрастом, таким образом опосредованно через обеспечение ключевых функций НС определяя ПЖ организмов [Frakes и др., 2020; Kounatidis, Chtarbanova, 2018]. Полногеномные скрининги часто определяют ассоциацию с возрастными нейродегенеративными заболеваниями генов, контролирующими структурные и метаболические особенности глиии [Hollingworth и др., 2011; Lambert и др., 2009; Majounie и др., 2012; Naj и др., 2011].

Из-за большого структурного и функционального разнообразия глиальной ткани задача однозначного определения значения глиальных клеток представляется достаточно сложной, однако современные исследования позволяют обобщать большой объем материалов о значении различных типов глиальных клеток для функционирования организмов и их ПЖ [Barres, 2008]. Астроциты и шванновские клетки обеспечивают синаптогенез и высокий уровень синаптической активности нейронов, необходимый для сохранения с возрастом функционирование и необходимую пластичность НС. Так, астроциты составляют почти половину всех клеток человеческого мозга и известны как клетки поддержки синаптической активности, однако было показано, что они играют гораздо более активную роль в синаптогенезе и обеспечении сохранения синаптической пластичности НС, потенциально увеличивая количество синапсов, самостоятельно формируемых нейроном, в семь раз [Ullian и др., 2001].

Аналогичную роль для сохранения долговременного функционирования нервно-мышечных соединений играют шванновские клетки глии [Feng, Ko, 2008]. Возрастная дегенерация нервно-мышечных соединений является одним из самых заметных факторов быстрого падения общего состояния организма и способностей к адаптации. В результате этих возрастных изменений кардинально увеличивается вероятность инвалидности и смерти, что по сути является одним из главных проявлений старения в человеческой популяции, при этом становясь одним из самых доступных для борьбы со старением ключевых звеньев [Janssen и др., 2004].

На многочисленных животных моделях и у человека описаны возрастные изменения, происходящие в нервно-мышечных соединениях. Претерминальная часть аксонов истончается, иногда аксоны редуцируются вовсе, постсинаптические пластинки уменьшаются в размерах, количестве и плотности расположения — даже при условии сохранения числа нейронов обуславливая функциональную денервацию и последующую деградацию соответствующих мышц [Fujisawa, 1976; Zelena, Vyskocil, Jirmanova, 1976]. Однако эти возрастные изменения могут варьировать в случае конкретных соединений и сильно зависят от функциональной активности и энергетического статуса конкретных нервно-мышечных соединений [Jang, Van Remmen, 2011].

Одним из очевидных процессов, сопутствующих такой возрастной дегенерации двигательной системы является снижение числа шванновских клеток в терминальной части аксонов мотонейронов [Ludatscher, 1985]. Помимо ухудшения энергетического статуса аксональных окончаний такая деградация шванновских клеток увеличивает размер перехватов Ранвье и снижает миелинизацию нервных волокон, ухудшая передачу сигналов по ним [Ceballos и др., 1999]. В результате происходят общие изменения архитектуры НС, создаваемой совместно нейронами и глией, функционально проявляющиеся

снижением скорости нервной передачи, силы мышечных сокращений, нарушение сенсорной дискриминации и питания нервов [Adinolfi и др., 1991; Verdu и др., 2000].

Уменьшение количества трофических факторов, выделяемых шванновскими клетками, также ухудшают регенерацию аксонов и поддержание их работы, необходимое для восстановительных процессов в НС [Verdu и др., 2000]. В демиелинизированных нервных волокнах начинается процесс ремиелинизации, в связи с чем в терминальных областях аксонов увеличивается количество шванновских клеток, и они дедифференцируются [Gregson, Hall, 1973; Zanazzi и др., 2001]. Однако в целом с возрастом возникает декомпенсация, и баланс сдвигается в сторону демиелинизированных нервных волокон, из-за недостаточной активности процессов восстановления, обеспечиваемых шванновскими клетками [Verdu и др., 2000].

Наоборот, сохранение активного аксонального транспорта трофических факторов обеспечивает необходимую для функций периферической НС энергетику и замедляет возрастную нейродегенерацию нервно-мышечных соединений [McMartin, O'Connor, 1979].

2.2.1.4. Способы повлиять на функционирование с возрастом НС и организма в целом посредством глиальных клеток

Показано, что общие механизмы, замедляющие старение, в частности, калорийно ограниченная диета, также замедляет вызванные деградацией клеток глии синдромы возрастной саркопении: денервацию мышц и демиелинизацию НС [Rangaraju и др., 2009]. Однако в настоящее время большое внимание уделяется попыткам более специфическим и целенаправленным образом медикаментозно повлиять на функционирование глии, чтобы предотвратить или отсрочить

симптомы связанных с возрастом нейродегенеративных заболеваний. Для ранних ее форм ранее была показана ассоциация с тремя генами, в том числе, вероятно, отвечающими за образование амилоидных форм белков – *APP* (кодирующий предшественник амилоидного белка), *PSEN1* и *PSEN2* (кодирующие соответствующие пресенелины). Однако, по сравнению с ассоциированными с ранними формами нейродегенерации, с точки зрения значения для старения, наиболее актуальной мишенью представляются гены, ассоциированные с поздней формой болезни Альцгеймера и возрастной дегенерацией. Ранее открытыми таким геном был *APOE2*, вариант $\epsilon 4$ которого связан с высоким генетическим риском как ранних, так и поздних форм болезни Альцгеймера [Goate и др., 1991; Rogaev и др., 1995; Sherrington и др., 1995; Strittmatter и др., 1994], также, как оказалось позднее, и другие гены семейства *APOE* [Majounie и др., 2012]. Популяционные полногеномные скрининги определяют еще ряд геномных локусов, ассоциированных с низким риском поздних форм болезни Альцгеймера [Hollingworth и др., 2011; Lambert и др., 2009; Naj и др., 2011].

Однако более актуальной мишенью для терапии возрастной нейродегенерации в настоящее время представляется широко влияющий на метаболизм нервной ткани рецептор TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), экспрессия редких вариантов которого в человеческих популяциях (в частности, [R47H], которым сравнительно насыщена популяция Исландии) даже в гетерозиготном состоянии ассоциирована с высоким возрастным риском нейродегенерации и поздней формы болезни Альцгеймера [Guerreiro и др., 2013; Jonsson и др., 2013; Neumann, Daly, 2013]. Он находится в одном из известных геномных локусов, ассоциированных с риском болезни Альцгеймера [Butler и др., 2009; Guerreiro и др., 2013], и является одним из немногих генов, специфически экспрессирующихся в мигроглии мозга, он необходим для активации Tor-пути, меняющего метаболизм глюкозы и

энергетический статус этих клеток. Также важным представляется активация им фагоцитоза, необходимого не только в первичном антибактериальном иммунном ответе, но и для удаления остатков дебриса, возникающего при повреждениях НС, функции, определяющей возрастные риски нейродегенерации [Neumann, Daly, 2013]. Предполагают, что фактически именно данный рецептор отвечает за активацию микроглии, способную компенсировать возникающий дефицит ее функций. При этом неправильная активация микроглии дефектными вариантами рецепторов может, наоборот, спровоцировать развитие ассоциированного с нейродегенеративными заболеваниями фенотипа [Ulland, Colonna, 2018; Zhao, Bu, 2023].

Актуальной проблемой является разработка средств целевого воздействия на эти рецепторы, для правильной активации которых разработаны специфические антитела-агонисты TREM2. Также решаемой в данный момент проблемой являются средства доставки их в ткань через гематоэнцефалический барьер, что позволяет улучшить метаболизм микроглии и симптомы болезни Альцгеймера на мышиных моделях [van Lengerich и др., 2023; Zhao, Bu, 2023].

2.2.1.5. Нейродегенеративные заболевания определяют продолжительность жизни

В когортах человеческих долгожителей частота нейродегенеративных заболеваний оказывается связанной с изменением гомеостаза организма и неизбежно хронологически нарастающим риском гибели [Ноу и др., 2019], также как с основными особенностями процесса старения: геномной нестабильностью, эпигенетическими изменениями и укорочением теломер, функциональной дисфункцией элементов метаболизма (нарушение протеостаза, дисфункция митохондрий с усилением оксидативного стресса) и клеточным старением,

включающим нарушение восприятия клетками питательных элементов, истощение стволовых клеток и нарушение межклеточных коммуникаций [Azam и др., 2021]. С возрастом в клетках нервной системы происходят структурные изменения и накопление многочисленных признаков старения, что сильно варьирует между индивидуумами, поэтому их значение для нейродегенеративных заболеваний полностью недоказано, но, вероятно, связано, оказывая отрицательное влияние на все функции НС [Mrak, Griffin, Graham, 1997]. Дискутируемым вопросом является определение нейродегенеративных заболеваний как возможного общего фактора старения, однако многие исследователи утверждают, что базовые признаки нейродегенеративных заболеваний являются неизбежным результатом старения НС [Wyss-Coray, 2016].

Показательной в этом отношении является теория, что большинство продляющих ПЖ фармакологических воздействий (в частности, с использованием метформина, рапамицина, резвератрола, N-ацетилцистеина, куркумина) также оказываются целенаправленно эффективны против основных возрастных нейродегенеративных заболеваний (болезней Хантингтона, Паркинсона, Альцгеймера и амиотрофического бокового склероза) – вероятно, ослабляя эффекты старения в этих клетках, и это оказывается новым перспективным подходом в терапии данной группы заболеваний [Soo и др., 2020].

2.2.2. Консервативная генетическая регуляция сенсорной функции НС в регуляции ПЖ животных

2.2.2.1. Нейроэндокринная регуляция, зависящая от пищевых, зрительных и хемосенсорных сигналов

Неоднократно продемонстрировано на модельных объектах, в частности на *D.melanogaster* и *C.elegans*, и может быть успешно перенесено на высших позвоночных принципиальное влияние, которое на ПЖ оказывают сигналы хемо-, термо- и других сенсорных нейронов [Jeong и др., 2012]. У дрозофилы показано, что вместе с хемосенсорными нейронами важнейшую роль играют многочисленные вкусовые рецепторы, которые позволяют организму реагировать соответствующими изменениями поведения и общего метаболизма на наличие или отсутствие в окружающей среде питательных веществ. Эти сигналы у дрозофилы также являются сигналами, определяющими время и место для реализации программы размножения [Vosshall, Stocker, 2007]. Генетические мутации, изменяющие сенсорные функции НС, регулируют продолжительность жизни модельных объектов [Alcedo, Kenyon, 2004; Apfeld, Kenyon, 1999]. Показана консервативность нейрональных генов, контролирующих этот механизм у дрозофилы [Libert и др., 2007]. В частности, за образование обонятельной памяти отвечает *orco*, регулирующий функции группы нейронов, в минимальном варианте двух нейронов грибовидного тела, образующих соответствующую сигнальную цепь [Chen и др., 2012; Davis, Giurfa, 2012] и в конечном счете его функционирование определяет продолжительность жизни дрозофилы [Libert и др., 2007]. Функционирование генов, регулирующих этот механизм, зависит от многих факторов, включающих возраст, мутации наличие пищевых сигналов в окружающей среде. В результате, такие изменений затрагивают экспрессию более

20% генома, вероятно, определяя эффекты диеты на ПЖ, общие для большинства изученных организмов [Pletcher и др., 2002]. Механизм влияния сенсорных сигналов НС и нейроэндокринной регуляции метаболизма и ПЖ организма, как предполагают, опосредован генами инсулинового пути и консервативно сохраняется в процессе эволюции, от низших многоклеточных вплоть до млекопитающих [Libert и др., 2007; Reisert, 2010; Tatar, Bartke, Antebi, 2003]. Показано, что благодаря регуляторным воздействиям мозга, опосредованным нейроэндокринной регуляцией, пищевые и другие зрительные и обонятельные сигналы внешней среды модулируют развитие организма, поведение, размножение и ПЖ млекопитающих и человека [Bruning и др., 2000; Plum, Bruning, 2005; Sjostrom и др., 1980].

2.2.2.2. Нейроэндокринная регуляция, зависящая от термосенсорных сигналов

Нейроны, регулирующие передачу сигналов и реакцию на температуру внешней среды, играют важную роль в контроле ПЖ у многих модельных объектов [Garrity и др., 2010; Lee, Kenyon, 2009]. В некоторых случаях эта реакция участвует в процессах, инициируемых тепловым шоком и имеет общие генетические пути регуляции [Prahlad, Cornelius, Morimoto, 2008]. Показано, что, наоборот, агрегация белков в результате теплового шока может провоцировать развитие нейродегенеративных процессов в НС [Prahlad, Morimoto, 2011]. В целом, в регуляции ПЖ и пластичности НС, определяющей поведение модельных объектов, совместно взаимодействуют как генетические системы, определяющие передачу и обработку в НС термосенсорных сигналов, так и развитие теплового шока [Garrity и др., 2010; Sugi, Nishida, Mori, 2011].

Хотя не до конца изучены детали влияния термосенсорного восприятия на ПЖ млекопитающих, однако оно также регулирует скорость метаболизма и важнейшие процессы функционирования их организма, вплоть до гибернации. Очевидное регуляторное влияние НС необходимо и для этих процессов, влияя на температуру тела, оксигенацию крови, скорость метаболизма и другие основополагающие физиологические процессы [Geiser, 2004]. Именно отличиями этих процессов, регулируемых гипоталамусом, объясняют то, что ПЖ млекопитающих может отличаться до десяти раз между видами [Brunet-Rossini, Austad, 2004] или даже до двух раз внутри одного вида [Luman и др., 1981; Wilkinson, South, 2002].

Предполагают, что этот консервативный путь нейроэндокринной регуляции ПЖ также мог возникнуть эволюционно, как ответвление инсулинового пути регуляции, зависимой от пищевых сигналов [Conti и др., 2006]. Предполагают возможное аддитивное или конкурентное взаимодействие этих консервативных путей, обеспечиваемых нейроэндокринной регуляцией [Jeong и др., 2012]. Также эти механизмы регуляции ПЖ сенсорными сигналами, опосредованные контролирующей ролью НС, можно распространить и на другие типы стимулов внешней и внутренней среды [Leiser и др., 2015; Lin и др., 2017; Poon и др., 2010; Zimmer, 2009].

2.2.3. Другие консервативные механизмы участия НС в контроле ПЖ

Вместе с эволюционно возникшей ролью НС в восприятии, обработке и передаче стимулов внешней среды [Lin и др., 2017], за ней также закрепилась регуляторная роль в передаче сигналов внутренней среды, коммуникации между клетками многоклеточного организма и их совместном функционировании [Arendt, 2021]. И все эти функции НС, также как ее собственный статус, оказывают

непосредственное влияние на ПЖ животных [Alcedo, Flatt, Pasyukova, 2013; Lin и др., 2017]. Согласно современным воззрениям, такая функция НС, определяющая ПЖ живых организмов, является древней и возникла органически сразу вместе с возникновением ее прото-структур [Arendt, 2021; Jeong и др., 2012; Riera, Dillin, 2016].

2.2.3.1. Роль НС в ответе на стресс

НС играет важнейшую роль в физиологическом ответе живых организмов на различные стрессовые воздействия, возникающие в течение жизни. Даже просто процессы развития и старения, неизбежно протекающие в живых организмах, вызывают стресс, тип ответа на который должна определять НС [Kagias, Nehammer, Rosock, 2012].

Так, было показано, что нервная регуляция может стимулировать стрессовый ответ в разнообразных периферических тканях, даже в отсутствие самого стрессора [Lin и др., 2017]. Например, стимуляция выброса серотонина нейронами может вызывать полноценную реакцию теплового шока с повышением экспрессии фактора HSF-1 в других тканях в отсутствие реального изменения температуры среды [Tatum и др., 2015]. И такая симуляция теплового шока, только за счет возбуждения нейросенсорного ответа на симулированный температурный стресс, может оказаться одним из способов продлить жизнь особи путем хорошо изученных консервативных механизмов, связанных с этими типами стрессового ответа, поскольку давно короткие эпизоды теплового шока оказываются хорошим способом продлить жизнь у модельных объектов, включая дрозофилу и человеческие культуры клеток [Lagisz, Hector, Nakagawa, 2013; Rattan, 2005]. Показано, что продление жизни при этом обеспечивается только

специфическим повышением экспрессии фактора теплового шока HSF-1, которое и может быть стимулировано нейросенсорным ответом [Seo и др., 2013].

При этом хронический стресс, как физический, так и психологический, связанный только со статусом нервной системы, вызывает обратный по сравнению с короткими эпизодами, эффект, сокращая жизнь и вызывая изменения биологических часов, соответствующие ускоренному старению [Harvanek и др., 2021]. Показано, что слишком сильное или слишком длительное стрессовое воздействие, вызывающее соответствующий нейроэндокринный и/или поведенческий ответ, является достаточным фактором, обуславливающим через пути центральной регуляции дисбаланс функционирования систем организма (например, иммунной), изменения метаболизма в периферических тканях (в Tor пути и пути инсулинового ответа) и сокращение ПЖ [Mariotti, 2015].

В целом, в зависимости от функционального состояния НС варьируется восприятие и ответ организма на стресс. В зависимости от статуса и функционирования НС изменяются и становятся неоптимальными ответы организма на стрессовые факторы, что является причиной гибели организма и составной частью процесса старения [Nikoletopoulou, Tavernarakis, 2012]. НС определяет как метаболические особенности организма, например, протеостаз [David, 2012], так и его поведенческие реакции на стресс, процессы формирования памяти и обучения [Stein, Murphy, 2012]. Причины, влияющие на эту функцию НС могут быть как внешними, так и внутренними факторами, в частности, генетические [McKinney, Oh, Sibille, 2012] или энергетический баланс [Troulinaki, Vano, 2012].

2.2.3.2. Роль в контроле ПЖ генетической регуляции функционирования самой НС.

Определяющую роль в контроле ПЖ играют процессы, идущие в самой НС, в частности, возрастная нейродегенерация и воспаление, затрагивающие нейроны и клетки глии. Большую роль играет регуляция энергетического метаболизма в НС [Maig и др., 2011]. Соответствующие этим процессам изменения нейрональной экспрессии могут как уменьшить, так и увеличить ПЖ модельных организмов. В частности, показано, что с увеличением хронологического возраста животных регистрируется увеличение экспрессии воспалительных факторов как в отдельных клетках НС насекомых, так и в аналогичных им структурах мозга (в частности, гипоталамусе) у млекопитающих. Эти изменения экспрессии генов иммунного ответа объясняют многие негативные метаболические и функциональные изменения, возникающие в стареющем организме [Zhang и др., 2013].

Как упоминалось ранее, с возрастом в целом у различных организмов отмечают нарастание нервной возбудимости. Этот процесс связывают с изменением экспрессии ряда нейрональных факторов, при этом показано, что увеличение экспрессии транскрипционных факторов REST, SPR-3 и SPR-4 может снижать возрастающую с возрастом синаптическую возбудимость и продлять жизнь модельных организмов и человека. Снижение экспрессии этих факторов, наоборот, увеличивает синаптическую возбудимость и сокращает жизнь [Zullo и др., 2019]. Эти изменения экспрессии зависят от уровня нервной активности, нарастают со временем и, как было показано в последнее время, являются ключевым звеном эпигенетической регуляции, обуславливающим возникновение возрастных патологий НС, и в частности, нейродегенеративных заболеваний, через которое возможна соответствующая антивозрастная терапия [Nassar и др., 2023]. При этом главной причиной, которая ускоряет старение НС, может оказываться

возникающий в ней дисбаланс между синаптическим возбуждением и ингибированием. В такой схеме нейрональный транскрипционный фактор REST остается ключевым звеном, но важно не одностороннее снижение или увеличение его экспрессии, а сохранение оптимального для функционирования НС баланса регулируемых процессов [Ghosh и др., 2021]. Связано это с тем, что в процессе онтогенеза в нейронах происходят значительные колебания экспрессии REST, влияющего на примерно тысячу генов, являющихся его прямыми и опосредованными мишенями, но в процессе старения из-за возникающего дисбаланса происходит нарушение всего этого сложного ансамбля [Garcia-Manteiga и др., 2015]. Одним из важнейших, но не единственным, из регулируемых в этом балансе звеньев может оказаться связь синаптической активности, вызывающей повреждения ДНК, с ее репарацией [Pollina и др., 2023].

Такие сложные процессы происходят зачастую в отсутствие повреждений и факторов внешней среды, их протекание определяется во много генетически, и точное изучение вовлеченных в процессы в НС факторов даст гораздо более полное понимание того, как можно влиять на ПЖ [Lin и др., 2017].

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Линии *D. melanogaster*, использованные в работе

Для изучения мутаций в 3' области *esg* была использована линия w^{1118} ; $P\{GT1\}esg^{BG01042}$ (*esgP*) - гомозиготная линия *Drosophila melanogaster* с инсерцией вектора $P\{GT1\}$ размером 8.5 т.п.н., расположенной в 602 п.н. от 3' конца гена *esg* на фоне контрольной линии w^{1118} (<http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/pscreen/transposons.html>; [Bellen и др., 2004]). Обе линии были получены от Trudy Mackay (North Carolina State University). В работе были также использованы коизогенные линии с реверсией мутации (*esgRev3*, *esgRev5*), полученные ранее Н. В. Рощиной.

Для изучения РНКи нокдауна *esg* была использована трансгенная линия w^{1118} ; $P\{GD1437\}v9793$ (*esgНД1*) (оцениваемый неспецифический эффект 4%; <http://www.genomernai.org/v17/reagentdetails/9793>). Как контрольную по рекомендациям производителя использовали линию без трансгена w^{1118} (*esgK*). Обе линии были получены из Vienna *Drosophila* Resource Center и имеют оригинальные идентификаторы 9793 и 60000, соответственно ([Dietzl и др., 2004]; <http://stockcenter.vdrc.at/control/main>).

Также для изучения нокдауна *esg* были использованы полученные из Bloomington *Drosophila* Stock Center трансгенные линии $y^1 v^1$; $P\{TRiP.JF03134\}attP2$ (*esgНД2*) и $y^1 v^1$; $P\{TRiP.HMS00025\}attP2$ (*esgНД3*) (оригинальные идентификаторы 28514 и 34063, соответственно) по данным производителя, неспецифические эффекты РНКи отсутствуют, <http://www.genomernai.org/v17/reagentdetails/DRSC03530>; <http://www.genomernai.org/v17/reagentdetails/DRSC37545>). Как контрольная для них

была использована рекомендованная производителями линия без РНКи трансгена $y^1 v^1; P\{y^{+t7.7} = CaryP\}attP2$ (esgK2, оригинальный идентификатор 36303) (<http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/TRiPt.htm>).

Линия-драйвер $P\{w^{+mW.hs} = GawB\}elav^{C155} w^{1118}; P\{w^{+mC} = UAS-Dcr-2.D\}2$ (НС1, оригинальный идентификатор 25750) обеспечивала специфическую экспрессию конструкций в нервной системе.

Целевую экспрессию трансгенных конструкций индуцировали, скрещивая самок линии-драйвера с самцами контрольных линий esgK1, esgK2 и линий с РНКи трансгенами esgНД1, esgНД2, esgНД3.

Для изучения эффектов мутации $stc^{KG01230}$ была использована мутантная линия $y^1 w^{67c23}; P\{SUPor-P\}stc^{KG01230}; ry(stcP)$ и контрольная $y^1 w^{67c23}; ry(stcK)$, полученные из Bloomington Stock Center (оригинальные идентификаторы 13413 и 6599, соответственно), а также коизогенные линии с реверсией мутации, полученные ранее Н. В. Рощиной.

Линию $w^{1118}; P\{GD1543\}v47973$ (stcНД), содержащую трансгенную конструкцию во 2-й хромосоме использовали с целью РНК-интерференционного нокадауна гена *stc*, позволяющего понизить экспрессию соответствующего нейронального фактора транскрипции Stc. В качестве контрольной была использована исходная линия w^{1118} (stcK), как рекомендуют авторы конструкции. Источник этих линий - Vienna Drosophila Resource Center (исходные идентификаторы 47973, 60000).

Линии-драйверы $y[1] w[*]; P\{w[+mW.hs]=en2.4-GAL4\}e22c; P\{w[+mC]=tGPH\}4/TM3, Ser[1]$ (Эмб1) и $w[*]; P\{w[+mW.hs]=GawB\}337Y$ (Эмб2) и $w[*]; P\{w[+mW.hs]=GawB\}389$ (Эмб3) применяли для понижения уровня эмбриональной транскрипции гена *stc*. Линии $P\{w[+mW.hs]=GawB\}elav[C155] w[1118]; P\{w[+mC]=UAS-Dcr-2.D\}2$ (НС1) и $w[*]; P\{GAL4-elav.L\}3$ (НС2)

обеспечивали паннейрональное снижение экспрессии *stc*. Источник этих линий - Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC, США) (исходные идентификаторы 8165, 32119, 25750, 8760).

Целевую экспрессию трансгенных конструкций индуцировали, скрещивая самок линий-драйверов с самцами контрольной линии *stc^K* и линии с РНКи трансгеном *stc^{HD}*.

Дрозофил содержали при стандартной температуре воздуха 25°C, влажности около 60% и чередовании светового дня и темноты 12 часов/12 часов. Используемый лабораторный корм имеет в составе стандартное количество дрожжей и сахара, а также изюм, и, в качестве железирующего агента, агар. Как консервирующие агенты в корме использовали пропионовую кислоту и нипагин, с добавлением антибиотиков бензилпенициллин и стрептомицин. Все линии были до начала исследования проверены на заражение симбионтом *Wolbachia*, изменяющим метаболизм и продолжительность жизни [McGraw, O'Neill, 2004] методом кПЦР с использованием амплификатора MiniOpticon Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США), в соответствии с разработанной нами общей процедурой [Symonenko и др., 2018]. Статус изначально содержавших *Wolbachia* линий нормализовали культивированием в течение трех поколений с добавлением в лабораторный корм 250 мг/л антибиотика тетрациклина (Sigma-Aldrich, США), с последующей обязательной реабилитацией не менее трех поколений на стандартном лабораторном корме.

3.2. Измерение продолжительности жизни

Методика определения продолжительности жизни описана в [Roshina и др., 2014]. Дрозофил собирали в один день в течение 8 часов после рождения из пробирок с контролируемой плотностью населения. Дальше мух помещали в

стандартные пробирки с 5 мл лабораторной среды, содержащей манку, изюм, дрожжи, агар-агар, сахар и консервирующие агенты (пропионовая кислота, нипагин, антибиотики стрептомицин и бензилпенициллин). Для измерения продолжительности жизни девственных мух в пробирку помещали 5 особей одного пола; для измерения продолжительности жизни скрещивавшихся мух в пробирку помещали по 3 особи одного пола. Мух содержали с ежедневной регистрацией количества выживших и еженедельным переносом на свежий корм при температуре 25°C, влажности воздуха около 60% и чередовании свет/темнота 12/12 часов. Все опыты с мухами, продолжительность жизни которых сравнивалась, проводили одновременно, в выборках по 50-100 особей. Значимые результаты подтверждены с интервалом около полугода в двух-трех повторных экспериментах. Продолжительность жизни особей определяли как количество полных дней, проходящее от вылупления до гибели имаго. Как характеристические параметры оценивали среднюю и максимальную продолжительность жизни особей, а также кривые выживания.

1.3. Анализ подвижности линий дрозофил

Подвижность изучали в соответствии с методикой [Roshina и др., 2014], помещая пять девственных или скрещивавшихся особей одного пола, собранных и поддерживаемых, как в опытах по измерению продолжительности жизни, но без регистрации момента их гибели, в пробирку. В случае измерения подвижности скрещенных мух, их отсаживали от мух противоположного пола за один день до измерения, и после измерения опять объединяли. Подвижность особей обоего пола в разном возрасте измеряли в выборках 55-100 мух на вариант опыта, в одном хронологическом интервале, характеризующемся пиком активности дрозофил (с 16 до 20 часов), одновременно для всех сравниваемых вариантов генотипа. Мы

измеряли подвижность особей внутри горизонтально или вертикально расположенной пробирки по количеству пересечений инфракрасных лучей, регистрируемому наружными кольцевыми датчиками прибора *Drosophila Population Monitor* (TriKinetics Inc., США), с регистрацией числа пересечений каждые пять минут. Получаемое из двух последовательных пятиминутных измерений среднее значение использовали как параметр, характеризующий двигательную активность.

3.4. Измерение плодовитости и жизнеспособности

Измерение плодовитости проводили у самок возрастом 3, 20, 40 и 60 дней, в выборках по 80-200 особей на вариант опыта. Самки после скрещивания содержались 12 часов в стандартных пробирках, откладывая яйца на обычный корм. Затем их убирали, а отложенные яйца подсчитывали и перемещали в свежие пробирки для дальнейшего развития. В каждой пробирке подсчитывали личинок, куколок и взрослых мух.

Для определения времени вылупления личинок после эмбриогенеза, оплодотворенным самкам возрастом 30 дней позволяли откладывать яйца в течение 15 минут и затем убирали. Подсчет количества вылупившихся из эмбрионов личинок производили каждые 15 минут начиная с возраста эмбриона 22 часа и до 26 часов.

Для характеристики жизнеспособности потомства использовали среднее и медианное соотношение личинок, куколок и имаго к количеству собранных яиц в пробирке.

3.5. ПЦР и количественная ПЦР с реакцией обратной транскрипции (ОТ-кПЦР)

Препаративную ПЦР и последующее секвенирование проводили согласно методике, описанной в [Symonenko и др., 2018]. Количество мРНК генов оценивали согласно методу, описанному в [Симоненко и др., 2022]. Геномную ДНК для ПЦР выделяли из 20 мух стандартным фенол-хлороформным методом [Sambrook, J., Fritsch, E. R., Maniatis, T., 1989]. Тотальную РНК для определения количества транскрипта исследуемых генов получали из 30-50 голов, 20 каркасов или из 20 целых личинок или имаго одного пола на вариант опыта с использованием тризола (Invitrogen, США) или набора ExtractRNA (Евроген, Россия) и последующей очисткой ДНКазой I (Sigma-Aldrich, США) по рекомендованной процедуре. Для синтеза кДНК использовали наборы SuperScript II Reverse Transcriptase® (Invitrogen, США) или Mint Reverse Transcriptase (Евроген, Россия) с праймерами oligo(dT)₁₅. Одинаковую концентрацию ДНК и кДНК на этапах приготовления препаратов для ПЦР и кПЦР контролировали измерением в приборе Nanodrop-1000 (ThermoFisher). ПЦР и кПЦР проводили с использованием HotStart Taq полимеразы (Сибэнзим). Для измерения количества матрицы в кПЦР использовали интеркалирующий краситель SYBR Green I (Invitrogen) и прибор для кПЦР в реальном времени MiniOpticon Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Для более точной нормализации экспрессии различных образцов между собой использовали референсные гены «домашнего хозяйства» *gdh* (праймеры Gdh1 и Gdh2) и *adh* (праймеры Adhd3 и Adhr3), обладающие сравнимым с *stc* (праймеры Stc-rt1 и Stc-rt2 для одновременного определения обоих транскриптов гена, и Stc-RB1 и Stc-RB2 для селективного определения транскрипта RB) уровнем экспрессии. Амплификацию проводили по программе двух- или трехступенчатого ПЦР (последняя - для обнаружения *Wolbachia* (праймеры W-specf и W-specr к гену

16S рРНК [Werren, Windsor, 2000]) и препаративной ПЦР перед секвенированием (праймеры Esg1 и Esg2 для амплификации последовательности в районе *esg*, и пары праймеров 1) *pstc1* и *pstc2*; 2) *pstc0* и *pstc02*; 3) *pstc3* и *pstc4* для соответствующих фрагментов *stc*). Температуры отжига праймеров подбирали для оптимизации выхода продукта предварительно, с использованием градиентной амплификации для каждой пары праймеров в диапазоне 66-68°C. Последовательности прямых и обратных праймеров, использованных в ПЦР, приведены в Таблице 1.

Определение относительной нормализованной экспрессии исследуемых генов рассчитывали с использованием CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, США, 2012). На каждый вариант опыта использовали образцы РНК, выделенные из собранного отдельно от 3 до 5 раз биологического материала, при 2-6 технических повторностях в каждом случае.

В случае использования продукта препаративного ПЦР в дальнейшем для секвенирования амплификацию проводили с использованием смеси полимераз Taq/Pfu в соотношении 1:5, а продукт 2-3 независимых амплификаций перед секвенированием смешивали, чтобы нивелировать влияние случайных мутаций, возникающих при амплификации (согласно рекомендациям проекта DGRP [Maskau и др., 2012]).

3.6. Секвенирование продуктов ПЦР

ПЦР-препараты перед секвенированием обрабатывали экзонуклеазой EhoIII (NEB) и щелочной фосфатазой креветок SAP (NEB) в течение 30-60 минут при 37°C с последующей инактивацией нагреванием в течение 15 минут при 65°C. Секвенирование проводили согласно инструкциям производителя с помощью набора BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) с очисткой на колонках CentriSep (Princeton Separations) и последующим секвенированием в ABI PRISM

3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Для секвенирования района *esg* использовали праймеры Esg1 и Esg2, а для соответствующих фрагментов *stc* – пары праймеров s1 и 2, s3 и s4, s5 и s6, указанные в Таблице.

Таблица — Праймеры, использованные в ПЦР, кПЦР и секвенировании

Название праймера	Последовательность праймера 5'→3'
Wspecf	CATACCTATTCGAAGGGATAG
Wspecr	AGCTTCGAGTGAAACCAATTC
Gdh1	TATGCCACCGAGCACCAGATTCC
Gdh2	GGATGCCCTTCACCTTCTGCTTCTT
Adhd3	CGGCATCTAAGAAGTGATACTCCCAAAA
Adhr3	TGAGTGTGCATCGAATCAGCCTTATT
Esg1	AGTCAATTCCTATTTCCGGC
Esg2	CACCCGAACGATACCTTACC
Stc-rt1	AACAGGCACAGCAACAACAA
Stc-rt2	CCAGGGAGAAGTTAGTGTAG
Stc-RB1	GGAGCCTTTGGACTGAACCC
Stc-RB2	ATTCGGAGATTGATGACTCAC
pstc1	GAACCGTTGCAGTACATTTAAC
pstc2	GGAACAATCTCGAACTGCCC
pstc0	CTAATTGGAAGGCGGAGCTC
pstc02	CATTGAGAGTCCGGTGCTGT
pstc3	ACACGTGTCTGGAGCTTTTCC
pstc4	TCCGCTCTGTTACATAGCTGC
s1	TCCAACCAGACTGTCAAGTCAAATTAC
s2	TTCAATTAGCATGATCCAAGG
s3	AGACGTTGCTCTCGATCAGC
s4	AGACCACTCCCCGAAAAGT
s5	ATGTCAGCCCCTGTATGTGC
s6	AGAATCCAATCAGAGTGCGTC

3.7. Иммуноокрашивание и световая микроскопия

Препараты личинок 3-го возраста готовили в фосфатном буфере PBS с последующей фиксацией 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) двадцатиминутной инкубацией на столе и с последующей промывкой буфером. Затем их обрабатывали в течение часа раствором BlockPro (Visual Protein, Великобритания) на столе, чтобы исключить неспецифическую реакцию. Последующая реакция с первичными антителами в растворе BlockPro проводилась инкубацией при 4°C в течение ночи, с последующей промывкой фосфатным буфером. Затем в течение 2 часов на столе проводили реакцию со вторичными антителами в растворе. Образцы промывали фосфатным буфером и перемещали в среду VectaShield (Vector Labs, США).

Использованные первичные антитела включали мышинное моноклональное антитело nc82 (1:200; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), США), с подтвержденной реактивностью к белку Bruchpilot (Brp) (<https://dshb.biology.uiowa.edu/nc82>), индикатору синаптической активности у дрозофилы [Wagh et al., 2006]; поликлональные козы, соединенные с Alexa Fluor® 647 анти-HRP (1:400, Jackson ImmunoResearch, Великобритания, <https://www.jacksonimmuno.com/catalog/products/123-605-021>), специфические к пероксидазе хрена (HRP), и в нейромышечном соединении личинок дрозофилы окрашивающие мембрану пресинаптической терминали аксона [Franco et al., 2004]. В качестве вторичных использовали поликлональные козы антитела, реактивные к мышинным IgG и соединенные с флуоресцентным красителем CyTM3 (1:400, Jackson ImmunoResearch, Великобритания, <https://www.jacksonimmuno.com/catalog/products/115-165-003>). Анализ нейромышечных соединений проводили на четвертой мышце третьего и четвертого брюшных личиночных сегментов. Препараты исследовали с применением

лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 510 и программного обеспечения Zeiss LSM Image Browser (Zeiss, Германия), а также пакета ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Использованная выборка составляла 10 особей на вариант опыта. В качестве индикатора синаптической активности использовали среднее число синаптически активных зон, содержащих Vpr.

3.8. Статистический анализ данных

Для выявления отличий в нормализованной относительной экспрессии исследуемых генов, подвижности, плодовитости, жизнеспособности и числа синаптически активных зон применяли метод Стьюдента и непараметрический, независимый от распределения тест Краскела-Уоллиса [Kruskal, Wallis, 1952], или при наличии только двух независимых групп тест Манн-Уитни [Mann, Whitney, 1947]. Оба подхода давали аналогичные значения и позволяли сделать сходные выводы, поэтому в большинстве случаев приводятся только результаты обработки данных непараметрическими методами. Показатели, описывающие характеристики продолжительности жизни (минимальная, средняя, медианная и максимальная продолжительность жизни с соответствующей стандартной ошибкой, а также их значения для отдельных когорт) были рассчитаны в соответствии с работами [Carey, 2003; Wilmoth, Horiuchi, 1999]. Анализ кривых выживания проводили с применением метода Каплана-Мейера [Kaplan, Meier, 1958]. При условии соответствия характеристик кривых выживаемости (по тесту Колмогорова-Смирнова), статистическая значимость отличий между ними по характеристикам продолжительности жизни определялась непараметрическим тестом Манна-Уитни. Во всех случаях множественных сравнений средних вносили поправку Бонферрони. Для характеристики различий в продолжительности жизни в позднем возрасте использовали тест Флеминга-Харрингтона, поскольку

непараметрический тест Манн-Уитни сравнительно больший вес при оценке значимости придает ранним отличиям [Garès и др., 2016]. Для статистических расчетов использовали веб-приложение OASIS 2 (<https://sbi.postech.ac.kr/oasis2/surv/>, [Han и др., 2016]), а также программный пакет Tibco Statistica® 14.0.0 (Cloud Software, США).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Влияние гена *escargot* на продолжительность жизни *D. melanogaster*

Ген *esg* (<https://www.alliancegenome.org/gene/FB:FBgn0287768>) расположен на 2-й хромосоме генома дрозофилы и состоит из единственного экзона. Он кодирует транскрипционный фактор, и в составе этого белка можно выделить ДНК-связывающий домен с пятью цинковыми пальцами, обеспечивающими специфическое узнавание мотивов и контакт с нуклеиновыми кислотами, и домен P-DLS-K, характерный для семейства белков Snail. Этот фактор может служить как активатором, так и репрессором транскрипции, связываясь с консенсусным мотивом 5'-A/GCAGGTG-3', а также с кофактором dCtBP. [Ashraf и др., 1999; Cai и др., 2001; Ashraf, Ip, 2001]. Белок Esg локализуется преимущественно в ядре и обладает тканеспецифической активностью [Whiteley и др., 1992]. Анализ экспрессии гена *esg* выявил его транскрипты на 8-9 стадиях развития эмбриона в вентральной части эмбриона, в дальнейшем дающей начало нервной ткани, на стадии 11 – в полоске, следующей вдоль вентральной стороны тела, на стадиях 14-16 – в центральной нервной системе и некоторых других тканях [Hayashi и др., 1993]. На личиночной стадии наибольшая экспрессия *esg* наблюдается в центральной нервной системе и в кишечнике, а у взрослых мух – в кишечнике и семенниках. Семейство Snail, к которому относят *esg*, объединяет белки, выполняющие важную роль в развитии нервной системы у членистоногих и хордовых [Manzanares и др., 2001]. Наиболее изученной функцией Esg и других белков Snail в развитии дрозофилы является контроль асимметричного деления нейробластов во время эмбриогенеза. Однако функции Esg не ограничиваются нейрональной сферой; он также участвует в поддержании функций клеток кишечника и мужских половых клеток, регулировании морфогенеза трахеи и

развития генитального диска, а также определении судьбы клеток крыла (<http://flybase.org/reports/FBgn0001981.html>).

4.1.1 Полученные результаты

4.1.1.1 Мутация *esg[BG01042]* увеличивает продолжительность жизни девственных самцов и самок

Линия *D. melanogaster w[1118]; P{GT1}esg[BG01042]* (*esgP*) с мутацией *esg*, вызванной инсерцией векторной конструкции *P{GT1}* на расстоянии 602 пн от конца гена, и ко-изогенная контрольная линия без инсерции *w[1118]* (*esgK1*) были использованы в нашей работе для исследования влияния *esg* на продолжительность жизни и старение. Продолжительность жизни мух *esgP* и *esgK1* оценивали несколько раз. В двух скрининговых экспериментах небольшого объема, проведенных в лаборатории Труди Маккей и описанных в статье [Magwire и др., 2010], продолжительность жизни самцов *esgP* была значительно больше, чем у контрольных особей, тогда как у самок этот эффект не был выявлен. Увеличение продолжительности жизни самцов *esgP* было дополнительно подтверждено в эксперименте, проведенном в лаборатории геномной изменчивости [Magwire и др., 2010], и эти данные были представлены в диссертационной работе Натальи Рощиной [Рощина, 2008].

Зависимое от пола влияние различных факторов и генов на продолжительность жизни – не редкость [Tricoire и др., 2009; Ruiz и др., 2011; Roshina и др., 2014; Schriener и др. 2014; Shaposhnikov и др. 2015]. В первых экспериментах [Magwire и др., 2010] влияние мутации *esg[BG01042]* на продолжительность жизни у самок не достигло статистической значимости, что

привело к выводу о том, что *esg[BG01042]* специфически влияет на продолжительность жизни самцов. Тем не менее, в первоначальных экспериментах объем выборки был небольшим, и слабые эффекты могли остаться незамеченными. Чтобы более полно понять, является ли влияние *esg[BG01042]* на продолжительность жизни исключительно характерным для самцов, мы повторно измерили продолжительность жизни у самок и самцов *esgP* и *esgK1*. В результате нами было обнаружено, что продолжительность жизни существенно увеличилась не только у мутантных самцов, но также у мутантных самок по сравнению с контрольными группами (см. табл. 1 в Приложении, рисунок 4А, Б). Однако, положительный эффект мутации у самок был значительно меньше (33% от средней продолжительности жизни контрольных особей) по сравнению с самцами (соответственно, 58%). Аналогичный результат был получен экспериментально в двух других измерениях (см. табл. 1 в Приложении, рис. 5А-Г). Обобщая наши результаты, эффект мутации, увеличивающий продолжительность жизни, варьировал от 22% до 96% у самцов и от 4% до 33% у самок, при среднем положительном влиянии на продолжительность жизни 55% и 17% соответственно. В результате анализа кривых выживания выяснилось, что мутация замедляет старение не только у самцов, но и у самок дрозофилы (рис. 4А, Б, рис. 5А-Г). Максимальная продолжительность жизни у мутантных самцов была на 40% выше, а у мутантных самок - на 17% выше, чем у контрольных особей (см. табл. 1 в Приложении). Важно отметить, что описанный положительный эффект, оказываемый мутацией на скорость старения и продолжительность жизни, сохранялся на протяжении ряда лет.

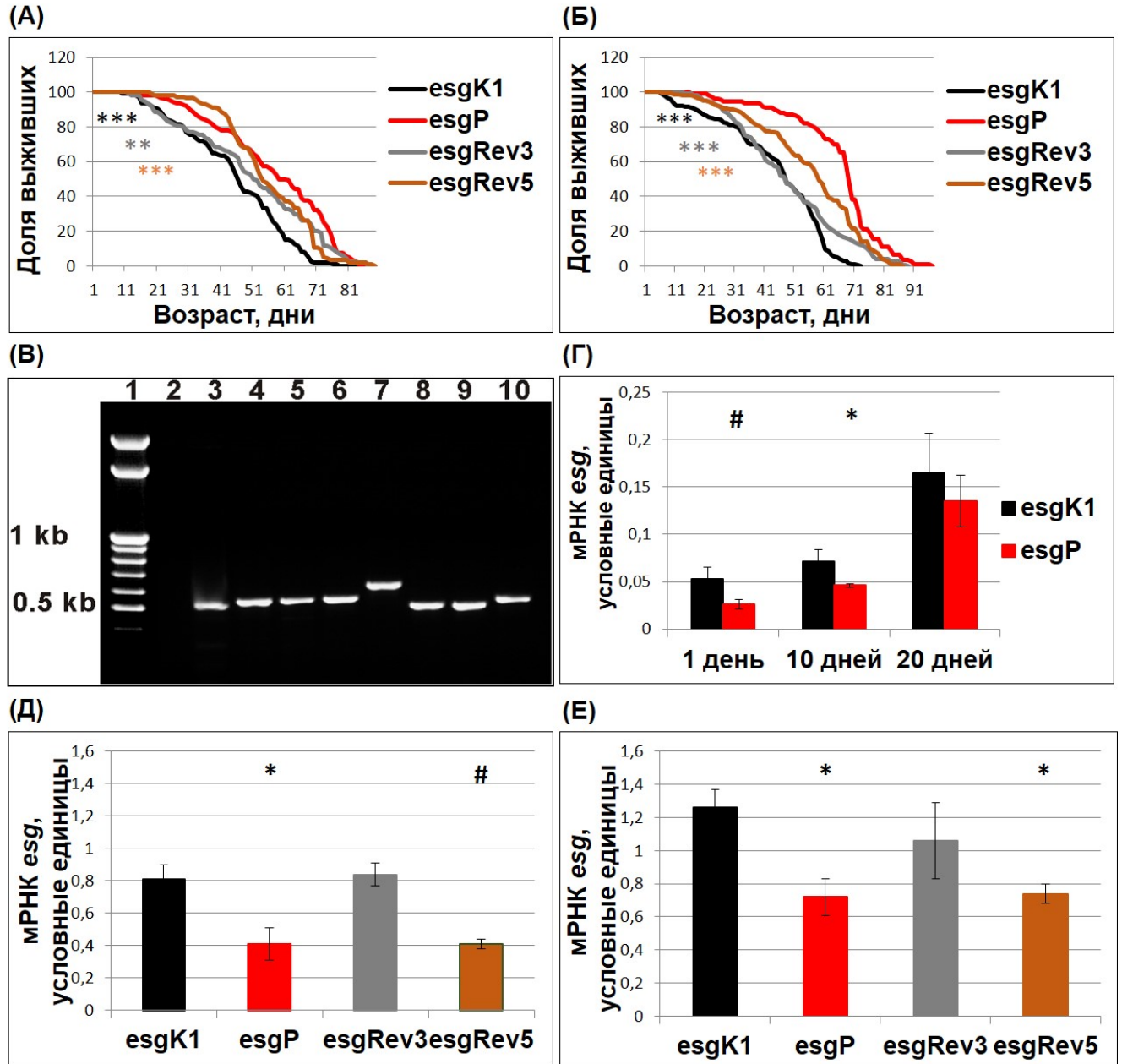


Рисунок 4 — Эффект мутации *esg[BG01042]* и ее реверсии на кривые выживания девственных самок и самцов, структуру окружения гена и его экспрессию. (А) — кривые выживания девственных самок. (Б) — кривые выживания девственных самцов. (В) — анализ структуры ревертантов методом ПЦР анализа (ПЦР праймеры *esg1* и *esg2*, ожидаемый в *esgK1* размер продукта 508 пп): 1 — маркер (GeneRuler™ 100 bp Mass DNA Ladder, Fermentas); 2 - *esgP* (отрицательный контроль, ожидаемый ПЦР-продукт размером около 9 тпн не образуется при

использованных условиях ПЦР), 3 – *esgK1*; 4 – *esgRev1.1*; 5 - *esgRev1.2*; 6 - *esgRev2.1*; 7 - *esgRev2.2*; 8 - *esgRev3*; 9 - *esgRev4*; 10 - *esgRev5*. (Г) – количество транскрипта *esg* у самцов разного возраста. (Д) - количество транскрипта *esg* у однодневных самцов. (Е) - количество транскрипта *esg* в эмбрионах. Достоверность отличия от *esgK1*, тест Краскела-Уоллеса: # - $P < 0,10$; * - $P < 0,05$ (без учета коррекции Бонферрони).

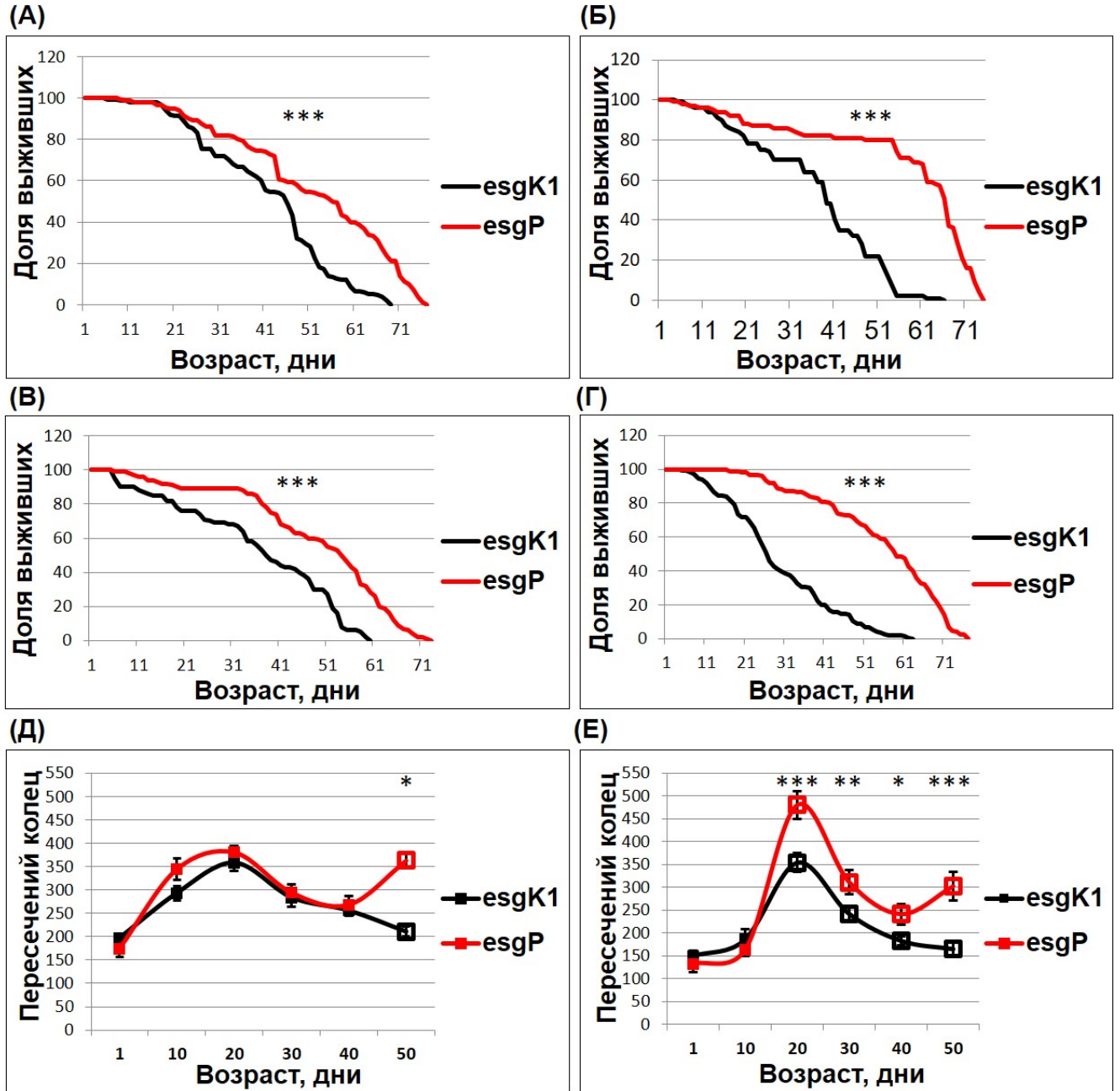


Рисунок 5 — Влияние мутации *esg[BG01042]* на продолжительность жизни девственных мух и их подвижность. (А, В) – кривые выживания самок. (Б, Г) – кривые выживания самцов. (Д) – спонтанная (горизонтальная) локомоторная активность самок. (Е) - спонтанная (горизонтальная) локомоторная активность самцов. Значимость отличий от контроля, определенная критерием Краскела-Уоллиса: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$.

Ранее, чтобы подтвердить причинно-следственную связь между возникновением мутации и изменением продолжительности жизни, в лаборатории геномной изменчивости были получены ко-изогенные линии с реверсиями *esg[BG01042]* [Рощина, 2008; Magwire и др., 2010]. Мы описали структуру полученных реверсий.

Всего было получено семь линий с реверсиями. В каждой линии для оценки природы реверсий использовали ПЦР с праймерами, фланкирующими сайт встройки вектора $P\{GT1\}$, вызвавшей мутацию. Длины ПЦР-фрагментов, полученных с данного региона в контрольной линии и в двух линиях с реверсиями (рис. 4В, дорожки геля 3, 8, 9) были одинаковы, что свидетельствовало о точном вырезании векторной конструкции $P\{GT1\}$. В пяти других линиях ревертантов длины продуктов ПЦР с фланкирующих праймеров несколько отличались в большую сторону, что указывало на неполную точность в вырезании вектора (рисунок 4В). Мы подтвердили данный результат, определив последовательность полученных продуктов ПЦР секвенированием. В одной линии (*esgRev3*) последовательность была идентична референсной геномной (<http://flybase.org/decoratedfasta/FBgn0287768>), в другой линии с точным вырезанием (*esgRev4*) были обнаружены три нуклеотидные замены. В линиях *esgRev1.1*, *esgRev1.2*, *esgRev2.1*, *esgRev2.2* и *esgRev5* между дублированными фрагментами генома, ограничивавшими исходную инсерцию, были обнаружены вставки длиной от 30 до 162 пн. Две ревертантные линии, *esgRev3* с полным восстановлением исходной структуры генома и *esgRev5* со вставкой длиной 32 пн, были выбраны для дальнейшего исследования.

Продолжительность жизни самцов *esgRev3* 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

(табл. 1 в Приложении, рис. 4А, Б). Полученные нами результаты полностью подтверждают, что реверсия инсерционной мутации сопровождается обратным изменением мутантного фенотипа и доказывают наличие причинной связи между мутацией и продлением жизни дрозодилы.

Продолжительность жизни самцов линии с небольшой вставкой *esgRev5* отличалась как от продолжительности жизни самцов исходной мутантной линии *esgP*, так и от продолжительности жизни контрольных самцов линии без вставки (табл. 1 в Приложении, рис. 4Б). Продолжительность жизни самок линии с небольшой вставкой *esgRev5* не отличалась от продолжительности жизни самок линии с исходной мутацией *esgP* и достоверно отличалась от продолжительности жизни самок контрольной линии без вставки (см. табл. 1 в Приложении, рис. 4А). Полученные результаты показали, что небольшая вставка размером 32 п.н. и большая исходная вставка размером 8500 п.н, расположенные на 602 п.н. дальше 3' конца гена *esg*, оказывают практически равный положительный эффект на продолжительность жизни девственных самцов и самок.

4.1.1.2. Мутация *esg[BG01042]* снижает относительную экспрессию *esg*

Для понимания молекулярной основы обусловленных мутацией различий в продолжительности жизни мух, мы определили изменения количества мРНК *esg* при мутации *esg[BG01042]*. Известен только один белок-кодирующий транскрипт *esg* NM_057252.4, которому соответствует один полипептид NP_476600.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/34903>). Количество транскрипта *esg* у взрослых особей очень мало, причем у самцов оно чуть больше благодаря транскрипции в семенниках. В наших опытах влияние *esg[BG01042]* на продолжительность жизни

было наиболее сильным у девственных самцов. Учитывая эти два факта, мы сосредоточились на работе с девственными самцами и сравнили общее количество транскрипта *esg* у мутантных и контрольных 1, 10 и 20-дневных особей. Было обнаружено значительное снижение количества транскрипта *esg* у 10-дневных мутантных самцов по сравнению с контролем (табл. 2 в Приложении, рис. 4Г). У 1-дневных мутантных самцов снижение экспрессии было достоверным, если порог значимости был увеличен до значения $P < 0,1$, иногда используемого при анализе количественных признаков, а у 20-дневных самцов снижение не было статистически значимым. Наша интерпретация этих результатов заключалась в том, что мутация *esg[BG01042]* снижает количество транскрипта *esg* во всех возрастах, но в некоторых случаях количество мРНК было слишком мало, чтобы достичь уровня статистической значимости. Действительно, у 1-дневных самцов статистически значимые различия были подтверждены при сравнении количества транскрипта *esg* в повторном эксперименте (табл. 2 в Приложении, рис. 4Д).

Экспрессия *esg* наблюдается преимущественно на эмбриональной стадии (<http://flybase.org/reports/FBgn0001981.html>). Экспрессия сохраняется на протяжении всего эмбриогенеза, причем наибольшее количество мРНК *esg* наблюдается с 4 до 14 часов развития. Более высокое количество мРНК *esg* в ранних эмбрионах может объясняться присутствием материнских транскриптов, поэтому мы оценили количество транскриптов *esg* в 14-20-часовых мутантных и контрольных эмбрионах, характеризующихся умеренной экспрессией *esg*. Такой большой интервал позволил нам получить общие характеристики контрольных и мутантных эмбрионов и нивелировать возможный неодинаковый вклад яиц на разных стадиях развития. Количество транскрипта *esg* было значительно ниже в мутантных эмбрионах, чем в контрольных (табл. 2 в Приложении, рис. 4Е).

Важно было также понять, соответствует ли различие и сходство в продолжительности жизни у контрольных, мутантных и ревертантных линий

различию и сходству в количестве транскрипта *esg*. Мы сравнили количество транскрипта *esg* у мутантных, контрольных и ревертантных однодневных самцов и у 14-20-часовых эмбрионов (табл. 2 в Приложении, рис. 4Д, Е). Во всех изученных нами случаях не было обнаружено значимых отличий в уровнях относительной экспрессии *esg* ни между линиями *esgK1* и *Rev3*, ни между линиями *esgP* и *Rev5*. Однако была обнаружена значимая разница между линиями *esgK1* и *Rev5*, определенная в эмбрионах и целых самцах, а также между линиями *esgP* и *Rev3* у самцов. В совокупности эти результаты указывают на то, что реверсия мутации сопровождалась соответствующим обратным изменением относительной экспрессии *esg*, однако неточное вырезание не изменяло уровень мРНК *esg*. Это дает нам достаточные основания для утверждения, что уменьшение относительной экспрессии *esg* лежит в основе уменьшения продолжительности жизни мутантов. Кроме того, эти результаты показали, что маленькая вставка размером 32 пн и большая вставка *P{GT1}* размером 8500 пн, расположенные в 3' области гена *esg*, одинаково влияют на экспрессию *esg*.

4.1.1.3. Мутация *esg[BG01042]* увеличивает продолжительность жизни скрещивавшихся самцов

Для дальнейшей оценки влияния *esg[BG01042]* на продолжительность жизни, мы сравнили продолжительность жизни скрещивавшихся мух *esgK1* и *esgP*. Было обнаружено значительное продление жизни самцов мутантной линии по отношению к контрольным (см. табл. 1 в Приложении, рис. 6Б). Для подтверждения данного вывода мы повторили измерения, определив, что продолжительность жизни самцов мутантной линии снова была значительно больше измеренной у контрольных (см. табл. 1 в Приложении, рис. 6Г). Продолжительность жизни мутантных скрещивавшихся самок не изменялась (табл. 1 в Приложении, рис. 6А).

Чтобы подтвердить этот вывод, мы повторили опыты, и получили такой же результат (табл. 1 в Приложении, рис. 6В). У мутантных скрещенных самцов увеличение продолжительности жизни оказалось аналогичным, но несколько меньшим (43%) по сравнению с девственными. Можно предположить, что у скрещенных самок уменьшение эффекта мутации, аналогичное наблюдаемому у самцов, выразилось в отсутствии различий между мутантными и контрольными особями, поскольку у девственных самок влияние мутации на продолжительность жизни было меньше, чем у девственных самцов. Для скрещенных самцов анализ кривых выживания подтвердил, что мутация оказывает влияние на продолжительность жизни, замедляя старение (рис. 6Б, Г). У самцов в линии с мутацией максимальная продолжительность жизни в среднем на 40% превышала определенную для контрольной линии (см. табл. 1 в Приложении).

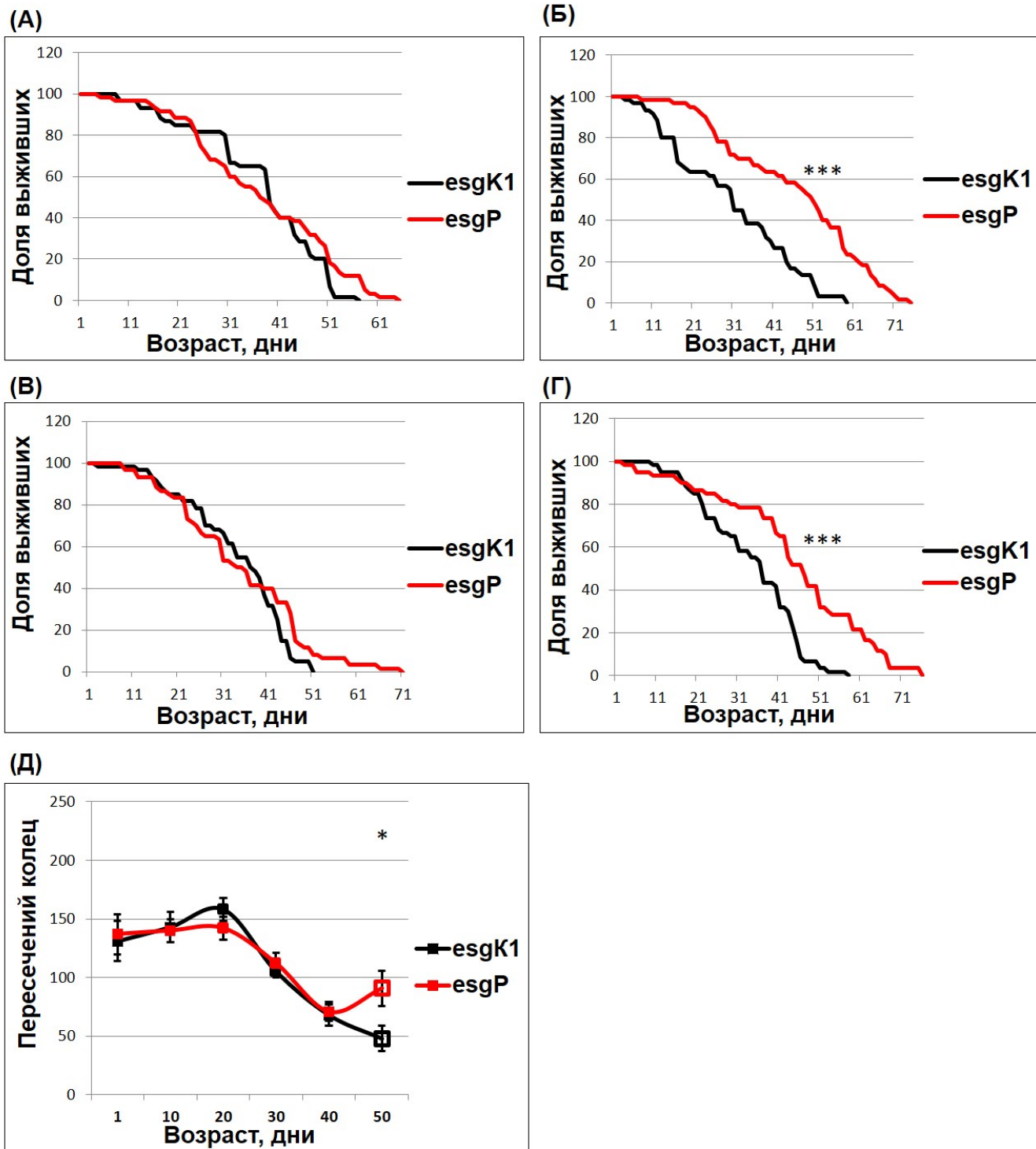


Рисунок 6 — Эффект, оказываемый мутацией *esg[BG01042]* на кривые выживания и подвижность скрещивавшихся мух. (А, В) – кривые выживания самок. (Б, Г) – кривые выживания самцов. (Д) – подвижность самцов.

4.1.1.4. Мутация *esg[BG01042]* увеличивает подвижность

Общая локомоторная активность (подвижность) является одним из интегральных показателей функционального статуса нервной системы. Как и функция нервной системы, снижение подвижности животных является характерным признаком старения, обычно считающимся одним из лучших интегральных индикаторов этого процесса [Ridgel, Ritzmann, 2005]. Учитывая это, в результате проведенного нами анализа эффектов, которые мутация *esg[BG01042]* оказывает на подвижность девственных мух обоих полов и отдельно скрещивавшихся самцов, мы хотели выявить наличие возможного влияния мутации на скорость старения и функциональное состояние нервной системы. Оказалось, что, в соответствии с ожидаемой возрастной динамикой, подвижность особей снижается хронологически зависимо, начиная с возраста 20 дней, как в контрольной, так и в мутантных линиях (см. табл. 3 в Приложении, рис. 5Д, Е, рис. 6Д). Но неожиданно у долгоживущих мутантных дрозофил был выявлен последующий поздний, в возрасте 50 дней, рост локомоторной активности (рис. 5Д, Е, рис. 6Д). Учитывая универсальное значение подвижности как интегрального индикатора физиологического старения, это позволяет нам сделать вывод о замедлении или даже реверсии данного процесса вследствие изученной инсерционной мутации. Кроме того, следует заметить, что у девственных самцов линии с мутацией, которых характеризует максимальный эффект продления жизни, подвижность превышала контрольную, начиная с 20 дней (рис. 5Е). Таким образом, можно говорить о том, что мутация *esg[BG01042]* способствует улучшению функционального статуса нервной системы, особенно в позднем возрасте. Более высокий уровень подвижности у старых мутантов подтвердил также нашу гипотезу, основанную на первоначальном сравнении кривых выживания, что мутация *esg[BG01042]* замедляет старение.

4.1.1.5. Нейрональный нокдаун *esg* продляет жизнь девственных самцов и самок

Для подтверждения участия гена *esg* в контроле продолжительности жизни можно было бы проверить, влияют ли другие его мутации на этот признак. Однако ранее в пилотном исследовании [Magwire и др., 2010], уже было дополнительно идентифицировано семь других инсерционных мутаций *esg*, сокращающих жизнь дрозофилы. Все семь встроок локализовались в местах, отличных от места локализации мутации, вызвавшей увеличение продолжительности жизни. Тот факт, что восемь независимых инсерций в районе гена *esg* влияют на продолжительность жизни дрозофилы, является косвенным, но достаточно убедительным подтверждением нашего вывода о влиянии *esg* на генетический контроль старения и продолжительности жизни. Кроме того, нам хотелось иметь возможность связывать фенотипические изменения с уровнем и локализацией измененной экспрессии гена. Действительно, у мутантов мы измерили количество транскрипта *esg* в эмбрионах или в целых имаго, вследствие чего конкретные ткани, в которых происходило значимое изменение, не были идентифицированы. В связи с технической сложностью определения малых количеств мРНК в отдельных тканях, мы решили индуцировать экспериментальное тканеспецифическое снижение количества мРНК *esg* с использованием метода РНК-интерференции.

Для более универсального описания эффектов снижения экспрессии *esg* и увеличения вероятности получения эффекта, симулирующего ранее исследованную мутацию, мы осуществили тканеспецифический нокдаун, используя в три независимых линии с конструкциями, вызывающими РНК-интерференцию *esg*. Исходя из максимального интереса к эффектам нейрональной экспрессии *esg*, мы решили оценить влияние нокдауна *esg* в нейронах на продолжительность жизни самцов и самок.

Для оценки эффектов нокдауна были использованы линии, *w1118; P{GD1437}v9793* (*esg*НД1), *y1 v1; P{TRiP.JF03134}attP2* (*esg*НД2), и *y1 v1; P{TRiP.HMS00025}attP2* (*esg*НД3) с трансгенными конструкциями, обуславливающими РНК-интерференцию *esg*, и соответствующие контрольные линии (*esg*К2 для *esg*НД1 и *esg*К3 для *esg*НД2 и *esg*НД3), предложенные производителями. Хорошо известная линия *P{w+mW.hs=GawB}elavC155 w1118; P{w+mC=UAS-Dcr-2.D}2* (далее НС1) была применена для panneйрональной экспрессии трансгена, приводящей к нокдауну *esg*. Гибридные потомки, полученные от скрещивания самок НС1 с *esg*НД1, *esg*НД2, *esg*НД3, *esg*К2 и *esg*К3, были использованы для измерения продолжительности жизни

Мы получили различные эффекты для трех вариантов конструкций, вызывающих РНК-интерференцию, и могли проанализировать их отличия. Нейрональный нокдаун *esg*, полученный в результате использования линии *esg*НД1, вызвал летальный эффект. Нокдаун *esg*, полученный в результате использования линии *esg*НД2, значительно сокращал жизнь у особей обоих полов (см. табл. 1 в Приложении, рис. 7А, Б). Однако третий полученный нами вариант РНК-интерференции, полученный в результате использования линии *esg*НД3, приводил к небольшому, но значимому и независимому от пола продлению жизни, воспроизведенному в двух независимых постановках опыта (см. табл. 1 в Приложении, рис. 7А-Г).

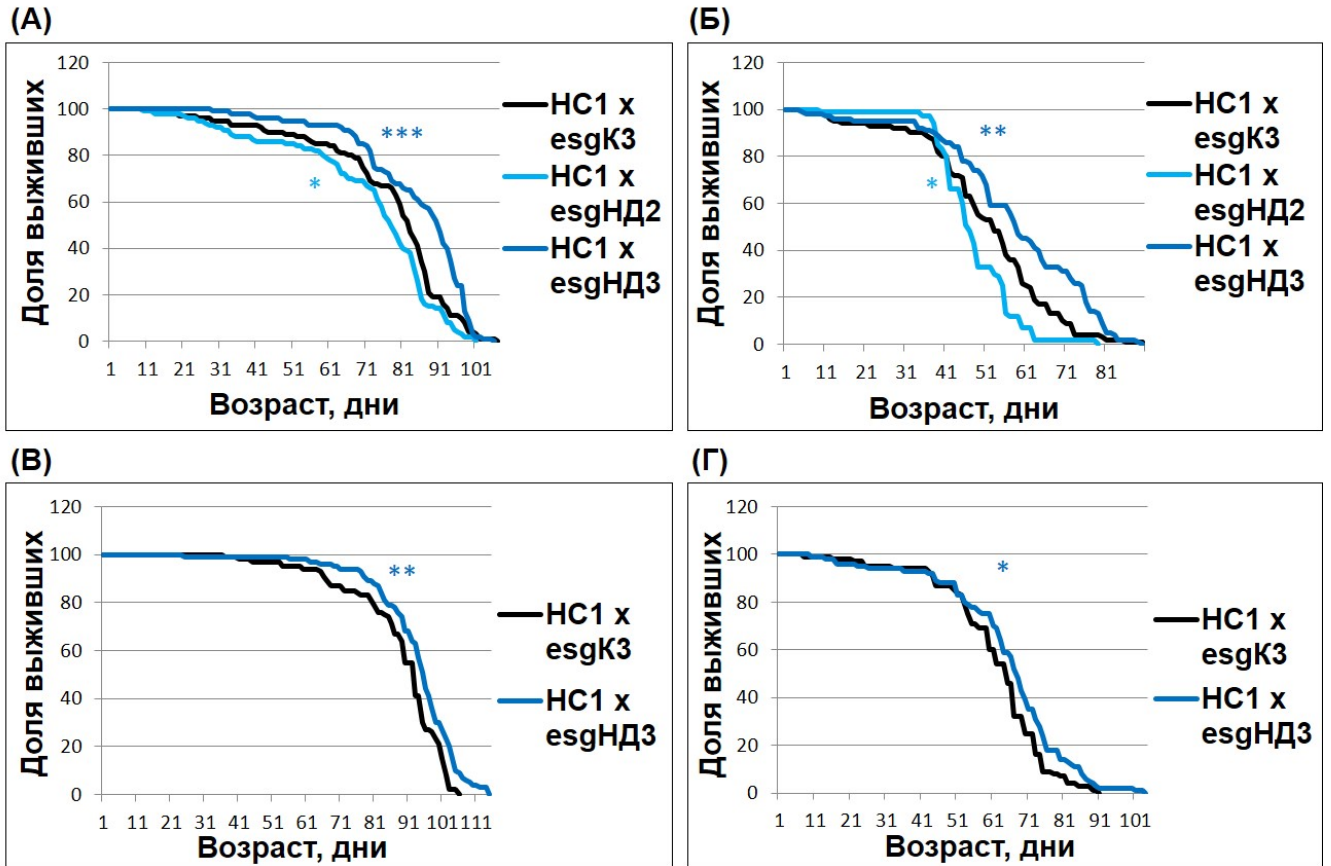


Рисунок 7 — Эффект нейронального снижения экспрессии *esg* на кривых выживания. (А, В) — девственные самки. (Б, Г) — девственные самцы.

Проведенные нами экспериментальные воздействия демонстрируют, что эффект нейронального нокадауна *esg* на продолжительность жизни может быть разнонаправленным, и, как можно предположить, зависящим от конкретного изменения экспрессии *esg*, индуцируемого с помощью разных конструкций, вызывающих РНК-интерференцию. Можно было бы предположить, что более слабый нокадаун важного консервативного регулятора развития *esg* более благоприятен для выживания и долгой жизни дрозофилы, и тогда, в соответствии с выявленными эффектами, сила нокадауна должна соотноситься, как $esgHD1 > esgHD2 > esgHD3$, от максимально вредного и с наибольшим снижением экспрессии до самого полезного с минимальным снижением экспрессии. Но,

согласно известным по данным сток-центра BDSC характеристикам линий, сила нокдауна должна соотноситься как $esg^{HD3} > esg^{HD2}$, что приводит нас, возможно, к более сложной гипотезе, согласно которой максимально полезен может быть промежуточный по силе уровень снижения экспрессии, аналогично уже показанному в исследованиях другого нейронального гена, *Lim3* [Rybina, Pasyukova, 2010]. Таким образом, несмотря на то, что очень низкий даже в норме уровень экспрессии *esg* в нервной системе как эмбриона, так и имаго не позволяет нам однозначно идентифицировать его после нокдауна, эксперименты с тканеспецифическим нокдауном прямо подтверждают возникшую у нас при изучении инсерционной мутации гипотезу о том, что для максимального продления жизни дрозодилы полезен определенный, возможно, достаточно существенный, уровень снижения экспрессии *esg* в нервной системе.

4.1.2 Обсуждение результатов

4.1.2.1. *esg* влияет на продолжительность жизни дрозодилы

В данном исследовании мы продемонстрировали, что встройка трансгенной конструкции $P\{GT1\}$ в район, прилежащий к 3' концу гена *esg*, кодирующего транскрипционный фактор типа Snail, увеличивает срок жизни путем замедления старения имаго. При этом максимальный эффект в наших экспериментах данная инсерция оказывала на девственных самцов, и меньший – на девственных самок или скрещенных самцов. Также подтверждением ранее выдвинутого предположения о причинно-следственной связи между данной мутацией и продолжительностью жизни [Magwire и др., 2010] служат наши данные, согласно которым точная реверсия мутации до геномной последовательности контрольной линии

восстанавливает контрольный фенотип у мух, независимо от пола. Тем не менее, для окончательного подтверждения участия гена *esg* в контроле продолжительности жизни, представляется важным также выяснить, влияет ли встройка на функцию именно данного конкретного гена. Анализ микрочипов не выявил достаточно значимых изменений в уровне его экспрессии в линии с инсерцией, что, вероятно, объясняется техническими ограничениями данного метода [Magwire и др., 2010]. Однако мы с помощью метода количественной ПЦР доказали снижение количества мРНК *esg* в линии с мутацией, что подтверждает непосредственную связь именно экспрессии этого гена с механизмом, продляющим жизнь взрослых особей. Этот результат впервые принципиально доказывает участие исследуемого нами гена *esg* в механизмах контролирующих продолжительность жизни дрозофилы.

Теоретически возможным остается вариант влияния изученной нами инсерции *P{GT1}* на транскрипцию еще какого-то, более далеко расположенного от нее, чем *esg*, гена. Однако, как показывает широкий анализ регуляторных последовательностей генома дрозофилы [Kvon и др., 2014], подавляющее их большинство оказывает влияние именно на ближайший расположенный рядом с ними ген, и только в 12% случаев на следующий за ним, более отдаленный, тем более на несколько генов одновременно, что делает эту гипотезу маловероятной, хотя и полностью не исключаемой. Еще одной особенностью места описываемой инсерции, является то, что другой, кроме *esg*, ближайший к ней ген находится на два порядка дальше, это ген *CG15258* на расстоянии около 27 т.п.н., достаточно плохо изученный и экспрессирующийся преимущественно на стадии куколки и имаго (<http://flybase.org/reports/FBgn0032563.html>).

Из нескольких инсерционных мутаций *esg* только исследованная в данной работе мутация привела к продлению жизни. Следует отметить, что разница эффектов может быть обусловлена неизвестными нам неаллельными

взаимодействиями с другими генами, поскольку генетическое окружение продляющей жизнь мутации *esg* отличалось от генетического окружения других мутаций [Magwire и др., 2010]. Например, влияние хорошо изученного гена супероксиддисмутазы на продолжительность жизни сильно зависят от вариантов генетического окружения, в котором он оказывается [Spencer и др., 2003]. *Esg*, являясь важным регулятором развития, также с большой вероятностью может взаимодействовать с другими генами в каскадах генетической регуляции.

Мы продемонстрировали, что специфическое изменение экспрессии *esg* в нейронах может продлить жизнь имаго дрозофилы, подтверждая значение в этом именно нейрональных процессов, которые он регулирует. Показано, что при нейрональной сверхэкспрессии *esg* у личинок дрозофилы его вероятными мишенями являются около 100 различных генов, в частности, участвующих в продукции нейропептидов, трансмембранных помп и белков иммунного ответа [Hekmat-Safe, Dang, Tanouye, 2005]. В их числе, возрастает экспрессия двух генов, доказано контролирующих продолжительность жизни дрозофилы: гена, кодирующего белок теплового шока 26 (*hsp26*), и гена, кодирующего NAD-зависимую метилентетрагидрофолат дегидрогеназу (*Nmdmc*) [Wang, Kazemi-Esfarjani, Benzer, 2004; Yu и др., 2015]. Неясно, влияет ли снижение экспрессии *esg* на транскрипцию аналогичного пула генов и активирует ли повышение или снижение экспрессии *esg* не у личинок, на других стадиях развития, в том числе у взрослых особей, те же самые гены-мишени. Можно ожидать, что если нокдаун *esg* повлияет на транскрипцию *hsp26* и *Nmdmc*, то в противоположную сторону, уменьшая их транскрипцию. Это заставляет предположить, что к наблюдаемому нами увеличению продолжительности жизни при нокдауне *esg* могут приводить другие, не идентифицированные белки-мишени и регуляторные каскады.

Поскольку для экспериментального продления жизни имаго дрозофилы мы применяли паннейрональное снижение экспрессии *esg*, можно предположить, что

наблюдаемые эффекты вызваны как тотальным снижением уровня мРНК *esg* в нервной системе на всех стадиях жизненного цикла, так, возможно, и специфическим изменением экспрессии этого гена в отдельных группах нейронов на определенных стадиях развития. Как мы уже упоминали, у имаго нормальная экспрессия *esg* крайне низка и имеет место в головах и периферических нейронах (<http://flybase.org/reports/FB1c0003498.html>), а дальнейший нокдаун, вероятно, снижает ее в нервной ткани взрослых мух до минимального уровня. Наши результаты показывают, что такое снижение не приводит к отрицательным последствиям. Возможно, это объясняется тем, что у имаго *esg* не имеет жизненно важных нейрональных функций, по крайней мере, пока такие функции в научной литературе не описаны. Известно, что важнейшая нейрональная функция *esg* и других близких регуляторов развития заключается в контроле эмбриональной дифференциации нейробластов. *Esg* участвует в работе двух различных высококонсервативных регуляторных механизмов [Ashraf, Ip, 2001; Cai и др., 2001; Cai и др., 2003; Wodarz, Huttner, 2003]. Один функционирует на протяжении всего митоза и контролируется генами *inscuteable* и *string*, другой действует во время анафазы/телофазы и не зависит от *inscuteable*. Также есть данные о других возможных путях контроля нейрогенеза, опосредованного *esg* (<https://www.sdbonline.org/sites/fly/gene/escargot.htm>, [Hartl и др., 2011; Kim и др., 2015, Ramat и др., 2016]). Можно предположить, что именно снижение транскрипции *esg* во время развития, в частности, на эмбриональной стадии, во всех эмбриональных клетках в результате мутации или в эмбриональных нейронах и их предшественниках в результате нокдауна, имеет значение для продолжительности жизни. Эту гипотезу косвенно подкрепляют данные о том, что эктопическая нейрональная экспрессия *esg* является супрессором судорог у имаго, и для влияния на взрослый фенотип *esg* должен экспрессироваться именно во время развития нервной системы [Некmat-Scafe и др., 2005].

В наших экспериментах тотальное, обусловленное инсерционной мутацией снижение транскрипции *esg* имеет больший эффект на продолжительность жизни, чем специфически нейрональное, и это может быть связано с вкладом изменения транскрипции гена также в других тканях и органах. Кроме нервной системы, возможными органами-кандидатами, в которых происходит потенциально влияющая на взрослый фенотип экспрессия *esg*, могут быть кишечник дрозофилы на протяжении всего онтогенеза и семенники у взрослых самцов (<https://www.sdbonline.org/sites/fly/gene/escargot.htm>). Наиболее выраженная транскрипция *esg* наблюдается в нескольких тканях – в нервной системе эмбрионов и личинок, в желудочно-кишечном тракте на всех стадиях развития и в семенниках взрослых особей (<http://www.flymine.org/flymine/report.do?id=1040284&trail=%7c1040284>). Особенно важными в последние годы считаются функции *esg* в стволовых клетках кишечника и семенников [Loza-Coll и др., 2014; Voog и др., 2014; Loza-Coll, Jones, 2016]. Желудочно-кишечный тракт многоклеточных животных недавно был признан органом, критически важным для контроля гомеостаза, продолжительности жизни и старения [Jasper, 2015]. Во взрослом среднем кишечнике *Esg* экспрессируется в стволовых клетках, и потеря *Esg* приводит к их быстрой дифференцировке, в то время как увеличение экспрессии *Esg* фиксирует в клетках кишечника недифференцированное, стволовое состояние [Loza-Coll и др., 2014; Korzelius и др., 2014]. Таким образом, *Esg* является основным репрессором, определяющим, останутся ли стволовые клетки недифференцированными или приступят к дифференцировке. Это позволяет нам выдвинуть гипотезу о том, что экспериментальное снижение транскрипции *esg* у особей мутантной линии *esg[BG01042]* может сдвинуть равновесие в направлении более массового образования новых дифференцированных клеток, замедляя связанное с возрастом снижение функций кишечника дрозофилы, и репродуктивной системы самцов –

последняя особенность вполне может объяснять более выраженный эффект мутации, продляющий жизнь у самцов по сравнению с самками. Также это могло бы объяснить меньшее влияние мутации на скрещивающихся самцов, у которых вследствие естественного расходования сперматозоидов независимо активируется их продукция.

4.1.2.2. Роль 3' регуляторной области в модуляции транскрипции *esg*

Базовые процессы развития, функционирования и старения организма зависят от экспрессии генов, регулирующих онтогенез. Мы продемонстрировали, что снижение количества транскрипта *esg*, вызванное вставкой векторной конструкции на расстоянии 602 п.н. от конца гена *esg* и 1240 п.н. от 3'-конца его экзона снижает смертность, вероятно, в результате замедленного старения взрослых особей. Данная инсерция отстоит от промоторной и структурной частей *esg*, более того, по нашим данным, фенотипический эффект и количество мРНК практически независимы от ее длины и структуры (в пределах от 32 п.н. до более чем 8 т.п.н.), что усложняет понимание возможного механизма влияния инсерции на продукцию и стабильность мРНК. Скорее всего, на экспрессию *esg* влияет нарушение нормальной геномной последовательности, а не свойства вставленного фрагмента. Действительно, проведенный нами поиск возможных мотивов цис-регуляторных элементов (промоторов, сайтов связывания транскрипционных регуляторов), находящихся в этой области, при помощи нескольких программ с различными актуальными базами данных для насекомых и дрозофилы (в частности, PROMO 3.0.2 (Alggen), Tfsitescan (IFTI-Mirage), Tomtom 5.5.3 (MEME Suite) и NNPP 2.2 (BDGP)), показал, что 32-нуклеотидная инсерция не содержала таких сайтов, а также не изменяла существовавшие и не создавала новые в 3'-окружении *esg*.

Пока не совсем понятно, каким образом последовательности, расположенные в 3'окружении генов, влияют на их транскрипцию [Pance, 2013]. Эnhансеры способны оказывать свое воздействие на больших расстояниях и в любую сторону [Schaffner, 2015]. Они функционируют как интегрированные платформы для связывания транскрипционных факторов [Spitz, Furlong, 2012], формируют особые регионы хроматина [Calo, Wysocka, 2013] и таким образом могут обеспечивать эпигенетический перенос паттерна активации в геноме между стадиями развития [Schuettengruber и др., 2007], что, в частности, может объяснять предполагаемый нами перенос влияния изменений транскрипции в ходе нейрогенеза на фенотип имаго.

Если рассматривать возможное нарушение целостности мотивов связывания гипотетических белков, следует учесть наличие в данном районе предсказанного проектом modENCODE возможного сайта связывания транскрипционного фактора Dorsal (TFBS_dl_003109), который может взаимодействовать с дистальным энхансером РНК-полимеразы II [Bhaskar, Courey, 2002].

Краткий анализ при помощи программы PROMO 3.0.2 (Alggem) более широкого региона, позволил обнаружить на расстоянии до 250 п.н. от сайта инсерции $P\{GTI\}$ несколько возможных мотивов узнавания для пяти различных транскрипционных факторов, потенциально влияющих на нейро- и синаптогенез, а также трех регуляторов развития половой системы, влияющих на поведение и фертильность самцов. Среди прочих, особого внимания заслуживает Doublesex (DSX), поскольку было показано, что в жировом теле регуляторная область, включающая сайт связывания DSX и расположенная в 3' области гена на расстоянии 8000 п.н. от его начала, может регулировать его экспрессию [Garabedian и др., 1986], то есть демонстрирует свойства энхансера. Можно предположить, что вставка нарушает взаимное расположение нескольких мотивов связывания белков, кооперативно регулирующих транскрипцию гена *esg*.

Также мы нашли 10 возможных мотивов связывания белков системы Polycomb/Trithorax Response Elements (PRE/TRE), в том числе, Zeste, однако плотность их в этом регионе была ниже ожидаемой и необходимой для предказания существования PRE/TRE [Ringrose, Paro, 2007]. Следует отметить, что мотив узнавания Zeste функционирует как энхансер у улитки [Fuse и др, 1999].

Согласно базе данных REDfly [<http://redfly.ccr.buffalo.edu/>; Gallo и др., 2010], в 3' направлении от интересующего нас сайта встройки $P\{GT1\}$ было обнаружено несколько цис-регуляторных модулей (CRM). Один из них, CRM *esg_MLC2*, локализованный на расстоянии 2040 пн от встройки [Halfon, 2014], активирует экспрессию ряда нейрональных генов в глии и клеточной линии нейробластов [Long и др., 2014]. Смещение этого мотива на большее расстояние от гена *esg* могло бы снизить его активацию в процессе нейрогенеза, аналогично нашей гипотетической модели. Такой эффект кажется полностью ожидаемым в случае крупной вставки размером 8500 п.н.; однако, чтобы допустить такой же эффект небольшой вставки размером 32 пн, придется предположить, что конкретное место ее встройки очень важно с точки зрения влияния на функциональность CRM *esg_MLC2*.

Возможны и другие механизмы, обуславливающие участие 3' окружения *esg* в контроле его транскрипции, например, сдвиг нуклеосом или другие виды ремоделирования хроматина. Необходим тщательный биоинформатический и экспериментальный анализ этого региона, чтобы пролить свет на регуляторные свойства последовательностей ДНК, расположенных в 3' области гена *esg*.

4.2. Влияние гена *shuttle craft* на продолжительность жизни *D. melanogaster*

Первоначальное общее описание структуры и биологической роли *stc* выполнено достаточно давно [Stroumbakis, Li, Tolia, 1996; Tolia, Stroumbakis, 1998], но более глубокое понимание его функций требует дальнейшего изучения. Он расположен во 2-й хромосоме генома дрозофилы и содержит пять экзонов и четыре интрона, образуя четыре потенциальных транскрипта (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/34888>). *Stc* имеет большой набор функциональных доменов, обеспечивающих разнообразие его функций и узнавание последовательностей ДНК (характеризующий все семейство транскрипционных факторов домен NF-X1, обуславливающий гомологию с одноименным регулятором иммунного ответа и воспаления у человека [Song и др., 1994]), домены, связывающие РНК (RD), однонитевые нуклеиновые кислоты (R3H), двуниевую ДНК (ZF_NF-X1), белки (ZF_RING)). Важный регулятор развития, *Stc* необходим на всех стадиях развития дрозофилы. Он активно нарабатывается в яичниках взрослых самок, обеспечивая стартовый запас для нормальной сегментации эмбриона [Tolia, Stroumbakis, 1998]. Во второй половине эмбриогенеза начинается эндогенное производство *Stc*, который регулирует нейрогенез, в частности, окончательное формирование брюшной нервной цепочки и наведение аксонов мотонейронов. Таким образом, при нарушении материнской продукции *Stc* в яичниках, эмбрионы имеют серьезные нарушения развития и сегментации, а при серьезном нарушении собственной эмбриональной экспрессии на этапе нейрогенеза образующиеся личинки с нарушениями структуры нервной системы и мышечной иннервации не могут покинуть яйцо [Stroumbakis, Li, Tolia, 1996].

4.2.1 Полученные результаты

4.2.1.1. Мутация *stc*[KG01230] увеличивает продолжительность жизни девственных самок

В нашем исследовании потенциальных механизмов влияния *stc* на старение и продолжительность жизни дрософилы мы использовали мутантную линию *w*[1118]; *P*{*SUPor-P*}*stc*[KG01230] (*stcP*), имеющую в 5'-нетранслируемой области вставку Р-элементного вектора *P*{*SUPor-P*}. Как контрольная линия без инсерции была использована рекомендованная производителем ко-изогенная ей *w*[1118] (*stcK1*). Для точного определения фенотипических эффектов продолжительность жизни мух *stcP* и *stcK1* измеряли в нескольких разных экспериментах. Продолжительность жизни мутантных и контрольных девственных самок и самцов была измерена в трех независимых экспериментах, проведенных Н. В. Рошиной и представленных в ее диссертации. Продолжительность жизни самок *stcP* была значительно больше, чем у контрольных особей (табл. 4 в Приложении, рис. 8А), тогда как у самцов этот эффект не был выявлен. Увеличение продолжительности жизни самок *stcP* и отсутствие эффекта у самцов было несколько раз подтверждено в данной работе (табл. 4 в Приложении, рис. 8Б, рис. 9А, Б, рис 10А, Б). В связи с исследованием гена *esg* мы уже упоминали, что зависимое от пола влияние различных факторов и генов на продолжительность жизни встречается достаточно часто. И если наше более углубленное исследование показало, что мутация *esg*[BG01042] влияет на продолжительность жизни и самцов, и самок, то повторение ранее проведенных опытов с мутацией *stc*[KG01230] укрепило вывод о том, что она специфически затрагивает только продолжительность жизни самок. С сохранением положительного эффекта во всех опытах в течение ряда лет, мутантные девственные самки жили дольше контрольных от 22 до 96% (на 55% в

среднем), с максимальной продолжительностью жизни, увеличенной на 40% (см. табл. 4 в Приложении), при этом анализ структуры кривых выживания (см. рис. 8А, рис. 9А, рис 10А) демонстрирует снижение скорости старения. Ранее, чтобы подтвердить причинно-следственную связь между возникновением мутации и изменением продолжительности жизни, в лаборатории геномной изменчивости были получены ко-изогенные линии с реверсиями *stc*[*KG01230*] [Рощина, 2008]. Мы описали структуру полученных реверсий.

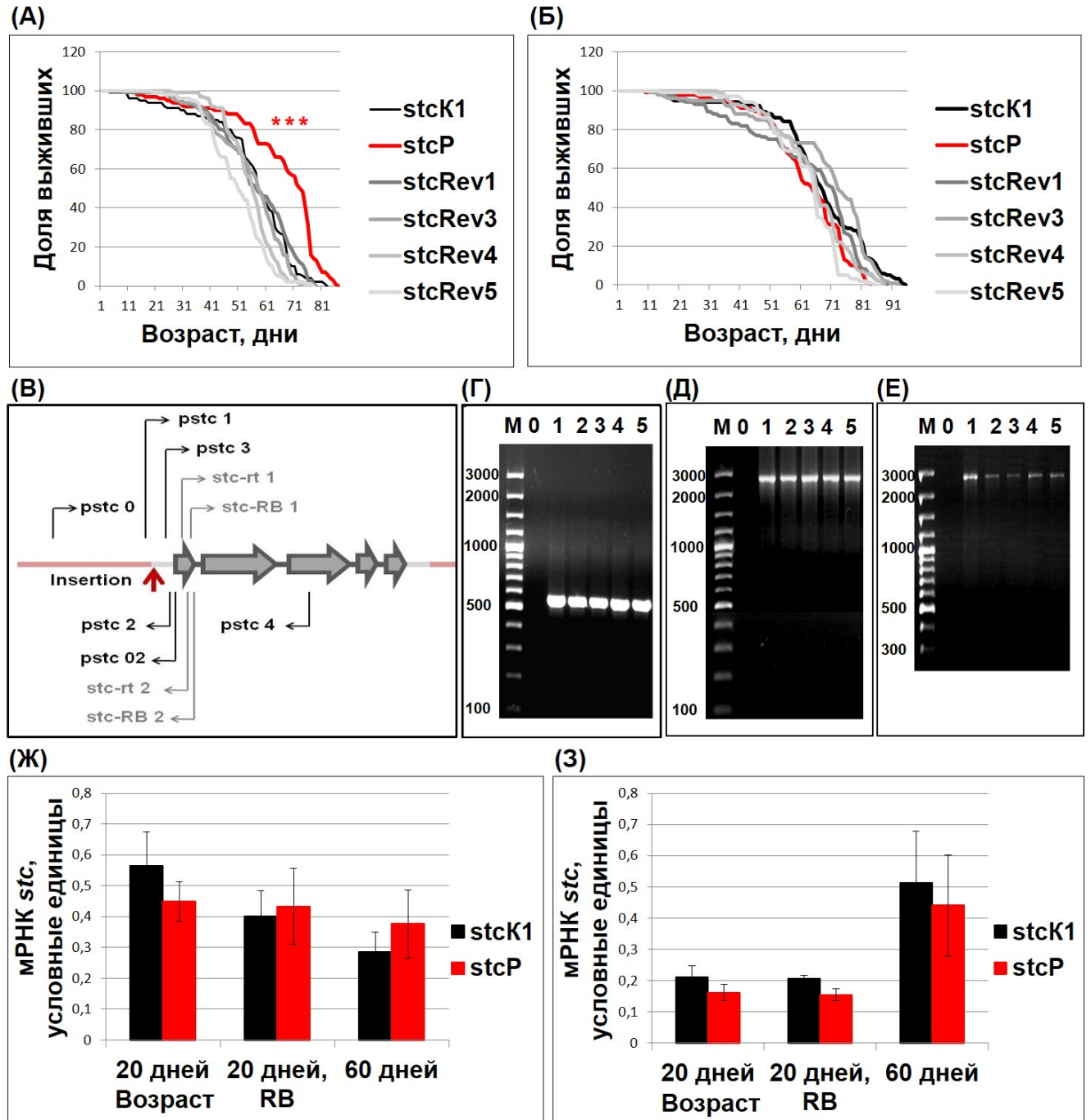


Рисунок 8 — Влияние мутации *stc[KG01230]* и ее реверсий на продолжительность жизни девственных самок и самцов, структуру гена и его экспрессию. (A) – кривые выживания девственных самок (результаты этих опытов входят в диссертационную работу Рощиной Н. В., 2008). (Б) – кривые выживания девственных самцов. (В) - карта гена *stc*. Серые стрелки: экзоны; черные участки:

интроны; серые участки: нетранслируемые области; розовые участки: окружающие последовательности; красная стрелка: место инсерции $P\{SUPor-P\}$; черные стрелки: фланкирующие район праймеры для проверки длин фрагментов; серые стрелки: праймеры, использованные для определения экспрессии *stc*. (Г) - ПЦР с праймерами pstc1 и pstc2, ожидаемый в stcK1 размер продукта 555 пн. (Д) - ПЦР с праймерами pstc0 и pstc02, ожидаемый в stcK1 размер продукта 2508 пн. (Е) - ПЦР с праймерами pstc3 и pstc4, ожидаемый в stcK1 размер продукта 2562 пн. М – маркер (GeneRuler™ 100 bp Mass DNA Ladder, Fermentas); 0 – stcP (отрицательный контроль, ожидаемый ПЦР-продукт размером около 11 тпн не образуется при использованных условиях ПЦР); 1 – stcK1; 2 - stcRev1; 3 - stcRev3; 4 - stcRev4; 5 - stcRev5. (Ж) – количество суммы транскриптов *stc* и транскрипта *RB* у самок разного возраста. (З) – количество суммы транскриптов *stc* и транскрипта *RB* у самцов разного возраста.

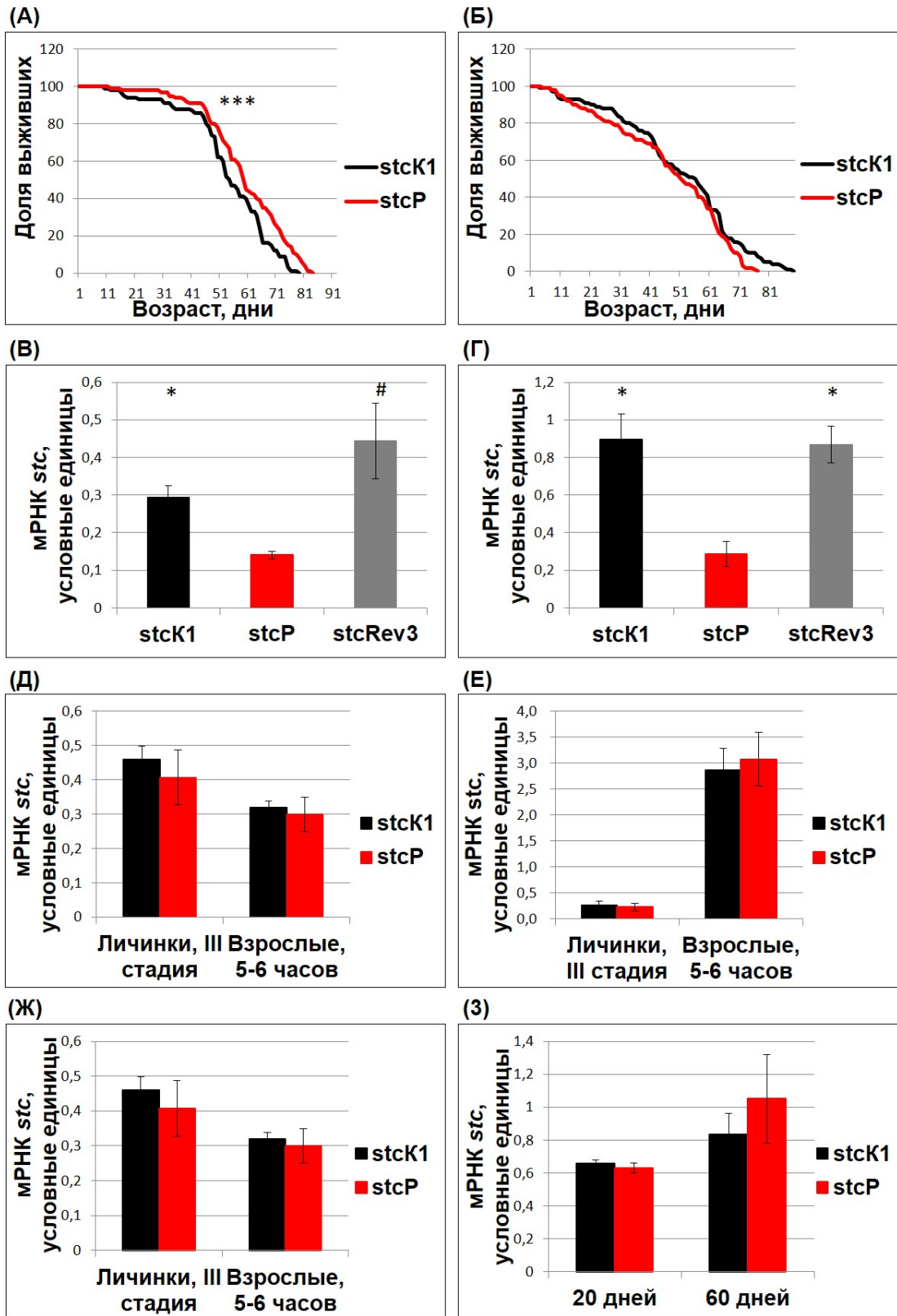


Рисунок 9 — Влияние мутации *stc[KG01230]* и ее реверсий на экспрессию гена *stc* у самок. (А) – кривые выживания девственных самок. (Б) – кривые

выживания девственных самцов. (В) – количество суммы транскриптов *stc* в целых личинках и девственных самках. (Г) – количество суммы транскриптов *stc* в мозге личинок и девственных самок. (Д) – количество суммы транскриптов *stc* в яичниках девственных самок разного возраста. (Е) – количество суммы транскриптов *stc* в яичниках скрещивавшихся самок разного возраста. (Ж, З) – количество суммы транскриптов *stc* в эмбрионах. Достоверность отличия от *stcP*, тест Краскела-Уоллеса: # - $P < 0,10$; * - $P < 0,025$ (с учетом коррекции Бонферрони).

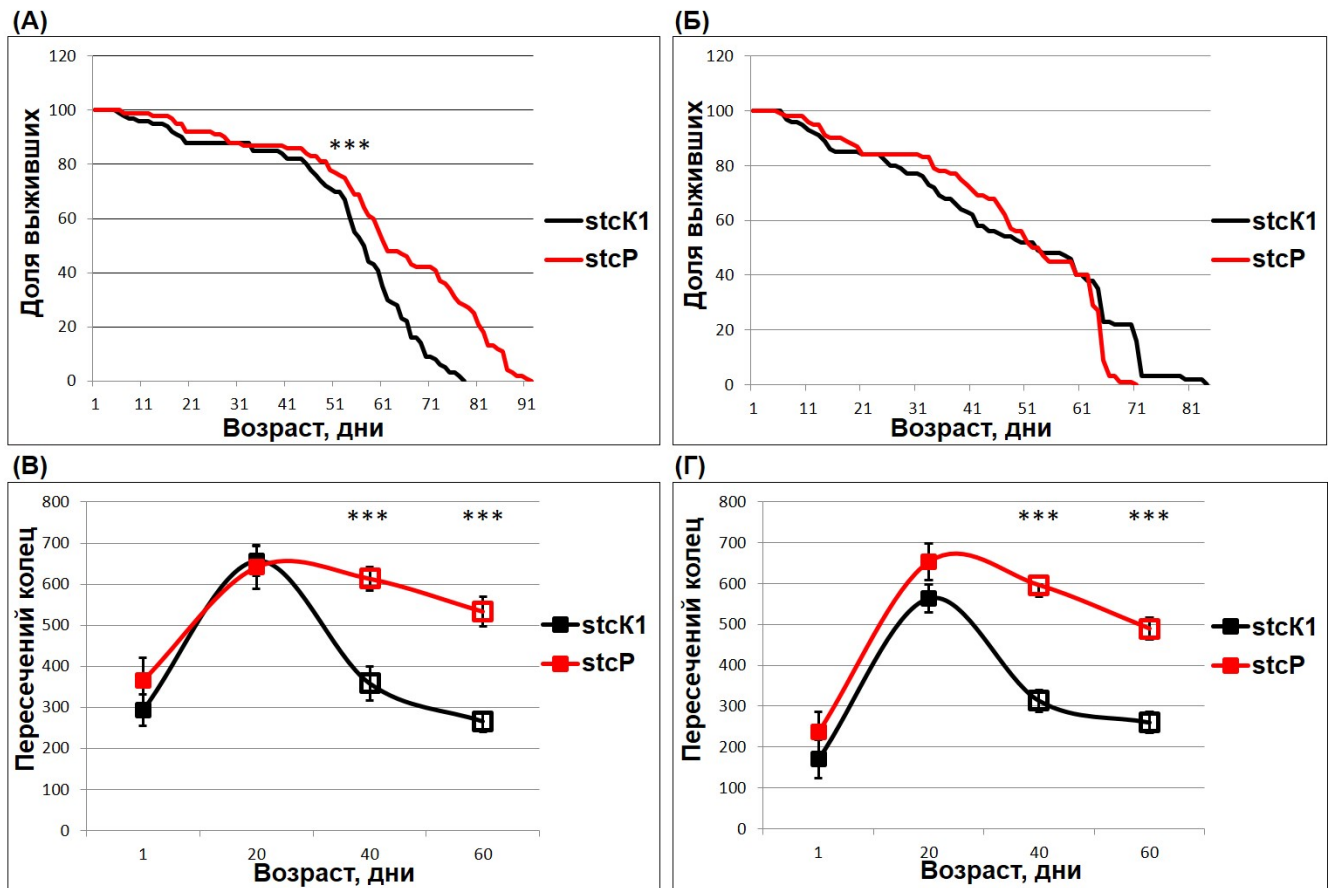


Рисунок 10 — Влияние мутации *stc[KG01230]* на продолжительность жизни и на подвижность мух. (А) – кривые выживания девственных самок. (Б) – кривые выживания девственных самцов. (В) – подвижность девственных самок разного возраста в горизонтальной плоскости. (Г) – подвижность девственных самок разного возраста в вертикальной плоскости. Достоверность отличия от *stcK1*, тест Краскела-Уоллеса: *** - $P < 0,001$.

Всего было получено четыре линии с реверсиями (stcRev1, stcRev3, stcRev4, stcRev5). В каждой линии для оценки природы реверсий использовали ПЦР с праймерами, фланкирующими сайт встройки векторной конструкции $P\{SUPor-P\}$, вызвавшей мутацию (рис 8В). Длины ПЦР-продуктов в линиях с реверсией полностью соответствовала контрольным (рис. 8Г), при секвенировании их последовательности оказались идентичны нормальной геномной последовательности контрольной линии (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/34888/>). Все это подтверждает полную реверсию структуры гена во всех четырех полученных нами линиях. Для проверки возможного возникновения aberrаций в окружающем инсерцию регионе во всех линиях мы провели дополнительную амплификацию более широких окрестностей, по два фланкирующих место вставки ПЦР-фрагмента размером около 2,5 т.п.н. Во всех линиях длины продуктов соответствовали контрольным (рис. 8Д, Е). Эти данные подтверждают, что во всех четырех линиях с реверсией Р-элементный вектор был вырезан чисто, без возникновения вторичных мутаций, и было достигнуто полное восстановление исходной генной структуры.

Продолжительность жизни самок с реверсиями была измерена ранее и оказалась такой же, как у самок контрольной линии ([Рощина, 2008]; рис. 8А). Измеренные продолжительности жизни самцов двух ревертантных линий, stcRev4 и stcRev5, полностью соответствовали таковым контрольной и мутантной линий. Продолжительности жизни самцов stcRev1 и stcRev3 значительно отличались от таковой у самцов мутантной линии (см. табл. 4 в Приложении, рис. 8Б) вследствие флуктуаций структуры кривых выживания, но не меняющейся продолжительности жизни. Полученные результаты окончательно подтвердили, что реверсия мутации сопровождалась реверсией мутантного фенотипа, и

доказали причинно-следственную связь между мутацией и изменением продолжительности жизни.

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

Чтобы идентифицировать молекулярные механизмы, определяющие изменение продолжительности жизни под влиянием инсерционной мутации *stc[KG01230]*, мы измерили методом ОТ-кПЦР количество мРНК основных транскриптов *stc* (см. табл. 4 в Приложении). Для *stc* известно четыре транскрипта, два основных (RA и RB, отличающиеся на 21 п.н. в первом экзоне) показаны экспериментально (<https://www.alliancegenome.org/gene/FB:FBgn0001978>). Мы оценили общее количество транскриптов *stc* у 20-дневных и 60-дневных девственных самок и самцов. Измеренная нами относительная нормализованная экспрессия *stc* в контрольных и мутантных линиях полностью совпадала у девственных самок (см. табл. 5 в Приложении, рис. 8Ж) и самцов (см. табл. 5 в Приложении, рис. 8З), независимо от возраста и пола. Аналогично она не отличалась при дифференциальном определении только экспрессии *stc*-RB (см. табл. 5 в Приложении, рис. 8Ж, 3). Поскольку, в отличие от *stc*-RB, мРНК *stc*-RA не имеет уникальной, отличающей ее последовательности, мы заключили, что количество ее также не изменяется, исходя из неизменной относительной экспрессии как одного *stc*-RB, так и суммы двух этих транскриптов. Сделав этот вывод, в дальнейшем мы измеряли относительную экспрессию суммы транскриптов *stc*, при этом только у самок, поскольку фенотип самцов с мутацией *stc[KG01230]* во всех наших экспериментах не отличался от контрольного.

Согласно транскрипционному профилю modENCODE (<https://flybase.org/reports/FB1c0000085.html>), максимальная экспрессия *stc* из всех

стадий развития дрозофилы приходится на эмбриогенез, по крайней мере до 18 часов развития, и тогда же, по-видимому, функциональное значение этого регулятора развития максимально. Поскольку известно, что высокие концентрации *Stc* в первой половине эмбриогенеза объясняются материнским эффектом, значение собственной его эндогенной продукции эмбрионом становится важным только во второй половине эмбриогенеза, и именно тогда он играет важнейшую роль в нейрогенезе [Tolias, Stroumbakis, 1998]. Исходя из этого, мы определили в пилотных экспериментах, что относительная нормализованная экспрессия *stc* ниже в линии с мутацией *stc* P как в первой половине развития (0-12 часов), так и во второй (12-18 часов, что, по-видимому, представляет собой пик эндогенной транскрипции *stc*, наиболее важный для нейрогенеза). При этом во второй половине эмбриогенеза отличия в экспрессии мутантной линии были больше (см. табл. 5 в Приложении). Для того чтобы окончательно подтвердить этот эффект и уменьшить возможный шум от небольших индивидуальных отличий эмбрионов, мы в двух независимых, разнесенных по времени опытах определили относительную нормализованную экспрессию *stc* в максимально широком интервале 0-18 часов, и она также оказалась существенно уменьшенной в мутантных эмбрионах по сравнению с контрольными, в обоих случаях (табл. 5 в Приложении, рис. 9В, Г).

Ген *stc* транскрибируется на более высоком уровне, чем ген *esg*, что дает возможность исследовать количество его транскриптов в разных тканях и органах по отдельности. Кроме того, количество транскриптов *stc* в целых мухах было одинаковым у мутантных и контрольных особей, и было интересно выяснить, не маскирует ли отличие разницы в большей части органов различий, имеющих в каких-то других органах. Наконец, хотелось выяснить, на какой стадии развития исчезают различия, наблюдаемые в эмбрионах. Мы измерили количество транскриптов *stc* в мутантных и контрольных самках на III личиночной стадии, 5-6-часовых самках, яичниках 20-дневных и 50-60-дневных не девственных и

скрещивавшихся самок, мозге личинок III стадии и голове 5-6-часовых самок. Никаких различий между контрольными и мутантными линиями не удалось выявить ни у самок-личинок, ни у 5-6-часовых девственных самок (табл. 5 в Приложении, рис. 9Д), ни у молодых 20-дневных, ни у старых 60-дневных самок (табл. 5 в Приложении, рис. 8Ж). Исходя из важности участия *stc* в нейрогенезе, мы измерили его относительную нормализованную экспрессию в мозге личинок III стадии и головах девственных и скрещенных самок. Различий обнаружено не было (см. табл. 5 в Приложении, рис. 9Е). мРНК *stc* также активно нарабатывается в яичниках для запасания в яйцах [Tolias, Stroumbakis, 1998]. Мы определили, что относительная нормализованная экспрессия *stc* в яичниках как молодых, так и старых самок мутантной линии полностью идентична контрольной экспрессии *stc*, вне зависимости от того, участвовали они в скрещиваниях или нет (см. табл. 5 в Приложении, рис. 9Ж, З). Этот результат позволяет объяснить меньшие отличия, которые мы видим в относительной экспрессии *stc* в первой половине эмбриогенеза – очевидно, отличия в собственном эндогенном синтезе эмбрионов маскирует превосходящее его одинаковое количество заложенной в яйце материнской мРНК.

Важно было также понять, соответствует ли различие и сходство в продолжительности жизни у контрольных, мутантных и ревертантных линий различию и сходству в количестве транскрипта *stc*. Мы сравнили количество транскрипта *stc* в эмбрионах линий *stcK1*, *stcP* и *stcRev3*. Ни в одном из двух опытов не было выявлено существенной разницы между количеством транскриптов *stc* в линиях *stcK1* и *stcRev3*, в то время как линия *stcP* достоверно отличалась от обеих других линий (табл. 5 в Приложении, рис. 9В, Г). Эти результаты свидетельствуют о том, что точная реверсия мутации сопровождалась реверсией уровня транскрипции. Это дает нам серьезные основания утверждать, что снижение транскрипции *stc* лежит в основе уменьшения продолжительности жизни мутантов.

4.2.1.3. Мутация *stc*[KG01230] снижает продолжительность жизни скрещивавшихся самок

Продолжительность жизни мутантных и контрольных скрещивавшихся самок и самцов была измерена в трех независимых экспериментах, проведенных Н. В. Рощиной и представленных в ее диссертации. Продолжительность жизни самок *stcP* была достоверно меньше, чем у контрольных особей (табл. 4 в Приложении, рис. 11А, В, Д, Ж), тогда как у самцов этот эффект не был выявлен. Уменьшение продолжительности жизни самок *stcP* и отсутствие эффекта у самцов было несколько раз подтверждено в данной работе (табл. 4 в Приложении, рис. 11Б, Г, Е, З). У скрещивавшихся самок средний отрицательный эффект мутации составил 15%. Количество транскрипта *stc* у молодых 20-дневных и у старых 60-дневных скрещенных самок, как и ожидалось, было одинаковым в линиях *stcK1* и *stcP* (табл. 5 в Приложении).

Как было показано ранее [Рощина, 2008], реверсии мутации *stc*[KG01230] приводят к реверсии мутантного фенотипа у скрещивавшихся самок (табл. 4 в Приложении, рис. 11А). Мы показали, что и продолжительности жизни самцов в линиях *stcK1*, *stcP*, *stcRev1*, *stcRev3*, *stcRev4*, *stcRev5* не отличаются (табл. 4 в Приложении, рис. 11Б). Эти данные в совокупности еще раз подтверждают существование причинно-следственной связи между мутацией и изменением продолжительности жизни.

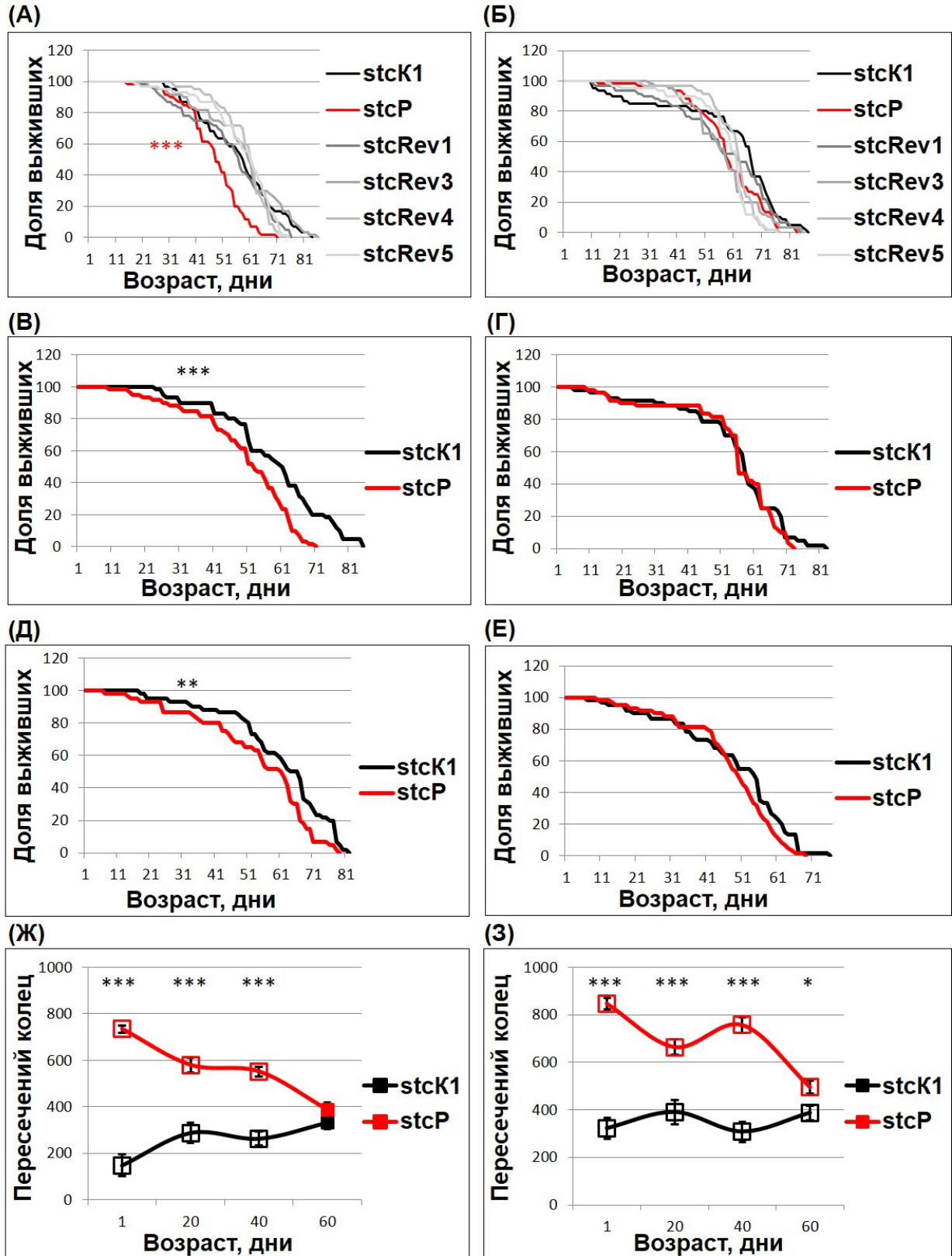


Рисунок 11 — Влияние мутации *stc[KG01230]* на продолжительность жизни и подвижность скрещивавшихся мух. (А, В, Д) - кривые выживания

скрещивавшихся самок (результаты опытов, представленных на панели А, входят в диссертационную работу Рощиной Н. В., 2008). (Б, Г, Е) – кривые выживания скрещивавшихся самцов. (Ж) – подвижность скрещивавшихся самок разного возраста в горизонтальной плоскости. (З) – подвижность скрещивавшихся самок разного возраста в вертикальной плоскости. Достоверность отличия от *stcK1*, тест Краскела-Уоллеса: ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$.

4.2.1.4. Мутация *stc[KG01230]* влияет на подвижность

Мы оценили влияние *stc[KG01230]* на локомоторную активность у девственных и скрещивавшихся самок, чтобы определить, влияет ли мутация на функцию нервной системы и скорость старения. Как у мутантных, так и у контрольных девственных самок локомоторная активность достигала максимума в возрасте 20 дней, а затем снижалась (рис. 10Ж). Различий в подвижности у однодневных и 20-дневных девственных самок обнаружено не было, тогда как подвижность 40-дневных и 60-дневных мутантных самок была значительно выше, чем подвижность 40-дневных и 60-дневных контрольных самок (табл. 6 в Приложении, рис. 10Ж). Мы также измерили подвижность у 40-дневных девственных самок из линии *stcRev3*. Никаких различий по сравнению с контролем обнаружено не было (табл. 6 в Приложении). Эти данные в совокупности указывают на существование причинно-следственной связи между мутацией и изменением подвижности.

Все эксперименты проводились при слабом, равномерном освещении и без механических, световых или других стимулов к движению, чтобы не смазать эффект мутации. Однако теоретически подвижность могла зависеть от направления движения мух. Дрозофила, как и большинство живых существ, обладает гео- и

фототаксисом, двигаясь в вертикально расположенной пробирке вверх. В горизонтальной пробирке движение мух спонтанно, ненаправленно. Тем не менее, в пилотных экспериментах, сравнивая локомоторную активность мух мутантной и контрольной линий, мы не увидели зависимости общей активности линии от расположения пробирок (рис. 11Ж, 3)., Поэтому измерения двигательной активности в обоих вариантах опыта можно рассматривать как независимые повторности. сходство результатов которых дополнительно подкрепляет наше заключение о том, что у девственных самок с увеличенной продолжительностью жизни мутация *stc[KG01230]* способствует также улучшению функционального статуса нервной системы, особенно в старом возрасте. Хорошее функциональное состояние нервной системы и двигательной активности у старых мух мутантной линии (эта характеристика считается в исследованиях одним из наиболее надежных индикаторов процесса старения, в том числе для дрозофилы, см., например, [Jones, Grotewiel, 2011]) подтверждает наш вывод, сделанный на основе анализа кривых выживания, о том, что инсерционная мутация *stc[KG01230]* снижает скорость старения самок в линии *stcP*.

Зависимость подвижности от возраста у девственных и скрещивавшихся контрольных самок оказалась разной. У скрещивавшихся самок подвижность не уменьшалась с возрастом, а в случае движения в горизонтальной плоскости даже увеличилась ($P=0,0184$; рис. 11Ж, 3). Возможно, некоторое возрастание подвижности сопутствует снижению плодовитости, которая будет рассмотрена в следующем разделе, то есть освобождению от физиологических и энергетических ресурсов, которые затрачивались на производство потомков. При этом подвижность мутантных самок уменьшалась, так что у 60-дневных самок подвижность в контроле и опыте оказалась одинаковой. У всех более молодых мутантных самок подвижность была достоверно более высокой, чем у контрольных (табл. 6 в Приложении, рис. 11Ж, 3). Таким образом, несмотря на снижение

продолжительности жизни, функциональное состояние и активность нервной системы у молодых и зрелых мутантных скрещивавшихся самок было выше, чем у контрольных, вплоть до старости. Это может объясняться возникающим при скрещивании неравномерным, с некоторым сдвигом, хронологическим изменением функций и активности отделов нервной системы, влияющих в большей степени на двигательную активность, чем на продолжительность жизни.

4.2.1.5. Мутация *stc/KG01230* влияет на плодовитость самок и жизнеспособность их потомков

Чтобы охарактеризовать связь между продолжительностью жизни и репродуктивной функцией мы измерили у контрольных и мутантных скрещивавшихся самок количество откладываемых яиц и количество взрослых потомков, а также охарактеризовали жизнеспособность этих потомков. Количество яиц, отложенных мутантными самками в возрасте 3 и 40 дней, было значительно ниже по сравнению с контролем (см. табл. 7 в Приложении, рис. 12). Количество яиц, откладываемых 20-дневными самками, отличается заметно, но эта разница в наших экспериментах не достигала порога значимости. Измеренное количество имаго оказалось значительно ниже в потомстве у молодых и зрелых (20- и 40-дневных) самок мутантной линии *stcP*, чем в потомстве у контрольных (см. табл. 7 в Приложении, рис. 12). Старые 60-дневные самки практически не дают потомства стадии имаго, и в этом возрасте общая разница в плодовитости мутантных и контрольных самок практически не определима. Жизнеспособность получаемых от 3-, 40- и 60-дневных самок мутантной линии потомков в интервале от яйца до имаго также оказывается значимо более низкой у мутантов (см. табл. 7 в Приложении, рис. 12). В целом, репродуктивная способность мутантных самок с уменьшенной продолжительностью жизни была также снижена по сравнению с контролем. Таким

образом, наши данные не подтвердили наличие «trade-off» между продолжительностью жизни и репродукцией.

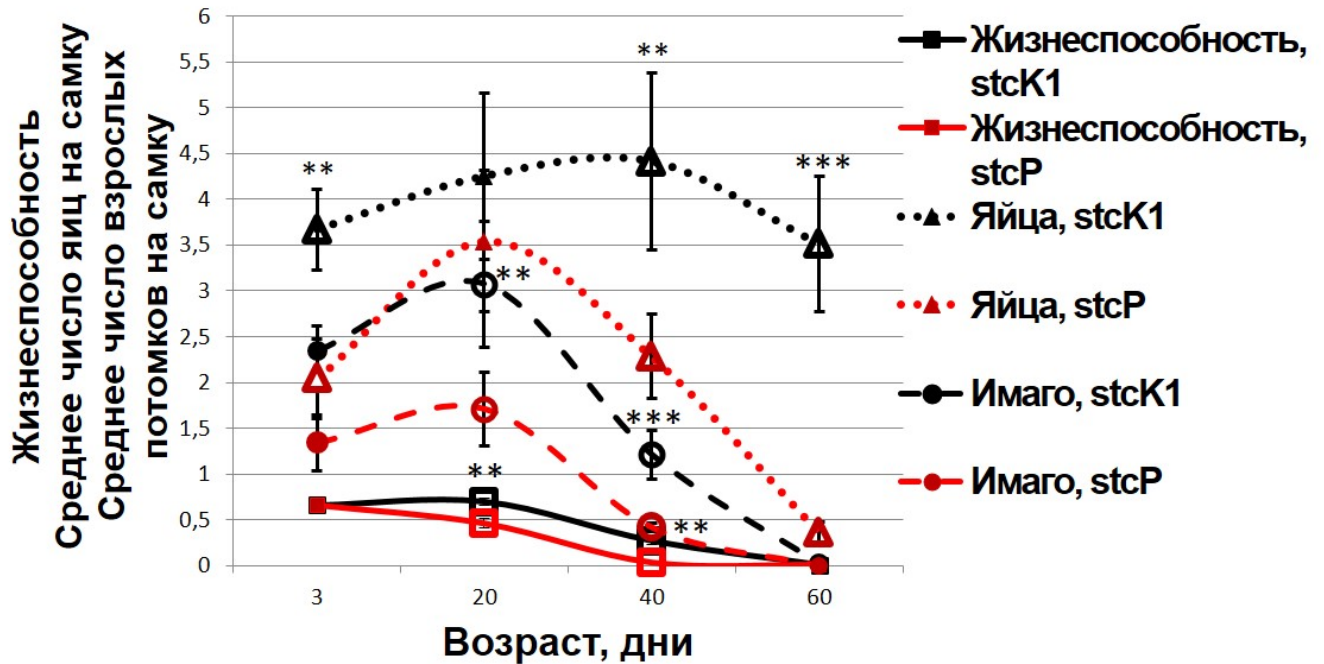


Рисунок 12 — Влияние мутации *stc[KG01230]* на плодовитость скрещивавшихся мух, а также жизнеспособность их потомства. Достоверность отличия от *stcK1*, тест Краскела-Уоллеса: ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$.

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

Было бы важно понять, оказывают ли другие мутации *stc* аналогичное влияние на продолжительность жизни мух. Однако в открытом доступе имеются только две инсерционные мутации, затрагивающие *stc*: *stc[KG01230]*, использованная в данном исследовании, и летальная мутация *stc[05441]*, описанная в [Stroumbakis, Li, Toliás, 1996] и использованная в работе [Pasyukova и др., 2004].

Несмотря на то, что летальный фенотип *stc[05441]* типичен для классических мутаций *stc*, инсерция $P\{SUPor-P\}$, вызвавшая мутацию, на самом деле, как уже было сказано выше, расположена в соседнем гене, *CG15269*. Учитывая это, мы решили, что изучение этой мутации вряд ли поможет лучше понять влияние *stc* на продолжительность жизни. Доступны также две классические летальные мутации *stc*, вызванные этилметансульфонатом и радиацией. Только гетерозиготы по этим мутациям могут быть использованы для анализа продолжительности жизни; кроме того, отсутствуют адекватные контрольные линии для сравнения. В 2018 году появились линии с измененным с помощью CRISPR/Cas9 геном *stc* (<https://flybase.org/reports/FBgn0001978>), однако в ней в ген внесена «метка», позволяющая следить за локализацией его экспрессии. Две другие новые линии были получены аналогичным способом только в 2022 году и пока плохо описаны. В этой ситуации нам представлялось более целесообразным использовать для дальнейшей работы нокдаун *stc*, который может обеспечить снижение количества транскрипта *stc*, сходное со снижением, выявленным в процессе изучения мутации *stc[KG01230]*, в отдельных тканях и на конкретных стадиях развития.

Мы показали, что мутация *stc[KG01230]* увеличивает продолжительность жизни самок дрозофилы, при этом уменьшение экспрессии гена наблюдается только на эмбриональной стадии. Таким образом, изменение работы гена на ранней стадии развития приводит к изменению фенотипа взрослых особей. Для уточнения этого вывода мы изучили эффект, оказываемый эмбриональным нокдауном *stc* на продолжительность жизни имаго.

Для специфического нокдауна, снижающего экспрессию *stc*, была использована линия $w[1118]; P\{GD1543\}v47973$ (*stc*НД) с трансгенной конструкцией, обуславливающей РНК-интерференцию *stc*, и соответствующая контрольная линия (*stc*K2), предложенная производителем. Линии $y[1] w[*]; P\{w[+mW.hs]=en2.4-GAL4\}e22c; P\{w[+mC]=tGPH\}4/ TM3, Ser[1]$ (Эмб1), $w[*];$

$P\{w[+mW.hs]=GawB\}337Y$ (Эмб2) и $w[*]$; $P\{w[+mW.hs]=GawB\}389$ (Эмб3) использовались для индукции экспрессии трансгенных конструкций в эмбрионах (Эмб1, Эмб2) и нервной системе эмбрионов (Эмб3), приводящей к нокдауну *stc*. Гибридные потомки, полученные от скрещивания самок Эмб1, Эмб2 или Эмб3 с самцами *stc*ND или *stc*K2, были использованы для измерения продолжительности жизни.

Нокдаун *stc* в эмбрионах увеличил продолжительность жизни девственных самцов во всех пяти опытах: двух повторных опытах с Эмб1, одном опыте с Эмб2 и двух повторных опытах с Эмб3 (табл. 4 в Приложении, рис. 13Б, Г, Е). Все самцы с эмбриональным нокдауном *stc* характеризовались поздними отличиями кривых выживания и меньшей вероятностью смерти в позднем возрасте со значимыми по тесту Флеминга – Харрингтона отличиями (P от 0,0139 до $<0,0001$). Таким образом, можно предположить, что снижение экспрессии *stc* в эмбрионе специфически снижает скорость старения и оказывает влияние на значимые факторы, обуславливающие смерть особей в позднем возрасте. Суммируя наши данные, можно сделать обоснованный вывод о продляющем жизнь девственных самцов эффекте эмбрионального нокдауна *stc*.

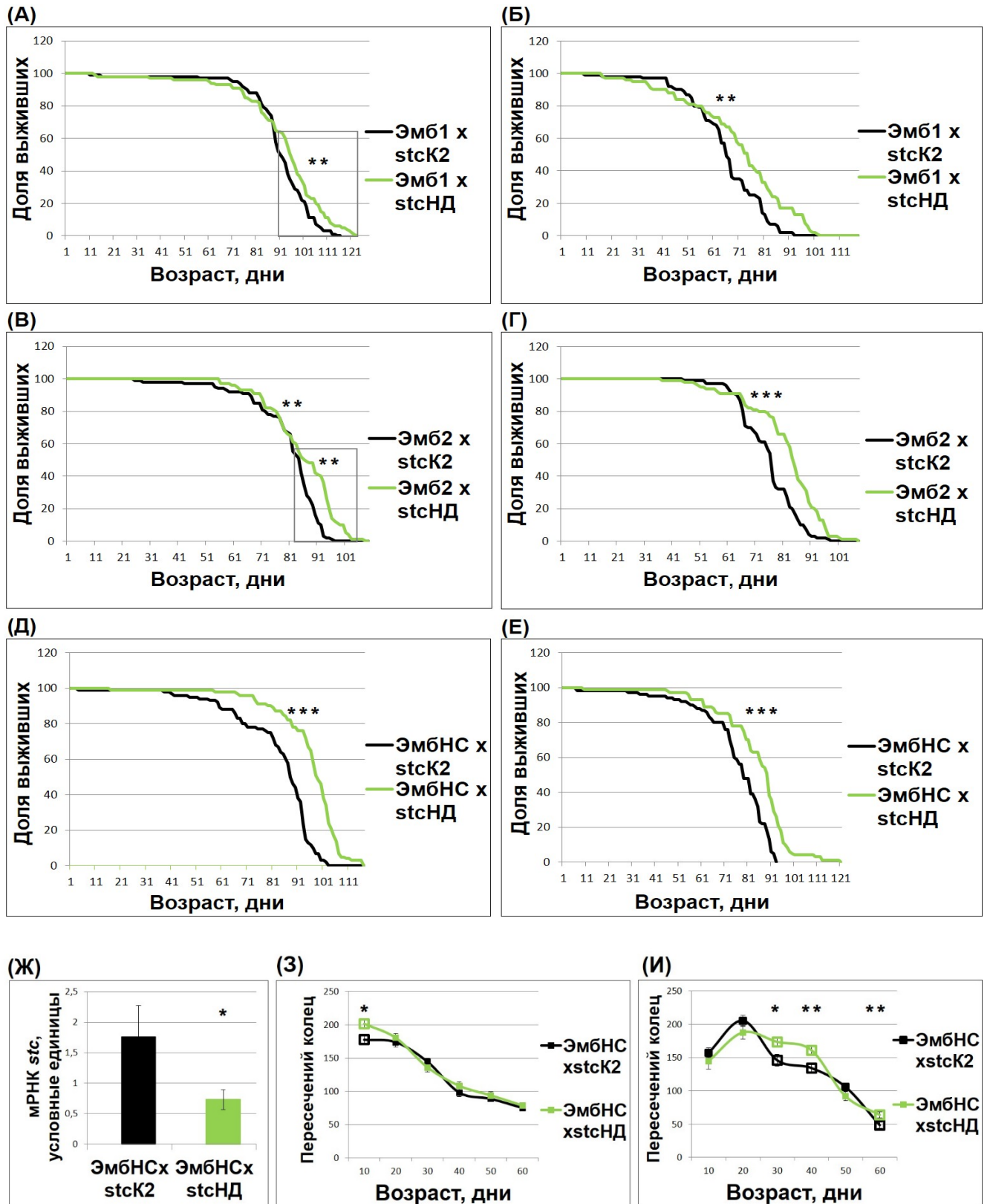


Рисунок 13 — Влияние на продолжительность жизни и подвижность девственных мух снижения эмбриональной экспрессии *stc*. (А, В) – кривые

выживания девственных самок с нокдауном *stc* в эмбрионе. (Б, Г) - кривые выживания девственных самцов с нокдауном *stc* в эмбрионе. (Д) – кривая выживания девственных самок с нокдауном *stc* в нервной системе эмбриона. (Е) - кривая выживания девственных самцов с нокдауном *stc* в нервной системе эмбриона. (Ж) – количество транскрипта *stc* в эмбрионе. (З) – подвижность девственных самок с нокдауном *stc* в нервной системе эмбриона в горизонтальной плоскости. (И) – подвижность девственных самцов с нокдауном *stc* в нервной системе эмбриона в горизонтальной плоскости. Достоверность отличия от *stcK2*, тест Краскела-Уоллеса: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$.

Нокдаун *stc* в эмбрионах увеличил среднюю продолжительность жизни девственных самок в двух из пяти опытов: одном опыте с Эмб2 и одном опыте с Эмб3 (табл. 4 в Приложении, рис. 13А, В, Д). Но при анализе кривых выживания видно, что риск смерти снижается в позднем возрасте во всех случаях (P от 0,0112 до $< 0,0001$ по тесту Флеминга – Харрингтона). Это позволяет сделать вывод о том, что эмбриональный нокдаун *stc* повышает максимальную продолжительность жизни девственных самок.

Влияние на продолжительность жизни и половая специфичность эффектов не зависела от того, где именно был индуцирован нокдаун *stc* – в целых эмбрионах или в их нервной системе. Следует отметить, что эмбриональная специфичность индукции нокдауна, скорее всего, ни в одном случае не была абсолютной. Так, известно, что Эмб1 и Эмб3 индуцируют экспрессию трансгенов также в некоторых имагинальных дисках, например, Эмб3 – в двух боковых участках крылового имагинального диска [Shigenaga и др., 1997]. Тем не менее, сходство полученных результатов во всех исследованных случаях позволяет говорить о влиянии нокдауна *stc* в эмбрионах на продолжительность жизни.

Мы решили более подробно охарактеризовать особенности нокдауна в эмбриональной нервной системе, учитывая, возможно, более ограниченный круг клеток, который он затрагивает, и наш интерес к роли нервной системы в контроле продолжительности жизни. С помощью количественной обратной ПЦР мы подтвердили, что в эмбрионах с нокдауном снижено количество транскриптов *stc* (табл. 5 в Приложении, рис. 13Ж). Подвижность девственных самцов с нокдауном *stc* в нервной системе эмбрионов отличалась от контрольной только в возрасте 40 дней, а подвижность самок – только в возрасте 20 дней (табл. 6 в Приложении, рис. 133, И). Несмотря на это, в целом, можно говорить о том, что нокдаун *stc* в нервной системе эмбрионов не оказал существенного влияния ни на интенсивность движения мух, ни на его возрастную динамику. Таким образом, при уменьшении экспрессии *stc* в эмбриональной нервной системе в результате нокдауна эта интегральная характеристика функционального статуса нервной системы не соответствовала ни увеличению продолжительности жизни, ни замедлению старения, в отличие от ранее рассмотренных эффектов мутации *stc*. Это было тем более удивительным, что нокдаун в эмбрионе затронул именно нервные клетки, а эффект в отношении продолжительности жизни взрослых особей соответствовал эффекту мутации – уменьшение уровня экспрессии гена в обоих случаях приводило к увеличению продолжительности жизни.

4.2.1.7. Нокдаун *stc* в нервной системе эмбрионов влияет на экспрессию генов, регулирующих структурно-функциональные свойства нервной системы, и нейро-мышечного соединения

Чтобы уточнить возможные изменения структуры и функций нервной системы дрозофилы, лежащие в основе положительного влияния сниженной в эмбриональных нейронах экспрессии *stc* на фенотип имаго, мы решили их прямо

изучить. Поскольку наиболее заметным влиянием эндогенной эмбриональной экспрессии *stc* на нейрогенез можно считать показанное исследовавшими его изначально авторами [Stroumbakis, Li, Tolias, 1996] влияние на развитие мотонейронов, мы оценили структуру нейромышечных связок у особей с нокдауном *stc* в сравнении с контрольными особями.

Оказалось, что у самцов с нокдауном *stc* в эмбриональной нервной системе структура синаптических бутонов в нейромышечных связках сильно изменена (рис.14А). На всех проанализированных препаратах бутоны выглядели смятыми или разорванными. Число синаптически активных зон в нейро-мышечном соединении, определенное по количеству скоплений белка Bruchpilot (Brp) [Wagh и др., 2006], оказалось достоверно сниженным у особей с нокдауном (рис.14А, Б). На первый взгляд, эти результаты указывают на ухудшение структуры и функции нервной системы у особей со сниженной экспрессией *stc*. Известно, что синаптический белок Brp необходим для долгосрочной памяти [Knappek, Sigrist, Tanimoto, 2011], а его накопление с возрастом не компенсирует уменьшающуюся активность синапсов [Gehring и др., 2017] и приводит к снижению синаптической пластичности [Gupta и др., 2016]. Можно предположить, что исходно более низкое количества Brp у особей с нокдауном *stc* обеспечивает больший ресурс сохранения активности синапсов и кратковременной памяти с возрастом. Такое изменение не приводит, однако, к увеличению подвижности, в том числе в старости. Возможно, увеличение подвижности, сопутствующее увеличению продолжительности жизни у особей с мутацией *stc*, связано не с изменением синаптических белков, а с изменением энергетического статуса мух под действием мутации, которая, в отличие от исследованного нокдауна, может влиять не только на нейроны.

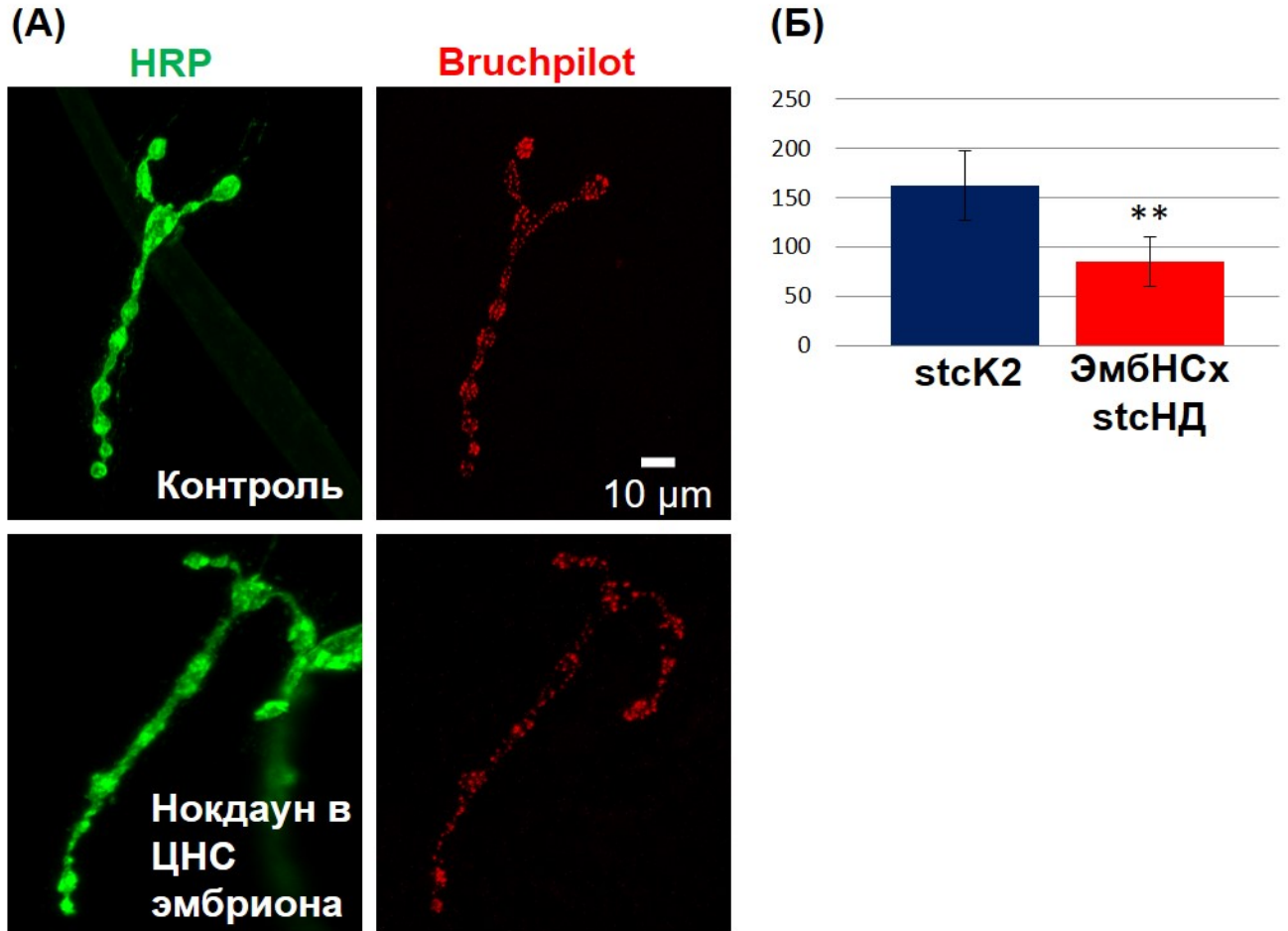


Рисунок 14 — Влияние нокдауна *stc* в нервной системе эмбрионов на транскрипцию генов, регулирующих структурно-функциональные свойства нервной системы, и свойства нейромышечных связок. (А) – типичная структура нейромышечных связок личинок (четвертая мышца третьего и четвертого брюшных сегментов), меченных антителами к пероксидазе хрена, окрашивающей пресинаптические мембраны (зеленый), и белку Brp, скопления которого определяют синаптически активные зоны (красный). (Б) – среднее количество синаптически активных зон. Достоверность отличия от *stcK2*, ANOVA: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$.

В лаборатории геномной изменчивости был охарактеризован транскриптом эмбрионов с нокдауном *stc* в эмбриональной нервной системе. Основываясь на данных о дифференциальной экспрессии и учитывая, что нокдаун затрагивает свойства нейронов, для исследования было выбрано пять характерных нейрональных генов, являющихся возможными мишенями *stc* и изменения их экспрессии были определены методом ОТ-кПЦР (Табл. 8). Важный регулятор развития ген *Notch* (*N*) влияет на процессы нейрогенеза, в том числе влияет на развитие нейробластов, координирует прорастание аксонов мотонейронов [Bowman и др., 2008; Crowner и др., 2003]. Также известно, что и у имаго он участвует в контроле продолжительности жизни, влияя на функции мозга [Presente, Andres, Nye, 2001]. Родственные гены *Uncoordinated*, *Unc115a* и *Unc115b* контролируют рост аксонов и развитие синапсов [Garcia и др., 2007; Roblodowski, He, 2017]. Транскрипция этих генов в эмбрионах увеличилась на 23% ($P=0,0280$) и на 26071% ($P=0,0007$). Ген *Viking* (*Vkg*) является субъединицей коллагена IV типа, регулирует образование и работу синапсов, морфологию микротрубочек и базальных мембран [Bunt и др., 2010; Koper, Schenck, Prokop, 2012; Yasothornsrikul и др., 1997], и его транскрипция возросла на 105% ($P=0,0034$). Ген *Col4a1* известен тем, что его мутации вызывают дефекты в структуре нервной системы и имеют сниженную продолжительность жизни [Borchiellini, Coulon, Le Parco, 1996; Fu и др., 2017]. Нокдаун *stc* приводит к увеличению его транскрипции на 134% ($P=0,0016$). Почему именно эти гены оказались наиболее яркими мишенями *Stc*, остается неясным. Возможно, сильное и потому достоверное изменение транскрипции других нейрональных мишеней *Stc* просто несовместимо с жизнью. Мы планируем, основываясь на данных транскриптомного анализа, найти дополнительные гены, транскрипция которых изменилась недостоверно, но визуально заметно, и проверить влияние нокдауна *stc* на их транскрипцию с помощью ОТ-кПЦР (Рис. 15).

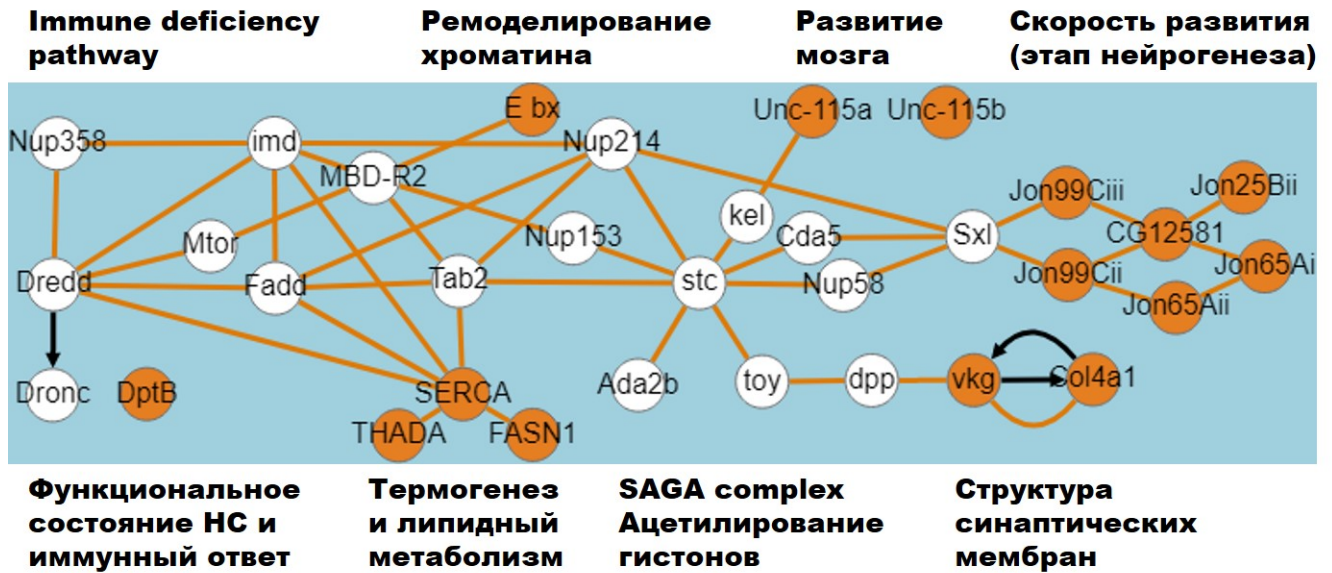


Рисунок 15 — Схема взаимодействий *stc/Stc* с другими генами и белками и их функциональная классификация, построенная на основе данных Flybase и BioGRID. Цветом выделены гены, транскрипция которых изменялась у особей с нокдауном *stc* в нервной системе эмбрионов.

4.2.1.8. Нейрональный нокдаун *stc* изменяет локомоторную активность и продолжительность жизни у девственных самцов

Ввиду участия *stc* в регуляции нейрогенеза [Tolias, Stroumbakis, 1998], мы изучили значение его нейронального нокдауна в контроле продолжительности жизни дрозифилы. Мы скрестили самцов контрольной линии (*stcK2*) и линии, несущей трансгенную конструкцию для РНК-интерференционного нокдауна *stc* (*stcНД*), с девственными самками обеих драйверных линий, обеспечивающих специфическую нейрональную активацию экспрессии - $P\{w[+mW.hs]=GawB\}elav[C155] w[1118]$; $P\{w[+mC]=UAS-Dcr-2.D\}2$ (HC1) и $w[*]$; $P\{GAL4-elav.L\}3$ (HC2) и определили продолжительность жизни девственных потомков обоих полов.

В двух из трех проанализированных вариантов опыта самцы с нейрональным снижением транскрипции имели меньшую продолжительность жизни (см. табл. 4 в Приложении, рис. 16Б, Г, Е). В третьем опыте видимый сдвиг кривой выживания в ту же сторону оказался недостоверно связан со снижением средней продолжительности жизни девственных самцов (рис. 16Е), однако суммируя данные повторенных опытов, можно заключить, что нейрональное снижение экспрессии *stc* сокращает у самцов продолжительность жизни. При этом фенотипический эффект нокдауна у самок отсутствовал (см. табл. 4 в Приложении, рис. 16А, В). С помощью ОТ-кПЦР мы подтвердили, что у самцов с нокдауном *stc* в нейронах снижено количество транскриптов *stc* в головах, где основным источником является мозг (см. табл. 5 в Приложении, рис. 16Д). При этом изменение количества транскрипта *stc* в каркасах, где находится часть периферической нервной системы, не было детектировано (см. табл. 5 в Приложении, рис. 16Д), что может объясняться небольшим относительным количеством нейронов в стенке тела.

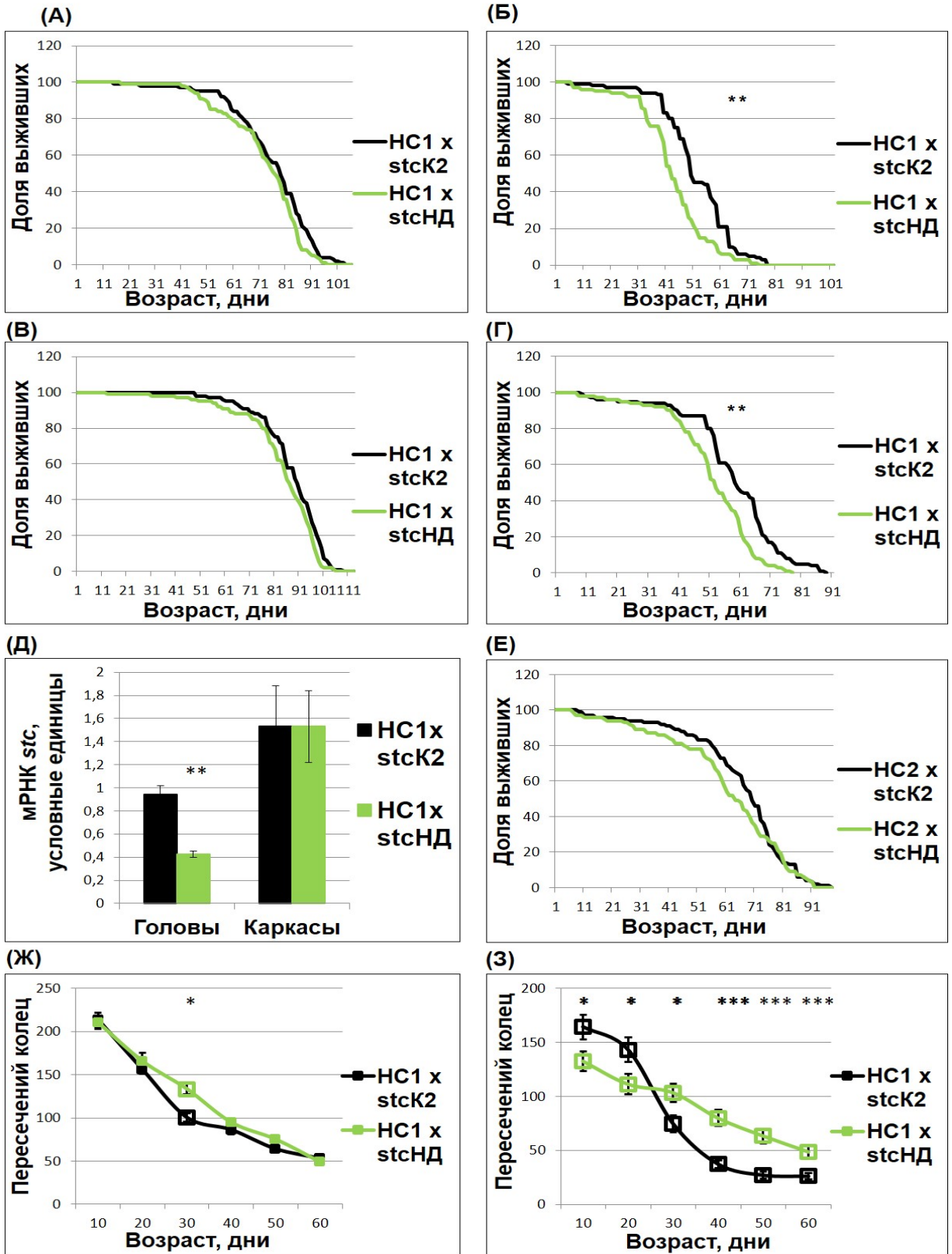


Рисунок 16 — Влияние нокадауна *stc* в нейронах на продолжительность жизни и подвижность девственных самок и самцов. (А, В) – кривые выживания

девственных самок. (Б, Г, Е) - кривые выживания девственных самцов. (Д) – количество транскрипта *stc* в головах и каркасах самцов. (Ж) – подвижность девственных самок в горизонтальной плоскости. (З) – подвижность девственных самцов в горизонтальной плоскости. Достоверность отличия от *stcK2*, тест Краскела-Уоллеса: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$.

Используя селективный нокдаун в нейронах, мы изучили влияние целевого снижения экспрессии *stc* в нервной системе на ее функциональное состояние, интегрально характеризуемое индикатором спонтанной локомоторной активности. В нашем эксперименте локомоторная активность 40- и 50-дневных самцов с нейрональным нокдауном была достоверно выше, чем у контрольных (см. табл. 6 в Приложении, рис. 16З). Это не меняло их энергетический статус, характеризуемый содержанием АТФ в теле [Рыбина О. Ю., личное сообщение]. Так же, как и с продолжительностью жизни, фенотипические изменения подвижности, обусловленные нейрональным нокдауном, у самок отсутствовали (см. табл. 6 в Приложении, рис. 16Ж). Эти результаты, так же, как и полученные ранее при исследовании влияния мутации *stc* на подвижность скрещивавшихся самок, 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. Эти результаты подтверждают, что эффекты снижения уровня экспрессии *stc* в отношении продолжительности жизни и интегральных свойств нервной системы не всегда связаны.

4.2.1.9. Эффект нокдауна *stc* в нервной системе зависит от глутамата

Глутаматная эксайтотоксичность известна как один из механизмов гибели нервной системы и часто бывает вызвана снижающейся с возрастом способностью организма достаточно быстро гидролизовать в синаптической щели накапливающийся нейромедиаторный глутамат. Из-за этого возбудимость в системе глутаматных нейронов (в первую очередь, мотонейронов, связанных с двигательной системой) постоянно нарастает, до неизбежной смерти организма [Belov и др., 2020].

На модели дрозофилы показано, что мухи с индуцированной эксайтотоксичностью гибнут именно таким образом, из-за неконтролируемо накапливающегося в синапсах мотонейронов возбуждения [Peng и др., 2019]. Учитывая, что, во-первых, это может быть одной из основных зависящих от нервной системы причин гибели стареющих мух, и во-вторых, по нашим данным о возможном механизме действия избирательного нокдауна *stc*, представляется вероятным, что он может менять закладываемые в раннем развитии характеристики синапсов, снижая темпы роста с возрастом синаптической возбудимости и преимущественно действуя в аксонах мотонейронов, мы выдвинули нулевую гипотезу о том, что определенные варианты снижения экспрессии *stc* в нервной системе могли бы отсрочивать наступление, или вовсе «спасать» организм от индуцированной глутаматной эксайтотоксичностью гибели, продляя таким образом жизнь модельных объектов.

С целью экспериментальной проверки выдвинутой гипотезы, мы индуцировали на модели дрозофилы алиментарную эксайтотоксичность повышенным потреблением глутамата с кормом. Поскольку измерение исходной концентрации глутамата в разных кормах представляет ощутимые технические

трудности и, по-видимому, обуславливает сильные отличия данных таких экспериментов у разных авторов [Kasozі и др., 2018], для пилотного эксперимента мы использовали две, отличающиеся на порядок концентрации добавленного глутамата натрия (PanReac AppliChem, Испания) в стандартном лабораторном корме: 1) 10 мкМ, согласно данным литературы, индуцирующую сокращение продолжительности жизни мутантов с нарушенными структуро-функциональными характеристиками синапсов [Chang и др., 2008] и 2) 10 мМ, способную влиять на продолжительность жизни дрозophil дикого типа [Zhou и др., 2010], сравнивая их влияние на продолжительность жизни нашей линии со специфическим нейрональным нокдауном (НС1 x *stc*HD) с контрольной (НС1 x *stc*K2).

Достаточно ожидаемо, минимальная концентрация добавленного глутамата (10 мкМ), независимо от пола, не влияла на измеренное соотношение продолжительности жизни мух линии с нейрональным нокдауном *stc* по сравнению с контрольной, продолжительность жизни девственных самцов была меньше контрольных, а самок такой же (см. табл. 4 в Приложении, рис. 17А, Б).

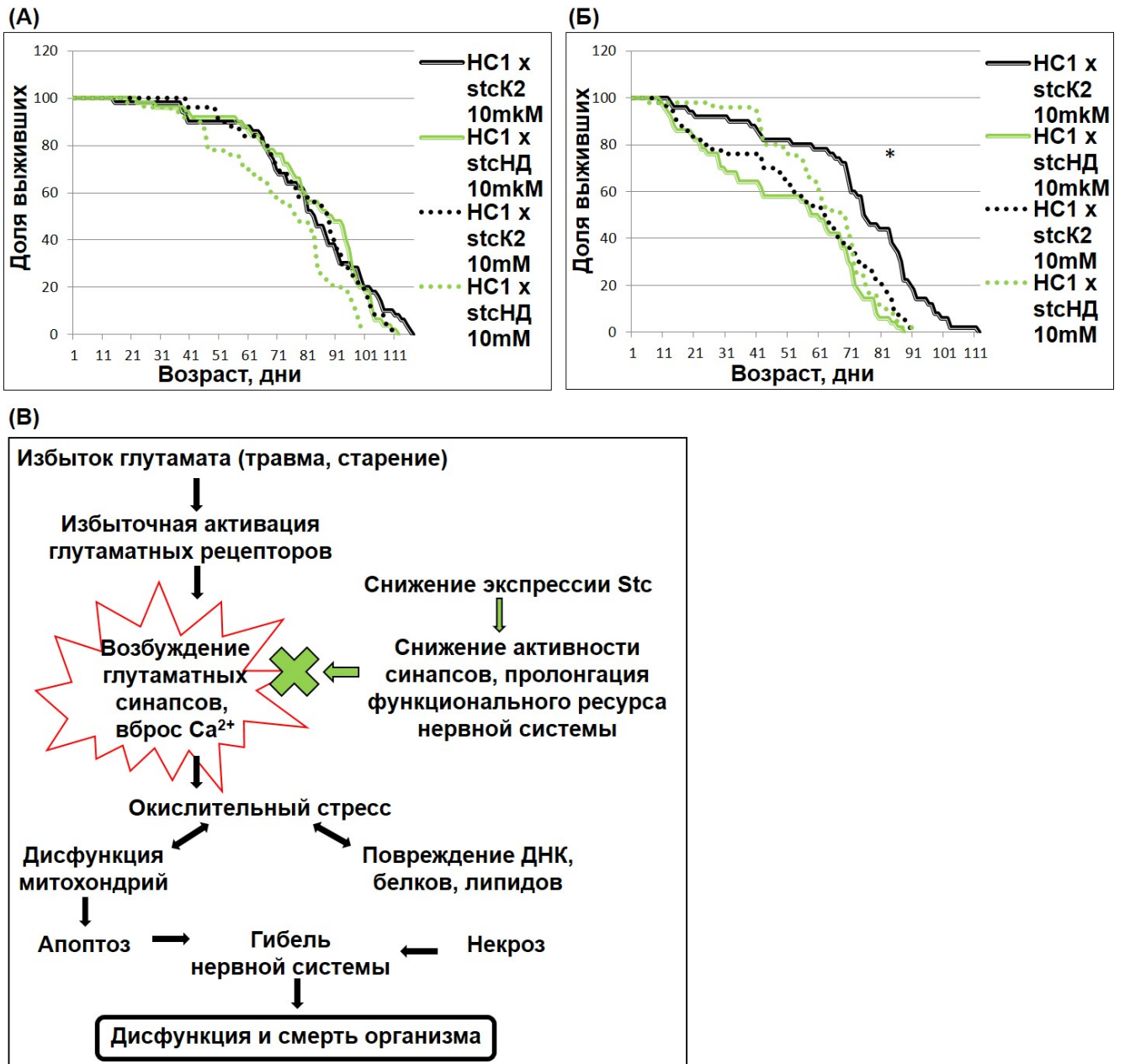


Рисунок 17 — Эффект глутаматной эксайтотоксичности у линии с нейрональным нокадауном *stc*. (A) – кривые выживания девственных самок. (B) – кривые выживания девственных самцов. (C) – схема потенциального действия нейронального нокадауна *stc* на механизмы глутаматной эксайтотоксичности.

Также глутамат, добавленный в корм в максимальной концентрации (10 мМ) демонстрировал по сравнению с минимальной (10 мкМ) предполагаемый эффект

индукции алиментарной эксайтотоксичности, сокращая продолжительность жизни более короткоживущих и, вероятно, более чувствительных к неспецифическим негативным воздействиям, по сравнению с самками, самцов контрольной линии. В рамках проверки нулевой гипотезы имеет значение вывод, что алиментарный глутамат в максимальной добавленной концентрации изменяет соотношение между продолжительностью жизни мух обоих полов в каждой из исследованных линий: контрольного генотипа и с нейрональным нокдауном *stc*. В этом варианте самцы с нокдауном живут так же долго, как контрольные (см. табл. 4 в Приложении, рис. 17А), тогда как на обычном корме они жили меньше, и это может объясняться ожидаемым эффектом «спасения» меньшей синаптической возбудимостью вследствие нокдауна *stc* части самцов, иначе преждевременно гибнущих от более быстро нарастающей с возрастом возбудимости, из-за избытка глутамата в синаптической щели (рис. 17В).

Выживаемость самок контрольной линии не зависела от концентрации глутамата, что может объясняться их большей устойчивостью к негативным факторам внешней среды и, как у более долгоживущего пола, более позднему развитию глутаматной эксайтотоксичности. А в условиях нокдауна *stc* и максимальной концентрации глутамата самки даже начинали жить хуже, что может объясняться наличием у них дополнительных факторов, влияющих на устойчивость к избытку глутамата. Перспективным является продолжение этой работы с другими типами селективного нокдауна *stc*, которые будут более целевым образом продлевать жизнь мух обоего пола в рамках общего принципа снижения синаптической возбудимости и предотвращения гибели модельного объекта от развивающейся вследствие возраста или условий среды в нервной системе эксайтотоксичности.

4.2.2 Обсуждение результатов

4.2.2.1. *stc* влияет на продолжительность жизни дрозифилы

Выполненные нами эксперименты подтверждают и конкретизируют механизм, благодаря которому инсерция $P\{SUPor-P\}$ в район 5'-нетранслируемой области *stc*, кодирующего фактор нейрогенеза дрозифилы, замедляет старение и продлевает жизнь девственных самок, однако уменьшает продолжительность жизни самок, участвовавших в скрещиваниях. Мы также показали, что у самцов как со встройкой, так и с ее реверсией скорость старения и выживаемость не меняется, и в целом для них эффекты этой встройки являются нейтральными, что полностью укладывается в рамки изначальной нулевой гипотезы [Рощина, 2008]. Однако для полноценного установления механизма действия этого гена в контроле продолжительности жизни необходимо проверить еще ряд фактов. Действительно, оставалось неизвестным, влияет ли встройка на функцию именно данного конкретного гена. Мы продемонстрировали, что встройка влияет на транскрипцию гена *stc*, и таким образом доказали, что снижение экспрессии *stc* причинно связано с увеличением продолжительности жизни. Этот важный результат впервые показал, что *stx* участвует в контроле продолжительности жизни.

$P\{SUPor-P\}$ – это большая векторная конструкция, и хотя нет сомнений, что ее встройка повлияла на экспрессию *stc*, остается возможность, что она также повлияла на экспрессию других генов, расположенных в этом районе генома. Прежде всего, на расстоянии 388 пн от начала гена *stc* находится ген *CG15269*, функции которого неизвестны (<https://flybase.org/jbrowse/?data=data/json/dmel&loc=FBtr0080704>). Мутация *stc[05441]*, обусловленная инсерцией Р-элементного вектора в *CG15269*, впервые

описана как типичная для фенотипа *stc* [Stroumbakis, Li, Tolias, 1996]. Таким образом, можно предположить, что и эта область также является скорее не кодирующей новый белок, а регуляторной для *stc*, но эта гипотеза требует дальнейшей верификации. Несколько небелок-кодирующих генов с неизвестными функциями расположены на расстоянии 1714 п.н. от 3' конца гена *stc* и далее. У нас нет данных о возможном влиянии векторной инсерции $P\{SUPor-P\}$ на их функции. Ближайшими белок-кодирующими генами являются два варианта *vasa* (на расстоянии 39 т.п.н.) и CG4168 (на расстоянии 44 т.п.н.), вероятно, расположенные слишком далеко для цис-регуляторных взаимодействий в геноме дрозофилы (см., например, выводы [Kvon и др., 2014]). Вследствие такой структуры региона, другие отдаленные эффекты инсерции $P\{SUPor-P\}$ возможны, но крайне маловероятны.

Только у мутантных самок наблюдались значительные изменения продолжительности жизни по сравнению с контролем, у самцов эффект мутации выявлен не был. Такой результат может быть объяснен, по крайней мере частично, взаимодействием *stc* и кодируемого им транскрипционного фактора с другими генами/белками. Например, в одной из работ [Bauer и др., 2006] было выявлено несколько групп генов, экспрессия которых в условиях стресса зависит от пола. Оказалось, что эти гены имеют широкий спектр функций, включающих регуляцию сенсорного восприятия, иммунного ответа, рост и, в том числе, репродуктивную физиологию. Учитывая, что многие гены вовлечены в контроль как продолжительности жизни, так и устойчивости к стрессу [Levine, Crimmins, 2016], можно предположить, что изменение экспрессии гена, приводящее к изменению продолжительности жизни, также индуцирует зависимое от пола изменение экспрессии генов-мишеней, в том числе регулирующих репродуктивную физиологию. Межгенные взаимодействия могут объяснить половую специфичность генетического контроля продолжительности жизни, которая у дрозофилы была отмечена во многих исследованиях [Nuzhdin, Pasyukova, Mackay,

1997; Clancy и др., 2001; Tatar и др., 2001; Tricoire и др., 2009; Magwire и др., 2010; Ruiz и др., 2011; Schriener и др., 2014; Shaposhnikov и др., 2015; Waldvogel и др., 2020). Такая половая специфичность может быть следствием возникшей в процессе эволюции консервативной системной регуляции старения репродуктивной системой [Flatt и др., 2008].

Половая специфичность влияния *stc* на продолжительность жизни была выявлена и в более ранней работе [Pasyukova и др., 2004], хотя в ней была использована линия $y[1] w[67c23]; P\{SUPor-P\}stc[KG01230]; ry$ с той же мутацией и линия $y[1] w[67c23]; ry$ в качестве контроля. На этом генетическом фоне мутация *stc[KG01230]* сократила продолжительность жизни как девственных, так и скрещивавшихся самок. Известно, что линия $w[1118]$ имеет нормальную продолжительность жизни, в то время как линия $y[1] w[67c23]$ является долгоживущей (Mockett и др., 2012). Различное влияние мутации *stc[KG01230]* на продолжительность жизни девственных самок может быть связано с различиями в продолжительности жизни исходных контрольных линий, обусловленными особенностями их генотипа, на фоне которого исследовали эффекты мутации: на фоне долгожителей мутация *stc* уменьшала продолжительность жизни, но имела противоположный эффект в фоне с нормальной продолжительностью жизни. Различия между половой специфичностью мутации и нокдауна, вероятно, может быть связана с тем, что инсерция в 5' нетранслируемую область, несколько по-другому, чем нокдаун, модулирует влияние транскрипционных факторов или даже отсекает часть возможных транскриптов, разрывая диспергированный сайт старта транскрипции. В целом, эти результаты также указывают на неизвестные пока эпистатические взаимодействия гена *stc* и кодируемого им транскрипционного фактора с другими генами/белками.

В этой работе мы подтвердили, что изменение уровня экспрессии *stc* в эмбрионах влияет на транскрипцию ряда генов-мишеней кодируемого им

транскрипционного фактора, которые связаны с контролем развития и функции нейронов, в частности роста аксонов. Этот результат не удивителен, поскольку нейрональная роль *stc*, в частности его влияние на рост аксонов моторных нейронов, были продемонстрированы ранее [Stroumbakis, Li, Tolias, 1996]. Однако наши эксперименты впервые выявили конкретных партнеров *stc* в регуляции свойств нервной системы.

В экспериментах, представленных в данной работе, девственные самки *stc*[*KG01230*] жили дольше, чем скрещивавшиеся самки [*stc**KG01230*] (62 против 50 дней, в среднем по всем экспериментам). Считается, что размножение сокращает продолжительность жизни, и компромисс между продолжительностью жизни и размножением широко распространен; однако при определенных условиях увеличение продолжительности жизни может и не быть связанным со снижением размножения [Flatt, 2011]. Изменение структуры и функции *stc* снижало как продолжительность жизни, так и плодовитость спариваемых самок, что указывает не на обратную, а на прямую корреляцию между выживанием и размножением. Известно, что самки после скрещивания потребляют больше пищи, но сам этот факт не влияет на их выживаемость. Таким образом, сокращение жизни после скрещивания у самок мутантной линии, скорее, может быть связано не с изменившимся пищевым поведением, а с самим фактом спаривания (например, влиянием на физиологию самок половых пептидов самцов или увеличенным риском распространения инфекции) и его частотой (для более подробного обсуждения этих общих эффектов см., например, [Barnes и др., 2008, Wolfner, 1997, Zhong и др., 2013]). При рассмотрении вероятности влияния этих факторов в нашем случае, важным аргументом, например, за инфекционную гипотезу или реакцию на чужеродные белки может оказаться то, что *stc*, как следует из его гомологии с транскрипционным фактором NF-X1 человека и наших данных по изменениям в транскриптоме в результате изменений его экспрессии, может играть роль в

контроле иммунного ответа. Дальнейшие исследования необходимы для выяснения генетических основ корреляции между физиологическим статусом самок и продолжительностью жизни.

Проведенное нами изучение экспрессии *stc* в различных тканях и на различных стадиях онтогенеза позволяет заключить, что мутация *stc*^{KG01230} изменяет транскрипцию *stc* только в эмбрионах, хотя и не позволило сопоставить относительную экспрессию *stc* на стадии эмбрионов с их полом. На основании наших данных (рис. 9А, 9В, 9Г) можно предположить, что на последующих стадиях развития также существуют некоторые отличия между относительной экспрессией у мутантных и контрольных самок, хотя в представленных опытах они не были достоверными. В дальнейшем было бы интересно более точно исследовать, имеет ли значение для продолжительности жизни колебание относительной экспрессии *stc* на разных стадиях онтогенеза. Однако, в целом комплекс наших данных указывает на критическую важность генетической регуляции на ранних стадиях развития, обуславливающих закладку структур и тканей. Это подкрепляется данными о ряде других регуляторов продолжительности жизни (FOXO, Hsf, ферментов электротранспортной цепи в митохондриях, микроРНК), которые влияют на продолжительность жизни преимущественно в период раннего личиночного развития и ранней взрослости [Alcedo, Flatt, Pasyukova, 2013; Martins, Lithgow, Link, 2015; Morley, Morimoto, 2004]. Мы предполагаем, что долгосрочные, переносимые эффекты мутации *stc* могут быть эпигенетически унаследованы в клеточных линиях.

Мы показали, что мутация *stc*[*KG01230*], снижающая транскрипцию гена *stc* только на эмбриональной стадии, увеличивает продолжительность жизни девственных самок, но не влияет на продолжительность жизни самцов. Этот результат, однако, не удалось воспроизвести в опытах, в которых мы снизили транскрипцию *stc* с помощью РНК-интерференции, более того, мы обнаружили

противоположный эффект – уменьшение экспрессии *stc* увеличило преимущественно продолжительность жизни самцов. Такая разница между результатами опытов может объясняться как отличиями в степени подавления экспрессии гена в каждом из них, так и не выявленной нами разницей в тонких особенностях тканеспецифичности подавления экспрессии. Мы охарактеризовали изменение количества транскрипта *stc* в результате мутации в регуляторной области гена в нескольких, но не во всех тканях, а специфичность использованных в нашей работе линий-драйверов для индукции нокдауна может быть охарактеризована не полностью. Однако эти соображения не дают оснований сомневаться в выводе о том, что экспрессия *stc* в наших двух экспериментальных системах изменена главным образом или исключительно в клетках эмбриона, и это изменение приводит к увеличению продолжительности жизни.

Таким образом, как наши собственные данные, так и немногочисленные опубликованные данные [Alcedo, Flatt, Pasyukova, 2013] позволяют говорить о важном принципе, который может лежать в основе генетического контроля старения и долголетия: изменение экспрессии гена в раннем возрасте способно повлиять на продолжительность жизни взрослых мух. Говоря о молекулярных механизмах такого влияния, можно выдвинуть две гипотезы. Во-первых, такое влияние можно объяснить сохранением в ряду клеточных поколений эпигенетически регулируемого уровня экспрессии мишеней транскрипционного фактора. Во-вторых, транскрипционный фактор *Stc* может быть вовлечен в работу регуляторных каскадов, которые, регулируя процессы развития, определяют структурные и, следовательно, функциональные свойства взрослой нервной системы. Поскольку эмбриональная транскрипция *stc* и продолжительность жизни причинно-следственно связаны, точные механизмы этого эффекта переноса необходимо выяснить в будущих исследованиях.

Связь между изменением экспрессии *stc*, продолжительности жизни и свойств нервной системы имеет неоднозначный характер. Наши данные указывают на то, что улучшением функционального статуса нервной системы в старости может сопутствовать и уменьшению, и увеличению продолжительности жизни. Снижение уровня экспрессии *stc* на постэмбриональных стадиях всегда благоприятно сказывается на интегральных свойствах нервной системы. Однако, наши результаты показывают, что уменьшение экспрессии гена *stc* может приводить к увеличению продолжительности жизни, сопряженному со снижением активности синапсов в раннем возрасте и, вследствие этого, возможным сохранением ресурса их пластичности в процессе старения мух. Сейчас происходит накопление данных в пользу того, что именно уровень синаптической возбудимости, необратимо нарастающий в течение жизни, может истощать ресурс пластичности нервной системы и являться фактором, определяющим продолжительность жизни организма. Например, повышающие синаптическую возбудимость мутации дрозофилы типа *sleepless* одновременно снижают возможность перестройки синаптических контактов [Huang и др., 2020], а носители этих мутаций являются более короткоживущими [Bushey и др., 2010]. На модели *C. elegans* был показан постоянно возрастающий со временем уровень возбудимости нервной системы, экспериментальное снижение которого во всех или только определенных группах нейронов позволяет продлить жизнь модельного объекта. Аналогичный, постоянный рост возбудимости с возрастом фиксируют в глутаматэргических нейронах млекопитающих и человека. В свете этого механизма важным является наблюдение, что долгожители имеют достоверно более низкие уровни транскрипции отвечающих за активность нервной системы групп генов, и это может быть обусловлено широко распространенной в геноме транскрипционной регуляцией под управлением фактора из консервативного семейства REST [Zullo и др., 2019]. По-видимому, у дрозофилы нет полного аналога

этой системы генетической регуляции [Bruce и др., 2004], но контролирующему ее фактору можно сопоставить функционально аналогичный аксональный фактор транскрипции Chn [Yamasaki и др., 2021], который, также, как и Stc, формирует общие функциональные комплексы с важным белком эпигенетической модуляции Ada2b [Gramates и др., 2022]. Изложенные выше факты позволяют выдвинуть гипотезу о сходном механизме действия исследуемого нами Stc на продолжительность жизни благодаря снижению возбудимости и лучшему сохранению с возрастом пластичности нервной системы.

4.2.2.2. Роль 5' регуляторной и нетранслируемой области в модуляции транскрипции *stc*

Конструкция $P\{SUPor-P\}$ встроена в нетранслируемую область гена *stc* и не влияет на белок(и) Stc. Однако эта большая вставка повлияла на уровень транскрипции *stc*. Поскольку перед местом вставки, согласно данным проекта modENCODE, находится «горячая» область посадки транскрипционных факторов, можно предположить, что большая инсерционная мутация смещает регулирующие транскрипцию сайты посадки транскрипционных факторов и нарушает их воздействие, регулирующее транскрипцию гена *stc*. Инсерция $P\{SUPor-P\}stc$ [KG01230] находится в 16 нуклеотидах от начала гена *stc*, в пределах предсказываемого места старта транскрипции (в частности, координаты этой инсерции 2L:15,113,496, а старт эмбриональной транскрипции гена *stc*, по данным 5'RACE проекта modENCODE [Gramates и др., 2022], происходит в области 2L:15,113,455..15,113,548. Согласно нашим данным, такая инсерция не прекращает полностью транскрипцию *stc*, но снижает уровень эмбриональной экспрессии (и только ее) в 2-3 раза (табл. 5 в Приложении, рис. 9В, Г). В связи с тем, что инсерция находится в области старта эмбриональной транскрипции, содержащего несколько

пиков по данным 5'RACE modENCODE, в том числе, перед известным сайтом инсерции, векторная конструкция может и прямо обрывать часть возможных стартовых транскриптов. Но также более вероятным представляется, что характерный эффект на транскрипцию объясняется тем, что инсерция большой векторной конструкции (размером около 11,5 т.п.н., что в 2,5 раза больше размеров самого гена *stc* длиной около 4,5 т.п.н.) отдаляет важные транскрипционные факторы, регулирующие ее у эмбриона, скорее всего, нарушая их взаимодействие со стартом транскрипции и снижая или нивелируя модулируемый этими транскрипционными факторами уровень эмбриональной экспрессии. Согласно анализу modENCODE, «горячая» область связывания транскрипционных факторов, TFBS_HSA_004897, охватывает всю 5'- межгенную область между предыдущим геном CG15269 и *stc*. С ней связано по крайней мере семь транскрипционных факторов, включая участвующие в контроле развития нервной системы во время позднего эмбриогенеза, а именно: Hairy, Disconnected, Daughterless, Dichaete, Dorsal, Twist и Caudal. Также в 5'-нетранслируемой области *stc* находятся мишени трех микро РНК (Dme-mir-1010, Dme-mir-1012, Dme-mir-303), но все они расположены позже места инсерции вектора (ближайшая на расстоянии 170 п.н.) и, скорее всего, эта инсерция влияния на них не оказывает.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

НС, с момента возникновения ее предковых вариантов около 600 миллионов лет назад, является ключевым звеном, контролирующим все аспекты регуляции функций многоклеточных организмов и их реакций на факторы внутренней и внешней среды [Arendt, 2021; Moroz, 2015]. Поэтому несомненна ключевая роль НС также в контроле такой важнейшей биологической и социальной характеристики живых организмов как продолжительность жизни.

Вероятно, НС возникала из различающихся функционально и метаболически протонейронов, формируя единый ансамбль, контролирующий функции организма, что определяет как высокую сложность организации и функций, обеспечиваемую ее клетками, так и единство и общий план развития НС в онтогенезе. Тем не менее, базовые генетические процессы, лежащие в основе регуляции ее развития остаются высококонсервативными, общими начиная от первых многоклеточных [Arendt и др., 2015; Arendt, 2021; Striedter, 2011].

Транскрипционная регуляция развития НС, с одной стороны, обеспечивается наиболее консервативными из известных каскадов гомеобоксных генов [Gehring, Affolter, Burglin, 1994], что позволяет обобщать многие данные о генетической регуляции развития, полученные на модели дрозофилы. Такие генетические регуляторы сохраняют высокую консервативность структуры, последовательности участия и функций ими выполняемых в процессе развития, делая описанные механизмы универсальными и с хорошей точностью транслируемыми на высших млекопитающих и человека, что позволяет изучение данных процессов на модельных организмах, включая дрозофилу, и обобщение их для всех многоклеточных, сохраняющих консервативность нейрогенеза [Held, 2017;

Marco и др., 1999; Striedter, 2011]. С другой стороны, известно, что именно транскрипционная регуляция позволяет наиболее тонкую настройку функционирования генов многоклеточных организмов в важнейших процессах экологической адаптации и микроэволюции, доступных для изучения современными методами [Chen, Rajewsky, 2007; Mitsis и др., 2020; Wray, 2003].

Также, НС насекомых и высших позвоночных при сохраняемой консервативности общей организации характеризуется сравнимо высокой сложностью структурных единиц, представленных высокодифференцированными нейронами, имеющими хорошо структурированные синаптические бутоны, образующие многочисленные синаптические контакты [Moroz, 2015]. Такое сходство уровней сложности и структуры НС позволяет изучение функций и развития НС на более простой модели насекомых, с перенесением этих данных на НС высших позвоночных, избыточно сложную для подробного изучения современными методами [Murphey, Chiba, 1990].

В данной работе мы показали, что инсерционные мутации в регуляторных областях нейрональных транскрипционных факторов *stc* и *esg* снижают транскрипцию этих генов (вероятно, нарушая структуру регуляторных районов, связанную с модулирующим влиянием на транскрипцию этих генов транскрипционных факторов в случае *stc* и неизвестных энхансеров, находящихся в 3' области гена *esg*) [Roshina и др., 2014; Symonenko и др., 2018]. При этом специфическое влияние именно этой мутации на продолжительность жизни доказывает то, что при полной реверсии генотипа до контрольного происходит достоверное восстановление у ревертантов как уровня транскрипции, так и продолжительности жизни до уровней, характерных для контрольных линий.

Такие мутации, с умеренным снижением уровня транскрипции генов нейрогенеза в 2-3 раза, в нашей работе увеличивают продолжительность жизни дрозофилы зависящим от пола образом. Так, если для мутации *esg* относительный эффект увеличения продолжительности жизни для самцов кратно выше, чем для самок, то мутация *stc* достоверно продляет жизнь только самок, не оказывая влияния на самцов. Половая специфичность может быть связана как с не нейрональными, специфическими для самцов, эффектами сниженной экспрессии *esg*, вероятно, активирующими развитие тканей семенников с соответствующими поведенческими и метаболическими изменениями. В случае *stc* возможные причины половой специфичности менее очевидны (в первую очередь из-за важности для него эмбриональной экспрессии) и, вероятно, связаны с неизвестными эпистатическими взаимодействиями с другими генами. Полоспецифические особенности факторов, определяющих продолжительность жизни модельных организмов, широко известны, но детали этой специфичности во многом требуют дальнейшего изучения. Полученные нами данные могут дать важную основу для накопления данных об особенностях и определения механизмов половой специфичности связанных с развитием и функционированием НС генетических факторов, определяющих продолжительность жизни.

Необходимым для понимания механизмов влияния на продолжительность жизни индикатором является возрастное изменение подвижности, которое считается одним из наиболее достоверных индикаторов старения [Jones, Grotewiel, 2011]. Увеличение продолжительности жизни в мутантных линиях со сниженной экспрессией генов *esg* и *stc* сопряжено с соответствующим снижением скорости падения подвижности, что может объясняться сниженной скоростью старения таких особей.

Важной особенностью механизма влияния экспрессии *stc* является то, что вызываемое мутацией $P\{SUPor-P\}stc[KG01230]$ снижение экспрессии является специфически эмбриональным. Это демонстрирует, что исключительно эмбриональное изменение экспрессии нейронального гена может влиять на функционирование и продолжительность жизни прошедшего полный метаморфоз имаго. Возможным механизмом передачи этих изменений между стадиями развития могут являться как сохраняющиеся в ряду клеточных поколений эпигенетические изменения, так и структурно-функциональные изменения НС, возникающие в процессе эмбриогенеза.

Для уточнения механизмов влияния экспрессии нейрональных генов на продолжительность жизни нами были исследованы варианты селективного нокдауна изучаемых нейрональных генов. Оказалось, что нейрональный нокдаун *esg* может как увеличивать, так и снижать продолжительность жизни. Специфический эффект на продолжительность жизни, по-видимому, определяется степенью снижения экспрессии гена, при этом для продления жизни необходимо сравнительно умеренное снижение транскрипции этого важного нейронального гена. В случае нокдауна *stc* паннейрональный нокдаун также снижает продолжительность жизни, что, вероятно, объясняется тем, что такое снижение экспрессии на других стадиях развития, кроме эмбриональной, оказывает пагубное воздействие на другие функции НС. Дополнительным доказательством этого служит продемонстрированный нами факт, что эмбриональный нокдаун гена *stc* увеличивает продолжительность жизни [Симоненко и др., 2022]. И также продолжительность жизни увеличивает самый специфический вариант – эмбриональный нокдаун *stc* в НС, ограничивающий все возможные механизмы его действия целенаправленным влиянием на процессы нейрогенеза. При таком нокдауне мы наблюдаем очевидные изменения структуры постэмбриональных личиночных синаптических бутонов,

сопровождающиеся двукратным снижением количества активных зон синапсов. Это наблюдение, с одной стороны, демонстрирует нам один из предполагаемых механизмов передачи фенотипических изменений между стадиями развития, с другой стороны, дает понимание возможного механизма продления жизни, вызываемого снижением экспрессии *stc* в эмбриональной НС. Так, недавние данные демонстрируют, что с возрастом возбудимость синаптических контактов модельных объектов растет, коррелируя со старением. Также, человеческие долгожители характеризуются сниженной экспрессией нейрональных генов, в частности, связанных с функционированием синапсов [Zullo и др., 2019]. В случае нокдауна *stc* в эмбриональных нейронах, снижение количества активных зон синаптических контактов у личинок, вероятно, обеспечивает больший возрастной ресурс синаптической пластичности. Также, согласно данным транскриптомного анализа, выполненного в нашей лаборатории, такой нокдаун снижает активность ряда генов, связанных с функционированием НС и синапсов. Таким образом, наши находки могут как подтверждать выдвинутую другими авторами гипотезу относительно того, что меньшая синаптическая возбудимость может быть полезна для стареющего организма, так и дают основу для понимания того, что такие особенности организма могут закладываться на самых ранних этапах развития организма и определять особенности всего последующего функционирования и, в целом, продолжительности жизни организма.

Полученные нами данные позволяют как определить конкретные механизмы, определяющие влияние передающихся между стадиями развития организма особенностями НС, так и определить ключевые этапы, на которых определяются эти особенности и возможны геропротекторные и продляющие жизнь интервенции. Такое понимание может иметь огромное социальное и экономическое значение для определения перспективных стратегий влияния

связанных с функционированием НС интервенций на продолжительность жизни животных и человека. Отдельный интерес также представляет накопление данных относительно половой специфичности как данных механизмов, так и возможных воздействий на них.

Перспективным развитием данной работы представляется дальнейшее уточнение полного пути транскрипционной регуляции *Stc* и поиск его ключевых мишеней и регуляторов, перспективных с точки зрения влияния на консервативные пути нейрогенеза, позволяющих увеличить продолжительность жизни животных с сохранением здорового состояния и высокой активности в позднем возрасте – в том числе с помощью генетических и фармакологических интервенций. Важно также рассматривать исследуемые механизмы с точки зрения обнаруженной нами половой специфичности механизмов, оказывающих влияние на продолжительность жизни, с соответствующим учетом этих особенностей для более точного дозирования терапевтических воздействий на особей разного пола, и также расширения фундаментального понимания эпистатических взаимодействий, вовлеченных в регуляцию продолжительности жизни, связанной с полом.

Еще одним важным направлением исследования, ведущимся в настоящее время, является поиск сайтов полиморфизма в природных популяциях, регулирующих активность генов *esg* и *stc* и дающих адаптивные преимущества в природных популяциях дрозофилы. Эта работа ведется в настоящее время в нашей лаборатории на основе полученных нами изогенных линий из российских природных популяций дрозофилы.

6. 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 связей и активности синапсов на более поздней стадии развития.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рощина, Н. В. Выявление генов, участвующих в контроле продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*: дис. канд. биол. наук: 03.00.15: защищена 01.10.08: утв. 05.12.08 / Автор Рощина Н. В. - М., 2008. - 160 с. - Библиогр.: с.151-160. - 003446843.
2. 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.
3. Adinolfi A. M., Yamuy J., Morales F. R., Chase M. H. Segmental demyelination in peripheral nerves of old cats // Neurobiol Aging. – 1991. – Т. 12, № 2. – С. 175-9.
4. Alcedo J., Flatt T., Pasyukova E. G. The role of the nervous system in aging and longevity // Front Genet. – 2013. – Т. 4. – С. 124.
5. Alcedo J., Kenyon C. Regulation of *C. elegans* longevity by specific gustatory and olfactory neurons // Neuron. – 2004. – Т. 41, № 1. – С. 45-55.
6. Altmann C. R., Chow R. L., Lang R. A., Hemmati-Brivanlou A. Lens induction by Pax-6 in *Xenopus laevis* // Dev Biol. – 1997. – Т. 185, № 1. – С. 119-23.
7. Andersen B. B., Gundersen H. J., Pakkenberg B. Aging of the human cerebellum: a stereological study // J Comp Neurol. – 2003. – Т. 466, № 3. – С. 356-65.

8. Apfeld J., Kenyon C. Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. – 1999. – T. 402, № 6763. – C. 804-9.
9. Arendt D. Elementary nervous systems // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 2021. – T. 376, № 1821. – C. 20200347.
10. Arendt D., Benito-Gutierrez E., Brunet T., Marlow H. Gastric pouches and the mucociliary sole: setting the stage for nervous system evolution // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 2015. – T. 370, № 1684.
11. Argyridou S., Zaccardi F., Davies M. J., Khunti K., Yates T. Walking pace improves all-cause and cardiovascular mortality risk prediction: A UK Biobank prognostic study // *Eur J Prev Cardiol*. – 2020. – T. 27, № 10. – C. 1036-1044.
12. Ashraf S. I., Hu X., Roote J., Ip Y. T. The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control *Drosophila* neurogenesis // *EMBO J*. – 1999. – T. 18, № 22. – C. 6426-38.
13. Ashraf S. I., Ip Y. T. The Snail protein family regulates neuroblast expression of *inscuteable* and *string*, genes involved in asymmetry and cell division in *Drosophila* // *Development*. – 2001. – T. 128, № 23. – C. 4757-67.
14. Aso Y., Hattori D., Yu Y., Johnston R. M., Iyer N. A., Ngo T. T., Dionne H., Abbott L. F., Axel R., Tanimoto H., Rubin G. M. The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning // *Elife*. – 2014. – T. 3. – C. e04577.

15. Azam S., Haque M. E., Balakrishnan R., Kim I. S., Choi D. K. The Ageing Brain: Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – T. 9. – C. 683459.
16. Baker L. R., Weasner B. M., Nagel A., Neuman S. D., Bashirullah A., Kumar J. P. Eyeless/Pax6 initiates eye formation non-autonomously from the peripodial epithelium // *Development.* – 2018. – T. 145, № 15.
17. Baldi S., Becker P. B. The variant histone H2A.V of *Drosophila*--three roles, two guises // *Chromosoma.* – 2013. – T. 122, № 4. – C. 245-58.
18. Balling A., Technau G. M., Heisenberg M. Are the structural changes in adult *Drosophila* mushroom bodies memory traces? Studies on biochemical learning mutants // *J Neurogenet.* – 2007. – T. 21, № 4. – C. 209-17.
19. Barnes A. I., Wigby S., Boone J. M., Partridge L., Chapman T. Feeding, fecundity and lifespan in female *Drosophila melanogaster* // *Proc Biol Sci.* – 2008. – T. 275, № 1643. – C. 1675-83.
20. Barres B. A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease // *Neuron.* – 2008. – T. 60, № 3. – C. 430-40.
21. Bates K. E., Molnar J., Robinow S. The unfulfilled gene and nervous system development in *Drosophila* // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – T. 1849, № 2. – C. 217-23.

22. Bates K. E., Sung C. S., Robinow S. The unfulfilled gene is required for the development of mushroom body neuropil in *Drosophila* // *Neural Dev.* – 2010. – T. 5. – C. 4.
23. Bauer M., Katzenberger J. D., Hamm A. C., Bonaus M., Zinke I., Jaekel J., Pankratz M. J. Purine and folate metabolism as a potential target of sex-specific nutrient allocation in *Drosophila* and its implication for lifespan-reproduction tradeoff // *Physiol Genomics.* – 2006. – T. 25, № 3. – C. 393-404.
24. Bellen H. J., Levis R. W., Liao G., He Y., Carlson J. W., Tsang G., Evans-Holm M., Hiesinger P. R., Schulze K. L., Rubin G. M., Hoskins R. A., Spradling A. C. The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes // *Genetics.* – 2004. – T. 167, № 2. – C. 761-81.
25. Belov Kirdajova D., Kriska J., Tureckova J., Anderova M. Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells // *Front Cell Neurosci.* – 2020. – T. 14. – C. 51.
26. Beuchle D., Jaumouille E., Nagoshi E. The nuclear receptor unfulfilled is required for free-running clocks in *Drosophila* pacemaker neurons // *Curr Biol.* – 2012. – T. 22, № 13. – C. 1221-7.
27. Bhaskar V., Courey A. J. The MADF-BESS domain factor Dip3 potentiates synergistic activation by Dorsal and Twist // *Gene.* – 2002. – T. 299, № 1-2. – C. 173-84.

28. Bishop N. A., Lu T., Yankner B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline // *Nature*. – 2010. – T. 464, № 7288. – C. 529-35.
29. Booker R., Truman J. W. Postembryonic neurogenesis in the CNS of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. I. Neuroblast arrays and the fate of their progeny during metamorphosis // *J Comp Neurol*. – 1987. – T. 255, № 4. – C. 548-59.
30. Borchiellini C., Coulon J., Le Parco Y. The function of type IV collagen during *Drosophila* embryogenesis // *Roux Arch Dev Biol*. – 1996. – T. 205, № 7-8. – C. 468-475.
31. Bowman S. K., Rolland V., Betschinger J., Kinsey K. A., Emery G., Knoblich J. A. The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in *Drosophila* // *Dev Cell*. – 2008. – T. 14, № 4. – C. 535-46.
32. Brady T. F., Konkle T., Alvarez G. A., Oliva A. Visual long-term memory has a massive storage capacity for object details // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2008. – T. 105, № 38. – C. 14325-9.
33. Broughton S., Alic N., Slack C., Bass T., Ikeya T., Vinti G., Tommasi A. M., Driege Y., Hafen E., Partridge L. Reduction of DILP2 in *Drosophila* triages a metabolic phenotype from lifespan revealing redundancy and compensation among DILPs // *PLoS One*. – 2008. – T. 3, № 11. – C. e3721.
34. Broughton S. J., Piper M. D., Ikeya T., Bass T. M., Jacobson J., Driege Y., Martinez P., Hafen E., Withers D. J., Leivers S. J., Partridge L. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making

- insulin-like ligands // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2005. – T. 102, № 8. – C. 3105-10.
35. Bruce A. W., Donaldson I. J., Wood I. C., Yerbury S. A., Sadowski M. I., Chapman M., Gottgens B., Buckley N. J. Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2004. – T. 101, № 28. – C. 10458-63.
36. Brunet-Rossinni A. K., Austad S. N. Ageing studies on bats: a review // Biogerontology. – 2004. – T. 5, № 4. – C. 211-22.
37. Bruning J. C., Gautam D., Burks D. J., Gillette J., Schubert M., Orban P. C., Klein R., Krone W., Muller-Wieland D., Kahn C. R. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction // Science. – 2000. – T. 289, № 5487. – C. 2122-5.
38. Buehlmann C., Wozniak B., Goulard R., Webb B., Graham P., Niven J. E. Mushroom Bodies Are Required for Learned Visual Navigation, but Not for Innate Visual Behavior, in Ants // Curr Biol. – 2020. – T. 30, № 17. – C. 3438-3443 e2.
39. Bunt S., Hooley C., Hu N., Scahill C., Weavers H., Skaer H. Hemocyte-secreted type IV collagen enhances BMP signaling to guide renal tubule morphogenesis in *Drosophila* // Dev Cell. – 2010. – T. 19, № 2. – C. 296-306.
40. Bunu G., Toren D., Ion C. F., Barardo D., Sarghie L., Grigore L. G., de Magalhaes J. P., Fraifeld V. E., Tacutu R. SynergyAge, a curated database for synergistic and

- antagonistic interactions of longevity-associated genes // *Sci Data*. – 2020. – T. 7, № 1. – C. 366.
41. Bushey D., Hughes K. A., Tononi G., Cirelli C. Sleep, aging, and lifespan in *Drosophila* // *BMC Neurosci*. – 2010. – T. 11. – C. 56.
42. Busto G. U., Cervantes-Sandoval I., Davis R. L. Olfactory learning in *Drosophila* // *Physiology (Bethesda)*. – 2010. – T. 25, № 6. – C. 338-46.
43. Butler A. W., Ng M. Y., Hamshere M. L., Forabosco P., Wroe R., Al-Chalabi A., Lewis C. M., Powell J. F. Meta-analysis of linkage studies for Alzheimer's disease—a web resource // *Neurobiol Aging*. – 2009. – T. 30, № 7. – C. 1037-47.
44. Cabeza R., Anderson N. D., Locantore J. K., McIntosh A. R. Aging gracefully: compensatory brain activity in high-performing older adults // *Neuroimage*. – 2002. – T. 17, № 3. – C. 1394-402.
45. Cai H. N., Zhang Z., Adams J. R., Shen P. Genomic context modulates insulator activity through promoter competition // *Development*. – 2001. – T. 128, № 21. – C. 4339-47.
46. Cai Y., Chia W., Yang X. A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions // *EMBO J*. – 2001. – T. 20, № 7. – C. 1704-14.
47. Callaerts P., Halder G., Gehring W. J. PAX-6 in development and evolution // *Annu Rev Neurosci*. – 1997. – T. 20. – C. 483-532.

48. Calo E., Wysocka J. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? // *Mol Cell*. – 2013. – T. 49, № 5. – C. 825-37.
49. Campbell C., Goodrich K., Casey G., Beatty B. Cloning and mapping of a human gene (TBX2) sharing a highly conserved protein motif with the *Drosophila* omb gene // *Genomics*. – 1995. – T. 28, № 2. – C. 255-60.
50. Longevity: The Biology and Demography of Life Span. / Carey J. R. – Princeton: Princeton University Press, 2003.
51. Carlson B. M. Chapter 11 - Nervous System // *Human Embryology and Developmental Biology (Fifth Edition)* / Carlson B. M. – Philadelphia: W.B. Saunders, 2014. – C. 216-253.
52. Caron S. J., Ruta V., Abbott L. F., Axel R. Random convergence of olfactory inputs in the *Drosophila* mushroom body // *Nature*. – 2013. – T. 497, № 7447. – C. 113-7.
53. Carrasco A. E., McGinnis W., Gehring W. J., De Robertis E. M. Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes // *Cell*. – 1984. – T. 37, № 2. – C. 409-14.
54. Cayre M., Strambi C., Strambi A. Neurogenesis in an adult insect brain and its hormonal control // *Nature*. – 1994. – T. 368, № 6466. – C. 57-59.
55. Ceballos D., Cuadras J., Verdu E., Navarro X. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve // *J Anat*. – 1999. – T. 195 (Pt 4), № Pt 4. – C. 563-76.

56. Celis-Morales C. A., Gray S., Petermann F., Iliodromiti S., Welsh P., Lyall D. M., Anderson J., Pellicori P., Mackay D. F., Pell J. P., Sattar N., Gill J. M. R. Walking Pace Is Associated with Lower Risk of All-Cause and Cause-Specific Mortality // *Med Sci Sports Exerc.* – 2019. – T. 51, № 3. – C. 472-480.
57. Chahrour M. H., Yu T. W., Lim E. T., Ataman B., Coulter M. E., Hill R. S., Stevens C. R., Schubert C. R., Collaboration A. A. S., Greenberg M. E., Gabriel S. B., Walsh C. A. Whole-exome sequencing and homozygosity analysis implicate depolarization-regulated neuronal genes in autism // *PLoS Genet.* – 2012. – T. 8, № 4. – C. e1002635.
58. Chang S., Bray S. M., Li Z., Zarnescu D. C., He C., Jin P., Warren S. T. Identification of small molecules rescuing fragile X syndrome phenotypes in *Drosophila* // *Nat Chem Biol.* – 2008. – T. 4, № 4. – C. 256-63.
59. Chapouton P., Gartner A., Gotz M. The role of Pax6 in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia // *Development.* – 1999. – T. 126, № 24. – C. 5569-79.
60. Chen C. C., Wu J. K., Lin H. W., Pai T. P., Fu T. F., Wu C. L., Tully T., Chiang A. S. Visualizing long-term memory formation in two neurons of the *Drosophila* brain // *Science.* – 2012. – T. 335, № 6069. – C. 678-85.
61. Chen K., Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs // *Nat Rev Genet.* – 2007. – T. 8, № 2. – C. 93-103.

62. **Chow R. L., Altmann C. R., Lang R. A., Hemmati-Brivanlou A.** Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate // *Development*. – 1999. – T. 126, № 19. – C. 4213-22.
63. **Clancy D. J., Gems D., Harshman L. G., Oldham S., Stocker H., Hafen E., Leevers S. J., Partridge L.** Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein // *Science*. – 2001. – T. 292, № 5514. – C. 104-6.
64. **Clarke P. G. H.** Autophagy and Neuronal Death // *Encyclopedia of Neuroscience / Squire L. R.* – Oxford: Academic Press, 2009. – C. 1031-1037.
65. **Cognigni P., Felsenberg J., Waddell S.** Do the right thing: neural network mechanisms of memory formation, expression and update in *Drosophila* // *Curr Opin Neurobiol.* – 2018. – T. 49. – C. 51-58.
66. **Coletta L., Pagani M., Whitesell J. D., Harris J. A., Bernhardt B., Gozzi A.** Network structure of the mouse brain connectome with voxel resolution // *Sci Adv.* – 2020. – T. 6, № 51.
67. **Collett T. S.** Insect navigation: visual panoramas and the sky compass // *Curr Biol.* – 2008. – T. 18, № 22. – C. R1058-61.
68. **Consortium m., Roy S., Ernst J., Kharchenko P. V., Kheradpour P., Negre N., Eaton M. L., Landolin J. M., Bristow C. A., Ma L., Lin M. F., Washietl S., Arshinoff B. I., Ay F., Meyer P. E., Robine N., Washington N. L., Di Stefano L., Berezikov E., Brown C. D., Candeias R., Carlson J. W., Carr A., Jungreis I., Marbach D., Sealfon R., Tolstorukov M. Y., Will S., Alekseyenko A. A., Artieri C., Booth B. W., Brooks A. N., Dai Q., Davis C. A., Duff M. O., Feng X., Gorchakov A. A., Gu T., Henikoff**

- J. G., Kapranov P., Li R., MacAlpine H. K., Malone J., Minoda A., Nordman J., Okamura K., Perry M., Powell S. K., Riddle N. C., Sakai A., Samsonova A., Sandler J. E., Schwartz Y. B., Sher N., Spokony R., Sturgill D., van Baren M., Wan K. H., Yang L., Yu C., Feingold E., Good P., Guyer M., Lowdon R., Ahmad K., Andrews J., Berger B., Brenner S. E., Brent M. R., Cherbas L., Elgin S. C., Gingeras T. R., Grossman R., Hoskins R. A., Kaufman T. C., Kent W., Kuroda M. I., Orr-Weaver T., Perrimon N., Pirrotta V., Posakony J. W., Ren B., Russell S., Cherbas P., Graveley B. R., Lewis S., Micklem G., Oliver B., Park P. J., Celniker S. E., Henikoff S., Karpen G. H., Lai E. C., MacAlpine D. M., Stein L. D., White K. P., Kellis M. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE // *Science*. – 2010. – T. 330, № 6012. – C. 1787-97.
69. Conti B., Sanchez-Alavez M., Winsky-Sommerer R., Morale M. C., Lucero J., Brownell S., Fabre V., Huitron-Resendiz S., Henriksen S., Zorrilla E. P., de Lecea L., Bartfai T. Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span // *Science*. – 2006. – T. 314, № 5800. – C. 825-8.
70. Crews S. T. *Drosophila* Embryonic CNS Development: Neurogenesis, Gliogenesis, Cell Fate, and Differentiation // *Genetics*. – 2019. – T. 213, № 4. – C. 1111-1144.
71. Crowe S. L., Movsesyan V. A., Jorgensen T. J., Kondratyev A. Rapid phosphorylation of histone H2A.X following ionotropic glutamate receptor activation // *Eur J Neurosci*. – 2006. – T. 23, № 9. – C. 2351-61.

72. Crowner D., Le Gall M., Gates M. A., Giniger E. Notch steers *Drosophila* ISNb motor axons by regulating the Abl signaling pathway // *Curr Biol.* – 2003. – T. 13, № 11. – C. 967-72.
73. Cubas P., de Celis J. F., Campuzano S., Modolell J. Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc // *Genes Dev.* – 1991. – T. 5, № 6. – C. 996-1008.
74. Czerny T., Halder G., Kloter U., Souabni A., Gehring W. J., Busslinger M. twin of eyeless, a Second Pax-6 Gene of *Drosophila*, Acts Upstream of eyeless in the Control of Eye Development // *Molecular Cell.* – 1999. – T. 3, № 3. – C. 297-307.
75. David D. C. Aging and the aggregating proteome // *Front Genet.* – 2012. – T. 3. – C. 247.
76. Davis R. L., Giurfa M. Mushroom-body memories: an obituary prematurely written? // *Curr Biol.* – 2012. – T. 22, № 8. – C. R272-5.
77. Dempsey P. C., Musicha C., Rowlands A. V., Davies M., Khunti K., Razieh C., Timmins I., Zaccardi F., Codd V., Nelson C. P., Yates T., Samani N. J. Investigation of a UK biobank cohort reveals causal associations of self-reported walking pace with telomere length // *Commun Biol.* – 2022. – T. 5, № 1. – C. 381.
78. Dietzl G., Chen D., Schnorrer F., Su K. C., Barinova Y., Fellner M., Gasser B., Kinsey K., Oettel S., Scheiblauer S., Couto A., Marra V., Keleman K., Dickson B. J. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila* // *Nature.* – 2007. – T. 448, № 7150. – C. 151-6.

79. Dujardin F. Mémoire sur le système nerveux des insectes // *Ann Sci Nat Zool.* – 1850. – T. 14. – C. 195-206.
80. Engelkamp D., Rashbass P., Seawright A., van Heyningen V. Role of Pax6 in development of the cerebellar system // *Development.* – 1999. – T. 126, № 16. – C. 3585-96.
81. Erulkar S. D., Lentz T. L. nervous system // *Encyclopedia Britannica* изд, 2022. – C.
82. Felsenberg J., Barnstedt O., Cognigni P., Lin S., Waddell S. Re-evaluation of learned information in *Drosophila* // *Nature.* – 2017. – T. 544, № 7649. – C. 240-244.
83. Feng Z., Ko C. P. The role of glial cells in the formation and maintenance of the neuromuscular junction // *Ann N Y Acad Sci.* – 2008. – T. 1132. – C. 19-28.
84. Fernandez-Capetillo O., Lee A., Nussenzweig M., Nussenzweig A. H2AX: the histone guardian of the genome // *DNA Repair (Amst).* – 2004. – T. 3, № 8-9. – C. 959-67.
85. Finch C. E., Tanzi R. E. Genetics of aging // *Science.* – 1997. – T. 278, № 5337. – C. 407-11.
86. Flatt T. Survival costs of reproduction in *Drosophila* // *Exp Gerontol.* – 2011. – T. 46, № 5. – C. 369-75.

87. Flatt T., Min K. J., D'Alterio C., Villa-Cuesta E., Cumbers J., Lehmann R., Jones D. L., Tatar M. *Drosophila* germ-line modulation of insulin signaling and lifespan // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – T. 105, № 17. – C. 6368-73.
88. Frakes A. E., Metcalf M. G., Tronnes S. U., Bar-Ziv R., Durieux J., Gildea H. K., Kandahari N., Monshietehadi S., Dillin A. Four glial cells regulate ER stress resistance and longevity via neuropeptide signaling in *C. elegans* // *Science.* – 2020. – T. 367, № 6476. – C. 436-440.
89. Franco B., Bogdanik L., Bobinnec Y., Debec A., Bockaert J., Parmentier M. L., Grau Y. Shaggy, the homolog of glycogen synthase kinase 3, controls neuromuscular junction growth in *Drosophila* // *J Neurosci.* – 2004. – T. 24, № 29. – C. 6573-7.
90. Fridell Y. W., Hoh M., Kreneisz O., Hosier S., Chang C., Scantling D., Mulkey D. K., Helfand S. L. Increased uncoupling protein (UCP) activity in *Drosophila* insulin-producing neurons attenuates insulin signaling and extends lifespan // *Aging (Albany NY).* – 2009. – T. 1, № 8. – C. 699-713.
91. Fridell Y. W., Sanchez-Blanco A., Silvia B. A., Helfand S. L. Targeted expression of the human uncoupling protein 2 (hUCP2) to adult neurons extends life span in the fly // *Cell Metab.* – 2005. – T. 1, № 2. – C. 145-52.
92. Friedrich M. Ancient genetic redundancy of *eyeless* and *twins of eyeless* in the arthropod ocular segment // *Dev Biol.* – 2017. – T. 432, № 1. – C. 192-200.

93. Fu Y., Zhu J. Y., Richman A., Zhao Z., Zhang F., Ray P. E., Han Z. A *Drosophila* model system to assess the function of human monogenic podocyte mutations that cause nephrotic syndrome // *Hum Mol Genet.* – 2017. – T. 26, № 4. – C. 768-780.
94. Fujisawa K. Some observations on the skeletal musculature of aged rats-III. Abnormalities of terminal axons found in motor end-plates // *Exp Gerontol.* – 1976. – T. 11, № 1-2. – C. 43-7.
95. Fuse N., Matakatsu H., Taniguchi M., Hayashi S. Snail-type zinc finger proteins prevent neurogenesis in Scutoid and transgenic animals of *Drosophila* // *Dev Genes Evol.* – 1999. – T. 209, № 10. – C. 573-80.
96. Gallo S. M., Gerrard D. T., Miner D., Simich M., Des Soye B., Bergman C. M., Halfon M. S. REDfly v3.0: toward a comprehensive database of transcriptional regulatory elements in *Drosophila* // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – T. 39, № Database issue. – C. D118-23.
97. Garcia M. C., Abbasi M., Singh S., He Q. Role of *Drosophila* gene *dunc-115* in nervous system // *Invert Neurosci.* – 2007. – T. 7, № 2. – C. 119-28.
98. Garcia-Manteiga J. M., Bonfiglio S., Folladori L., Malosio M. L., Lazarevic D., Stupka E., Cittaro D., Meldolesi J. REST-Governed Gene Expression Profiling in a Neuronal Cell Model Reveals Novel Direct and Indirect Processes of Repression and Up-Regulation // *Front Cell Neurosci.* – 2015. – T. 9. – C. 438.

99. Garès V., Andrieu S., Dupuy J.-F., Savy N. On the Fleming–Harrington test for late effects in prevention randomized controlled trials // *Journal of Statistical Theory and Practice*. – 2017. – T. 11, № 3. – C. 418-435.
100. Garrity P. A., Goodman M. B., Samuel A. D., Sengupta P. Running hot and cold: behavioral strategies, neural circuits, and the molecular machinery for thermotaxis in *C. elegans* and *Drosophila* // *Genes Dev.* – 2010. – T. 24, № 21. – C. 2365-82.
101. Gehring K. B., Heufelder K., Depner H., Kersting I., Sigrist S. J., Eisenhardt D. Age-associated increase of the active zone protein Bruchpilot within the honeybee mushroom body // *PLoS One*. – 2017. – T. 12, № 4. – C. e0175894.
102. Gehring W. J. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types // *Zoology*. – 2001. – T. 104, № 3-4. – C. 171-183.
103. Gehring W. J., Affolter M., Burglin T. Homeodomain proteins // *Annu Rev Biochem.* – 1994. – T. 63. – C. 487-526.
104. Gehring W. J., Ikeo K. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution // *Trends Genet.* – 1999. – T. 15, № 9. – C. 371-7.
105. Geiser F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor // *Annu Rev Physiol.* – 2004. – T. 66. – C. 239-74.

106. Gendre N., Luer K., Friche S., Grillenzoni N., Ramaekers A., Technau G. M., Stocker R. F. Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila* // *Development*. – 2004. – T. 131, № 1. – C. 83-92.
107. Gerhard S., Andrade I., Fetter R. D., Cardona A., Schneider-Mizell C. M. Conserved neural circuit structure across *Drosophila* larval development revealed by comparative connectomics // *Elife*. – 2017. – T. 6.
108. Ghosh I., Liu C. S., Swardfager W., Lanctot K. L., Anderson N. D. The potential roles of excitatory-inhibitory imbalances and the repressor element-1 silencing transcription factor in aging and aging-associated diseases // *Mol Cell Neurosci*. – 2021. – T. 117. – C. 103683.
109. Glaser T., Jepeal L., Edwards J. G., Young S. R., Favor J., Maas R. L. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects // *Nat Genet*. – 1994. – T. 7, № 4. – C. 463-71.
110. Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease // *Nature*. – 1991. – T. 349, № 6311. – C. 704-6.
111. Gotz M., Stoykova A., Gruss P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex // *Neuron*. – 1998. – T. 21, № 5. – C. 1031-44.
112. Gramates L. S., Agapite J., Attrill H., Calvi B. R., Crosby M. A., Dos Santos G., Goodman J. L., Goutte-Gattat D., Jenkins V. K., Kaufman T., Larkin A.,

- Matthews B. B., Millburn G., Strelets V. B., the FlyBase C. Fly Base: a guided tour of highlighted features // *Genetics*. – 2022. – T. 220, № 4.
113. Green P., Hartenstein A. Y., Hartenstein V. The embryonic development of the *Drosophila* visual system // *Cell Tissue Res*. – 1993. – T. 273, № 3. – C. 583-98.
114. Gregson N. A., Hall S. M. A quantitative analysis of the effects of the intraneural injection of lysophosphatidyl choline // *J Cell Sci*. – 1973. – T. 13, № 1. – C. 257-77.
115. Grenningloh G., Rehm E. J., Goodman C. S. Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule // *Cell*. – 1991. – T. 67, № 1. – C. 45-57.
116. Gruntman E., Turner G. C. Integration of the olfactory code across dendritic claws of single mushroom body neurons // *Nat Neurosci*. – 2013. – T. 16, № 12. – C. 1821-9.
117. Guerreiro R., Wojtas A., Bras J., Carrasquillo M., Rogaeva E., Majounie E., Cruchaga C., Sassi C., Kauwe J. S., Younkin S., Hazrati L., Collinge J., Pocock J., Lashley T., Williams J., Lambert J. C., Amouyel P., Goate A., Rademakers R., Morgan K., Powell J., St George-Hyslop P., Singleton A., Hardy J., Alzheimer Genetic Analysis G. TREM2 variants in Alzheimer's disease // *N Engl J Med*. – 2013. – T. 368, № 2. – C. 117-27.

118. Gupta V. K., Pech U., Bhukel A., Fulterer A., Ender A., Mauermann S. F., Andlauer T. F., Antwi-Adjei E., Beuschel C., Thriene K., Maglione M., Quentin C., Bushow R., Schwarzel M., Mielke T., Madeo F., Dengjel J., Fiala A., Sigrist S. J. Spermidine Suppresses Age-Associated Memory Impairment by Preventing Adverse Increase of Presynaptic Active Zone Size and Release // *PLoS Biol.* – 2016. – T. 14, № 9. – C. e1002563.
119. Halder G., Callaerts P., Gehring W. J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila* // *Science.* – 1995. – T. 267, № 5205. – C. 1788-92.
120. Halfon M. S. REDfly regulatory element database for *Drosophila* v5.3.1. // Book REDfly regulatory element database for *Drosophila* v5.3.1. / Editor, 2014.
121. Han S. K., Lee D., Lee H., Kim D., Son H. G., Yang J. S., Lee S. V., Kim S. OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research // *Oncotarget.* – 2016. – T. 7, № 35. – C. 56147-56152.
122. Hartl M., Loschek L. F., Stephan D., Siju K. P., Knappmeyer C., Kadow I. C. A new Prospero and microRNA-279 pathway restricts CO2 receptor neuron formation // *J Neurosci.* – 2011. – T. 31, № 44. – C. 15660-73.
123. Harvanek Z. M., Fogelman N., Xu K., Sinha R. Psychological and biological resilience modulates the effects of stress on epigenetic aging // *Transl Psychiatry.* – 2021. – T. 11, № 1. – C. 601.

124. Hawkins R. D., Byrne J. H. Associative learning in invertebrates // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2015. – T. 7, № 5. – C. a021709.
125. Hayashi S., Hirose S., Metcalfe T., Shirras A. D. Control of imaginal cell development by the escargot gene of *Drosophila* // *Development*. – 1993. – T. 118, № 1. – C. 105-15.
126. Hazelett D. J., Bourouis M., Walldorf U., Treisman J. E. decapentaplegic and wingless are regulated by eyes absent and eyegone and interact to direct the pattern of retinal differentiation in the eye disc // *Development*. – 1998. – T. 125, № 18. – C. 3741-51.
127. Hekmat-Safe D. S., Dang K. N., Tanouye M. A. Seizure suppression by gain-of-function escargot mutations // *Genetics*. – 2005. – T. 169, № 3. – C. 1477-93.
128. Deep Homology?: Uncanny Similarities of Humans and Flies Uncovered by Evo-Devo. / Held J., L. – Cambridge: Cambridge University Press, 2017.
129. Hige T., Aso Y., Modi M. N., Rubin G. M., Turner G. C. Heterosynaptic Plasticity Underlies Aversive Olfactory Learning in *Drosophila* // *Neuron*. – 2015. – T. 88, № 5. – C. 985-998.
130. Hill R. E., Favor J., Hogan B. L., Ton C. C., Saunders G. F., Hanson I. M., Prosser J., Jordan T., Hastie N. D., van Heyningen V. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene // *Nature*. – 1991. – T. 354, № 6354. – C. 522-5.

131. Hofmeyer K., Kretzschmar D., Pflugfelder G. O. Optomotor-blind expression in glial cells is required for correct axonal projection across the *Drosophila* inner optic chiasm // *Dev Biol.* – 2008. – T. 315, № 1. – C. 28-41.
132. Holland P. W. Evolution of homeobox genes // *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* – 2013. – T. 2, № 1. – C. 31-45.
133. Holland P. W., Booth H. A., Bruford E. A. Classification and nomenclature of all human homeobox genes // *BMC Biol.* – 2007. – T. 5. – C. 47.
134. Hollingworth P., Harold D., Sims R., Gerrish A., Lambert J. C., Carrasquillo M. M., Abraham R., Hamshere M. L., Pahwa J. S., Moskvina V., Dowzell K., Jones N., Stretton A., Thomas C., Richards A., Ivanov D., Widdowson C., Chapman J., Lovestone S., Powell J., Proitsi P., Lupton M. K., Brayne C., Rubinsztein D. C., Gill M., Lawlor B., Lynch A., Brown K. S., Passmore P. A., Craig D., McGuinness B., Todd S., Holmes C., Mann D., Smith A. D., Beaumont H., Warden D., Wilcock G., Love S., Kehoe P. G., Hooper N. M., Vardy E. R., Hardy J., Mead S., Fox N. C., Rossor M., Collinge J., Maier W., Jessen F., Ruther E., Schurmann B., Heun R., Kolsch H., van den Bussche H., Heuser I., Kornhuber J., Wiltfang J., Dichgans M., Frolich L., Hampel H., Gallacher J., Hull M., Rujescu D., Giegling I., Goate A. M., Kauwe J. S., Cruchaga C., Nowotny P., Morris J. C., Mayo K., Sleegers K., Bettens K., Engelborghs S., De Deyn P. P., Van Broeckhoven C., Livingston G., Bass N. J., Gurling H., McQuillin A., Gwilliam R., Deloukas P., Al-Chalabi A., Shaw C. E., Tsolaki M., Singleton A. B., Guerreiro R., Muhleisen T. W., Nothen M. M., Moebus

- S., Jockel K. H., Klopp N., Wichmann H. E., Pankratz V. S., Sando S. B., Aasly J. O., Barcikowska M., Wszolek Z. K., Dickson D. W., Graff-Radford N. R., Petersen R. C., Alzheimer's Disease Neuroimaging I., van Duijn C. M., Breteler M. M., Ikram M. A., DeStefano A. L., Fitzpatrick A. L., Lopez O., Launer L. J., Seshadri S., consortium C., Berr C., Champion D., Epelbaum J., Dartigues J. F., Tzourio C., Alperovitch A., Lathrop M., consortium E., Feulner T. M., Friedrich P., Riehle C., Krawczak M., Schreiber S., Mayhaus M., Nicolhaus S., Wagenpfeil S., Steinberg S., Stefansson H., Stefansson K., Snaedal J., Bjornsson S., Jonsson P. V., Chouraki V., Genier-Boley B., Hiltunen M., Soininen H., Combarros O., Zelenika D., Delepine M., Bullido M. J., Pasquier F., Mateo I., Frank-Garcia A., Porcellini E., Hanon O., Coto E., Alvarez V., Bosco P., Siciliano G., Mancuso M., Panza F., Solfrizzi V., Nacmias B., Sorbi S., Bossu P., Piccardi P., Arosio B., Annoni G., Seripa D., Pilotto A., Scarpini E., Galimberti D., Brice A., Hannequin D., Licastro F., Jones L., Holmans P. A., Jonsson T., Riemenschneider M., Morgan K., Younkin S. G., Owen M. J., O'Donovan M., Amouyel P., Williams J. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease // *Nat Genet.* – 2011. – T. 43, № 5. – C. 429-35.
135. Holst B. D., Wang Y., Jones F. S., Edelman G. M. A binding site for Pax proteins regulates expression of the gene for the neural cell adhesion molecule in the embryonic spinal cord // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – T. 94, № 4. – C. 1465-70.

136. Hou Y., Dan X., Babbar M., Wei Y., Hasselbalch S. G., Croteau D. L., Bohr V. A. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease // *Nat Rev Neurol.* – 2019. – T. 15, № 10. – C. 565-581.
137. Huang S., Piao C., Beuschel C. B., Gotz T., Sigrist S. J. Presynaptic Active Zone Plasticity Encodes Sleep Need in *Drosophila* // *Curr Biol.* – 2020. – T. 30, № 6. – C. 1077-1091 e5.
138. Ito K., Hotta Y. Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster* // *Dev Biol.* – 1992. – T. 149, № 1. – C. 134-48.
139. Ito K., Shinomiya K., Ito M., Armstrong J. D., Boyan G., Hartenstein V., Harzsch S., Heisenberg M., Homberg U., Jenett A., Keshishian H., Restifo L. L., Rossler W., Simpson J. H., Strausfeld N. J., Strauss R., Vosshall L. B., Insect Brain Name Working G. A systematic nomenclature for the insect brain // *Neuron.* – 2014. – T. 81, № 4. – C. 755-65.
140. Ivantsov A. Y. Feeding traces of proarticulata—the Vendian metazoa // *Paleontological Journal.* – 2011. – T. 45, № 3. – C. 237-248.
141. Iyer A., Tole S. Neuronal diversity and reciprocal connectivity between the vertebrate hippocampus and septum // *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* – 2020. – T. 9, № 4. – C. e370.
142. Jacobsson L., Kronhamn J., Rasmuson-Lestander A. The *Drosophila* Pax6 paralogs have different functions in head development but can partially substitute for each other // *Mol Genet Genomics.* – 2009. – T. 282, № 3. – C. 217-31.

143. Jang Y. C., Van Remmen H. Age-associated alterations of the neuromuscular junction // *Exp Gerontol.* – 2011. – T. 46, № 2-3. – C. 193-8.
144. Janssen I., Shepard D. S., Katzmarzyk P. T., Roubenoff R. The healthcare costs of sarcopenia in the United States // *J Am Geriatr Soc.* – 2004. – T. 52, № 1. – C. 80-5.
145. Jasper H. Exploring the physiology and pathology of aging in the intestine of *Drosophila melanogaster* // *Invertebr Reprod Dev.* – 2015. – T. 59, № sup1. – C. 51-58.
146. Jekely G. The chemical brain hypothesis for the origin of nervous systems // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2021. – T. 376, № 1821. – C. 20190761.
147. Jekely G. Origin and early evolution of neural circuits for the control of ciliary locomotion // *Proc Biol Sci.* – 2011. – T. 278, № 1707. – C. 914-22.
148. Jeong D. E., Artan M., Seo K., Lee S. J. Regulation of lifespan by chemosensory and thermosensory systems: findings in invertebrates and their implications in mammalian aging // *Front Genet.* – 2012. – T. 3. – C. 218.
149. Jimenez F., Campos-Ortega J. A. Defective neuroblast commitment in mutants of the achaete-scute complex and adjacent genes of *D. melanogaster* // *Neuron.* – 1990. – T. 5, № 1. – C. 81-9.
150. Jones M. A., Grotewiel M. *Drosophila* as a model for age-related impairment in locomotor and other behaviors // *Exp Gerontol.* – 2011. – T. 46, № 5. – C. 320-5.

151. Jonsson T., Stefansson H., Steinberg S., Jonsdottir I., Jonsson P. V., Snaedal J., Bjornsson S., Huttenlocher J., Levey A. I., Lah J. J., Rujescu D., Hampel H., Giegling I., Andreassen O. A., Engedal K., Ulstein I., Djurovic S., Ibrahim-Verbaas C., Hofman A., Ikram M. A., van Duijn C. M., Thorsteinsdottir U., Kong A., Stefansson K. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease // *N Engl J Med.* – 2013. – T. 368, № 2. – C. 107-16.
152. Jushaj A., Churgin M., Yao B., De La Torre M., Fang-Yen C., Temmerman L. Optimized criteria for locomotion-based healthspan evaluation in *C. elegans* using the WorMotel system // *PLoS One.* – 2020. – T. 15, № 3. – C. e0229583.
153. Kagias K., Nehammer C., Pocock R. Neuronal responses to physiological stress // *Front Genet.* – 2012. – T. 3. – C. 222.
154. Kammermeier L., Leemans R., Hirth F., Flister S., Wenger U., Walldorf U., Gehring W. J., Reichert H. Differential expression and function of the *Drosophila* Pax6 genes *eyeless* and *twin of eyeless* in embryonic central nervous system development // *Mech Dev.* – 2001. – T. 103, № 1-2. – C. 71-8.
155. Kandel E., Abel T. Neuropeptides, adenylyl cyclase, and memory storage // *Science.* – 1995. – T. 268, № 5212. – C. 825-6.
156. Principles of Neural Science. / Kandel E. R., D K. J., Mack S. H., Siegelbaum S. A. – 6 изд. – New York: McGraw Hill / Medical, 2020.
157. Principles of neural science. / Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M., Siegelbaum S., Hudspeth A. J., Mack S.: McGraw-hill New York, 2000.

158. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms // *Protein Sci.* – 2019. – T. 28, № 11. – C. 1947-1951.
159. Kanehisa M., Furumichi M., Sato Y., Kawashima M., Ishiguro-Watanabe M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes // *Nucleic Acids Res.* – 2022.
160. Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – T. 28, № 1. – C. 27-30.
161. Kaplan E. L., Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations // *Journal of the American Statistical Association.* – 1958. – T. 53, № 282. – C. 457-481.
162. Kasozi K. I., Namubiru S., Kiconco O., Kinyi H. W., Ssempijja F., Ezeonwumelu J. O. C., Ninsiima H. I., Okpanachi A. O. Low concentrations of monosodium glutamate (MSG) are safe in male *Drosophila melanogaster* // *BMC Res Notes.* – 2018. – T. 11, № 1. – C. 670.
163. Kawano H., Fukuda T., Kubo K., Horie M., Uyemura K., Takeuchi K., Osumi N., Eto K., Kawamura K. Pax-6 is required for thalamocortical pathway formation in fetal rats // *The Journal of Comparative Neurology.* – 1999. – T. 408, № 2. – C. 147-160.
164. Kikuchi A., Ohashi S., Fuse N., Ohta T., Suzuki M., Suzuki Y., Fujita T., Miyamoto T., Aonishi T., Miyakawa H., Morimoto T. Experience-dependent

- plasticity of the optomotor response in *Drosophila melanogaster* // *Dev Neurosci.* – 2012. – T. 34, № 6. – C. 533-42.
165. Kim H. J., Ahn H. J., Lee S., Kim J. H., Park J., Jeon S. H., Kim S. H. Intrinsic dorsoventral patterning and extrinsic EGFR signaling genes control glial cell development in the *Drosophila* nervous system // *Neuroscience.* – 2015. – T. 307. – C. 242-52.
166. Kioussi C., O'Connell S., St-Onge L., Treier M., Gleiberman A. S., Gruss P., Rosenfeld M. G. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1999. – T. 96, № 25. – C. 14378-82.
167. Kissinger C. R., Liu B. S., Martin-Blanco E., Kornberg T. B., Pabo C. O. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions // *Cell.* – 1990. – T. 63, № 3. – C. 579-90.
168. Klimovich A. V., Bosch T. C. G. Rethinking the Role of the Nervous System: Lessons From the Hydra Holobiont // *Bioessays.* – 2018. – T. 40, № 9. – C. e1800060.
169. Knapek S., Sigrist S., Tanimoto H. Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory // *J Neurosci.* – 2011. – T. 31, № 9. – C. 3453-8.

170. Koper A., Schenck A., Prokop A. Analysis of adhesion molecules and basement membrane contributions to synaptic adhesion at the *Drosophila* embryonic NMJ // *PLoS One*. – 2012. – T. 7, № 4. – C. e36339.
171. Korzelius J., Naumann S. K., Loza-Coll M. A., Chan J. S., Dutta D., Oberheim J., Glasser C., Southall T. D., Brand A. H., Jones D. L., Edgar B. A. Escargot maintains stemness and suppresses differentiation in *Drosophila* intestinal stem cells // *EMBO J*. – 2014. – T. 33, № 24. – C. 2967-82.
172. Kounatidis I., Chtarbanova S. Role of Glial Immunity in Lifespan Determination: A *Drosophila* Perspective // *Front Immunol*. – 2018. – T. 9. – C. 1362.
173. Kozlov A., Jaumouille E., Machado Almeida P., Koch R., Rodriguez J., Abruzzi K. C., Nagoshi E. A Screening of UNF Targets Identifies Rnb, a Novel Regulator of *Drosophila* Circadian Rhythms // *J Neurosci*. – 2017. – T. 37, № 28. – C. 6673-6685.
174. Kruskal W. H., Wallis W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis // *Journal of the American Statistical Association*. – 1952. – T. 47, № 260. – C. 583-621.
175. Kunst M., Laurell E., Mokayes N., Kramer A., Kubo F., Fernandes A. M., Forster D., Dal Maschio M., Baier H. A Cellular-Resolution Atlas of the Larval Zebrafish Brain // *Neuron*. – 2019. – T. 103, № 1. – C. 21-38 e5.

176. Kunz T., Kraft K. F., Technau G. M., Urbach R. Origin of Drosophila mushroom body neuroblasts and generation of divergent embryonic lineages // *Development*. – 2012. – T. 139, № 14. – C. 2510-22.
177. Kurusu M., Nagao T., Walldorf U., Flister S., Gehring W. J., Furukubo-Tokunaga K. Genetic control of development of the mushroom bodies, the associative learning centers in the Drosophila brain, by the eyeless, twin of eyeless, and Dachshund genes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2000. – T. 97, № 5. – C. 2140-4.
178. Kvon E. Z., Kazmar T., Stampfel G., Yanez-Cuna J. O., Pagani M., Schernhuber K., Dickson B. J., Stark A. Genome-scale functional characterization of Drosophila developmental enhancers in vivo // *Nature*. – 2014. – T. 512, № 7512. – C. 91-5.
179. La Rosa C., Bonfanti L. Brain Plasticity in Mammals: An Example for the Role of Comparative Medicine in the Neurosciences // *Front Vet Sci*. – 2018. – T. 5. – C. 274.
180. Lagisz M., Hector K. L., Nakagawa S. Life extension after heat shock exposure: assessing meta-analytic evidence for hormesis // *Ageing Res Rev*. – 2013. – T. 12, № 2. – C. 653-60.
181. Lambert J. C., Heath S., Even G., Champion D., Slegers K., Hiltunen M., Combarros O., Zelenika D., Bullido M. J., Tavernier B., Letenneur L., Bettens K., Berr C., Pasquier F., Fievet N., Barberger-Gateau P., Engelborghs S., De Deyn P.,

- Mateo I., Franck A., Helisalmi S., Porcellini E., Hanon O., European Alzheimer's Disease Initiative I., de Pancorbo M. M., Lendon C., Dufouil C., Jaillard C., Leveillard T., Alvarez V., Bosco P., Mancuso M., Panza F., Nacmias B., Bossu P., Piccardi P., Annoni G., Seripa D., Galimberti D., Hannequin D., Licastro F., Soininen H., Ritchie K., Blanche H., Dartigues J. F., Tzourio C., Gut I., Van Broeckhoven C., Alperovitch A., Lathrop M., Amouyel P. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease // *Nat Genet.* – 2009. – T. 41, № 10. – C. 1094-9.
182. Lee J. H., Overstreet E., Fitch E., Fleenor S., Fischer J. A. *Drosophila* liquid facets-Related encodes Golgi epsin and is an essential gene required for cell proliferation, growth, and patterning // *Dev Biol.* – 2009. – T. 331, № 1. – C. 1-13.
183. Lee S. J., Kenyon C. Regulation of the longevity response to temperature by thermosensory neurons in *Caenorhabditis elegans* // *Curr Biol.* – 2009. – T. 19, № 9. – C. 715-22.
184. Lee T., Lee A., Luo L. Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast // *Development.* – 1999. – T. 126, № 18. – C. 4065-76.
185. Leiser S. F., Miller H., Rossner R., Fletcher M., Leonard A., Primitivo M., Rintala N., Ramos F. J., Miller D. L., Kaeberlein M. Cell nonautonomous activation of flavin-containing monooxygenase promotes longevity and health span // *Science.* – 2015. – T. 350, № 6266. – C. 1375-1378.

186. Levine M., Rubin G. M., Tjian R. Human DNA sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of *Drosophila* // *Cell*. – 1984. – T. 38, № 3. – C. 667-73.
187. Levine M. E., Crimmins E. M. A Genetic Network Associated With Stress Resistance, Longevity, and Cancer in Humans // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. – 2016. – T. 71, № 6. – C. 703-12.
188. Levine R. B., Morton D. B., Restifo L. L. Remodeling of the insect nervous system // *Curr Opin Neurobiol*. – 1995. – T. 5, № 1. – C. 28-35.
189. Levine R. B., Truman J. W. Metamorphosis of the insect nervous system: changes in morphology and synaptic interactions of identified neurones // *Nature*. – 1982. – T. 299, № 5880. – C. 250-2.
190. Liao P. C., Lin H. Y., Yuh C. H., Yu L. K., Wang H. D. The effect of neuronal expression of heat shock proteins 26 and 27 on lifespan, neurodegeneration, and apoptosis in *Drosophila* // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2008. – T. 376, № 4. – C. 637-41.
191. Libert S., Zwiener J., Chu X., Vanvoorhies W., Roman G., Pletcher S. D. Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors // *Science*. – 2007. – T. 315, № 5815. – C. 1133-7.
192. Lin C.-T., He C.-W., Huang T.-T., Pan C.-L. Longevity control by the nervous system: Sensory perception, stress response and beyond // *Translational Medicine of Aging*. – 2017. – T. 1. – C. 41-51.

193. Lin S., Huang Y., Lee T. Nuclear receptor unfulfilled regulates axonal guidance and cell identity of *Drosophila* mushroom body neurons // *PLoS One*. – 2009. – T. 4, № 12. – C. e8392.
194. Liu N., Schoch K., Luo X., Pena L. D. M., Bhavana V. H., Kukolich M. K., Stringer S., Powis Z., Radtke K., Mroske C., Deak K. L., McDonald M. T., McConkie-Rosell A., Markert M. L., Kranz P. G., Stong N., Need A. C., Bick D., Amaral M. D., Worthey E. A., Levy S., Undiagnosed Diseases N., Wangler M. F., Bellen H. J., Shashi V., Yamamoto S. Functional variants in *TBX2* are associated with a syndromic cardiovascular and skeletal developmental disorder // *Hum Mol Genet*. – 2018. – T. 27, № 14. – C. 2454-2465.
195. Liu X., Somel M., Tang L., Yan Z., Jiang X., Guo S., Yuan Y., He L., Oleksiak A., Zhang Y., Li N., Hu Y., Chen W., Qiu Z., Paabo S., Khaitovich P. Extension of cortical synaptic development distinguishes humans from chimpanzees and macaques // *Genome Res*. – 2012. – T. 22, № 4. – C. 611-22.
196. Long S. K., Fulkerson E., Breese R., Hernandez G., Davis C., Melton M. A., Chandran R. R., Butler N., Jiang L., Estes P. A comparison of midline and tracheal gene regulation during *Drosophila* development // *PLoS One*. – 2014. – T. 9, № 1. – C. e85518.
197. Lopez-Otin C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging // *Cell*. – 2013. – T. 153, № 6. – C. 1194-217.

198. Loza-Coll M. A., Jones D. L. Simultaneous control of stemness and differentiation by the transcription factor Escargot in adult stem cells: How can we tease them apart? // *Fly (Austin)*. – 2016. – T. 10, № 2. – C. 53-9.
199. Loza-Coll M. A., Southall T. D., Sandall S. L., Brand A. H., Jones D. L. Regulation of *Drosophila* intestinal stem cell maintenance and differentiation by the transcription factor Escargot // *EMBO J.* – 2014. – T. 33, № 24. – C. 2983-96.
200. Lu T., Pan Y., Kao S. Y., Li C., Kohane I., Chan J., Yankner B. A. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain // *Nature*. – 2004. – T. 429, № 6994. – C. 883-91.
201. Ludatscher R. M., Silbermann M., Gershon D., Reznick A. Evidence of Schwann cell degeneration in the aging mouse motor end-plate region // *Exp Gerontol.* – 1985. – T. 20, № 2. – C. 81-91.
202. Lyman C. P., O'Brien R. C., Greene G. C., Papafrangos E. D. Hibernation and Longevity in the Turkish Hamster
203. *Mesocricetus brandti* // *Science*. – 1981. – T. 212, № 4495. – C. 668-670.
204. Lyu Y. L., Lin C. P., Azarova A. M., Cai L., Wang J. C., Liu L. F. Role of topoisomerase IIbeta in the expression of developmentally regulated genes // *Mol Cell Biol.* – 2006. – T. 26, № 21. – C. 7929-41.
205. Mackay T. F., Richards S., Stone E. A., Barbadilla A., Ayroles J. F., Zhu D., Casillas S., Han Y., Magwire M. M., Cridland J. M., Richardson M. F., Anholt R. R., Barron M., Bess C., Blankenburg K. P., Carbone M. A., Castellano D., Chaboub

- L., Duncan L., Harris Z., Javaid M., Jayaseelan J. C., Jhangiani S. N., Jordan K. W., Lara F., Lawrence F., Lee S. L., Librado P., Linheiro R. S., Lyman R. F., Mackey A. J., Munidasa M., Muzny D. M., Nazareth L., Newsham I., Perales L., Pu L. L., Qu C., Ramia M., Reid J. G., Rollmann S. M., Rozas J., Saada N., Turlapati L., Worley K. C., Wu Y. Q., Yamamoto A., Zhu Y., Bergman C. M., Thornton K. R., Mittelman D., Gibbs R. A. The *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel // *Nature*. – 2012. – T. 482, № 7384. – C. 173-8.
206. Mackie G. O. The Elementary Nervous System Revisited // *American Zoologist*. – 1990. – T. 30, № 4. – C. 907-920.
207. Madabhushi R., Gao F., Pfenning A. R., Pan L., Yamakawa S., Seo J., Rueda R., Phan T. X., Yamakawa H., Pao P. C., Stott R. T., Gjoneska E., Nott A., Cho S., Kellis M., Tsai L. H. Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes // *Cell*. – 2015. – T. 161, № 7. – C. 1592-605.
208. Magrassi L., Leto K., Rossi F. Lifespan of neurons is uncoupled from organismal lifespan // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2013. – T. 110, № 11. – C. 4374-9.
209. Magwire M. M., Yamamoto A., Carbone M. A., Roshina N. V., Symonenko A. V., Pasyukova E. G., Morozova T. V., Mackay T. F. Quantitative and molecular genetic analyses of mutations increasing *Drosophila* life span // *PLoS Genet*. – 2010. – T. 6, № 7. – C. e1001037.

210. Mair W., Morantte I., Rodrigues A. P., Manning G., Montminy M., Shaw R. J., Dillin A. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTA-1 and CREB // *Nature*. – 2011. – T. 470, № 7334. – C. 404-8.
211. Majounie E., Abramzon Y., Renton A. E., Perry R., Bassett S. S., Pletnikova O., Troncoso J. C., Hardy J., Singleton A. B., Traynor B. J. Repeat expansion in C9ORF72 in Alzheimer's disease // *N Engl J Med*. – 2012. – T. 366, № 3. – C. 283-4.
212. Mann H. B., Whitney D. R. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other // *The Annals of Mathematical Statistics*. – 1947. – T. 18, № 1. – C. 50-60.
213. Manzanares M., Locascio A., Nieto M. A. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution // *Trends Genet*. – 2001. – T. 17, № 4. – C. 178-81.
214. Marco R., Diaz C., Benguria A., Mateos J., Mas J., de Juan E. The role of gravity in the evolutionary emergence of multicellular complexity: microgravity effects on arthropod development and aging // *Adv Space Res*. – 1999. – T. 23, № 12. – C. 2075-82.
215. Marco R., Husson D., Herranz R., Mateos J., Medina F. J. *Drosophila melanogaster* and the future of 'evo-devo' biology in space. Challenges and problems in the path of an eventual colonization project outside the earth // *Adv Space Biol Med*. – 2003. – T. 9. – C. 41-81.

216. Mardon G., Solomon N. M., Rubin G. M. dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila* // *Development*. – 1994. – T. 120, № 12. – C. 3473-86.
217. Marin E. C., Watts R. J., Tanaka N. K., Ito K., Luo L. Developmentally programmed remodeling of the *Drosophila* olfactory circuit // *Development*. – 2005. – T. 132, № 4. – C. 725-37.
218. Mariotti A. The effects of chronic stress on health: new insights into the molecular mechanisms of brain-body communication // *Future Sci OA*. – 2015. – T. 1, № 3. – C. FSO23.
219. Martinez-Marmol R., Chai Y., Conroy J. N., Khan Z., Hong S. M., Kim S. B., Gormal R. S., Lee D. H., Lee J. K., Coulson E. J., Lee M. K., Kim S. Y., Meunier F. A. Hericerin derivatives activates a pan-neurotrophic pathway in central hippocampal neurons converging to ERK1/2 signaling enhancing spatial memory // *J Neurochem*. – 2023.
220. Martins R., Lithgow G. J., Link W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity // *Aging Cell*. – 2016. – T. 15, № 2. – C. 196-207.
221. Maslov A. V., Podkovyrov V. N. Upper Vendian in the east, northeast and north of East European Platform: Depositional processes and bio-tic evolution // *Litosfera*. – 2018. – T. 18, № 4. – C. 520-542.

222. Mastick G. S., Davis N. M., Andrew G. L., Easter S. S., Jr. Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain // *Development*. – 1997. – T. 124, № 10. – C. 1985-97.
223. Mazin P., Xiong J., Liu X., Yan Z., Zhang X., Li M., He L., Somel M., Yuan Y., Phoebe Chen Y. P., Li N., Hu Y., Fu N., Ning Z., Zeng R., Yang H., Chen W., Gelfand M., Khaitovich P. Widespread splicing changes in human brain development and aging // *Mol Syst Biol*. – 2013. – T. 9. – C. 633.
224. McGinnis W., Garber R. L., Wirz J., Kuroiwa A., Gehring W. J. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans // *Cell*. – 1984. – T. 37, № 2. – C. 403-8.
225. McGinnis W., Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning // *Cell*. – 1992. – T. 68, № 2. – C. 283-302.
226. McGinnis W., Levine M. S., Hafen E., Kuroiwa A., Gehring W. J. A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes // *Nature*. – 1984. – T. 308, № 5958. – C. 428-33.
227. McGraw E. A., O'Neill S. L. *Wolbachia pipientis*: intracellular infection and pathogenesis in *Drosophila* // *Curr Opin Microbiol*. – 2004. – T. 7, № 1. – C. 67-70.
228. McIntyre R. L., Rahman M., Vanapalli S. A., Houtkooper R. H., Janssens G. E. Biological Age Prediction From Wearable Device Movement Data Identifies

- Nutritional and Pharmacological Interventions for Healthy Aging // *Front Aging.* – 2021. – T. 2. – C. 708680.
229. McKinney B. C., Oh H., Sibille E. Age-by-disease biological interactions: implications for late-life depression // *Front Genet.* – 2012. – T. 3. – C. 237.
230. McMartin D. N., O'Connor J. A., Jr. Effect of age on axoplasmic transport of cholinesterase in rat sciatic nerves // *Mech Ageing Dev.* – 1979. – T. 10, № 3-4. – C. 241-8.
231. Mecocci P., MacGarvey U., Kaufman A. E., Koontz D., Shoffner J. M., Wallace D. C., Beal M. F. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain // *Ann Neurol.* – 1993. – T. 34, № 4. – C. 609-16.
232. Meech R., Kallunki P., Edelman G. M., Jones F. S. A binding site for homeodomain and Pax proteins is necessary for L1 cell adhesion molecule gene expression by Pax-6 and bone morphogenetic proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1999. – T. 96, № 5. – C. 2420-5.
233. Meinertzhagen I. A. Of what use is connectomics? A personal perspective on the *Drosophila* connectome // *J Exp Biol.* – 2018. – T. 221, № Pt 10.
234. Millen K. J., Wurst W., Herrup K., Joyner A. L. Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants // *Development.* – 1994. – T. 120, № 3. – C. 695-706.

235. Mitsis T., Efthimiadou A., Bacopoulou F., Vlachakis D., Chrousos G., Eliopoulos E. Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review) // World Academy of Sciences Journal. – 2020.
236. Mizunami M., Iwasaki M., Nishikawa M., Okada R. Modular structures in the mushroom body of the cockroach // Neurosci Lett. – 1997. – T. 229, № 3. – C. 153-6.
237. Mombaerts P. How smell develops // Nat Neurosci. – 2001. – T. 4 Suppl. – C. 1192-8.
238. Mori K., Nagao H., Yoshihara Y. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information // Science. – 1999. – T. 286, № 5440. – C. 711-5.
239. Morley J. F., Morimoto R. I. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones // Mol Biol Cell. – 2004. – T. 15, № 2. – C. 657-64.
240. Moroz L. L. The genealogy of genealogy of neurons // Communicative & Integrative Biology. – 2015. – T. 7, № 6.
241. Morrow G., Samson M., Michaud S., Tanguay R. M. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress // FASEB J. – 2004. – T. 18, № 3. – C. 598-9.
242. Mrak R. E., Griffin S. T., Graham D. I. Aging-associated changes in human brain // J Neuropathol Exp Neurol. – 1997. – T. 56, № 12. – C. 1269-75.

243. Muller R. A quarter of a century of place cells // *Neuron*. – 1996. – T. 17, № 5. – C. 813-22.
244. Mundstock E., Zatti H., Louzada F. M., Oliveira S. G., Guma F. T., Paris M. M., Rueda A. B., Machado D. G., Stein R. T., Jones M. H., Sarria E. E., Barbe-Tuana F. M., Mattiello R. Effects of physical activity in telomere length: Systematic review and meta-analysis // *Ageing Res Rev*. – 2015. – T. 22. – C. 72-80.
245. Murphey R. K., Chiba A. Assembly of the cricket cercal sensory system: genetic and epigenetic control // *J Neurobiol*. – 1990. – T. 21, № 1. – C. 120-37.
246. Naj A. C., Jun G., Beecham G. W., Wang L. S., Vardarajan B. N., Buross J., Gallins P. J., Buxbaum J. D., Jarvik G. P., Crane P. K., Larson E. B., Bird T. D., Boeve B. F., Graff-Radford N. R., De Jager P. L., Evans D., Schneider J. A., Carrasquillo M. M., Ertekin-Taner N., Younkin S. G., Cruchaga C., Kauwe J. S., Nowotny P., Kramer P., Hardy J., Huentelman M. J., Myers A. J., Barmada M. M., Demirci F. Y., Baldwin C. T., Green R. C., Rogaeve E., St George-Hyslop P., Arnold S. E., Barber R., Beach T., Bigio E. H., Bowen J. D., Boxer A., Burke J. R., Cairns N. J., Carlson C. S., Carney R. M., Carroll S. L., Chui H. C., Clark D. G., Corneveaux J., Cotman C. W., Cummings J. L., DeCarli C., DeKosky S. T., Diaz-Arrastia R., Dick M., Dickson D. W., Ellis W. G., Faber K. M., Fallon K. B., Farlow M. R., Ferris S., Frosch M. P., Galasko D. R., Ganguli M., Gearing M., Geschwind D. H., Ghetti B., Gilbert J. R., Gilman S., Giordani B., Glass J. D., Growdon J. H., Hamilton R. L., Harrell L. E., Head E., Honig L. S., Hulette C. M., Hyman B. T.,

- Jicha G. A., Jin L. W., Johnson N., Karlawish J., Karydas A., Kaye J. A., Kim R., Koo E. H., Kowall N. W., Lah J. J., Levey A. I., Lieberman A. P., Lopez O. L., Mack W. J., Marson D. C., Martiniuk F., Mash D. C., Masliah E., McCormick W. C., McCurry S. M., McDavid A. N., McKee A. C., Mesulam M., Miller B. L., Miller C. A., Miller J. W., Parisi J. E., Perl D. P., Peskind E., Petersen R. C., Poon W. W., Quinn J. F., Rajbhandary R. A., Raskind M., Reisberg B., Ringman J. M., Roberson E. D., Rosenberg R. N., Sano M., Schneider L. S., Seeley W., Shelanski M. L., Slifer M. A., Smith C. D., Sonnen J. A., Spina S., Stern R. A., Tanzi R. E., Trojanowski J. Q., Troncoso J. C., Van Deerlin V. M., Vinters H. V., Vonsattel J. P., Weintraub S., Welsh-Bohmer K. A., Williamson J., Woltjer R. L., Cantwell L. B., Dombroski B. A., Beekly D., Lunetta K. L., Martin E. R., Kamboh M. I., Saykin A. J., Reiman E. M., Bennett D. A., Morris J. C., Montine T. J., Goate A. M., Blacker D., Tsuang D. W., Hakonarson H., Kukull W. A., Foroud T. M., Haines J. L., Mayeux R., Pericak-Vance M. A., Farrer L. A., Schellenberg G. D. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease // *Nat Genet.* – 2011. – T. 43, № 5. – C. 436-41.
247. Nassar A., Satarker S., Gurram P. C., Upadhya D., Fayaz S. M., Nampoothiri M. Repressor Element-1 Binding Transcription Factor (REST) as a Possible Epigenetic Regulator of Neurodegeneration and MicroRNA-Based Therapeutic Strategies // *Mol Neurobiol.* – 2023.

248. Nassel D. R., Zandawala M. Recent advances in neuropeptide signaling in *Drosophila*, from genes to physiology and behavior // *Prog Neurobiol.* – 2019. – T. 179. – C. 101607.
249. Nassif C., Noveen A., Hartenstein V. Embryonic development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of pioneer tracts // *J Comp Neurol.* – 1998. – T. 402, № 1. – C. 10-31.
250. Nassif C., Noveen A., Hartenstein V. Early development of the *Drosophila* brain: III. The pattern of neuropile founder tracts during the larval period // *J Comp Neurol.* – 2003. – T. 455, № 4. – C. 417-34.
251. Neriec N., Desplan C. From the Eye to the Brain: Development of the *Drosophila* Visual System // *Curr Top Dev Biol.* – 2016. – T. 116. – C. 247-71.
252. Neumann H., Daly M. J. Variant TREM2 as risk factor for Alzheimer's disease // *N Engl J Med.* – 2013. – T. 368, № 2. – C. 182-4.
253. Nicotera P., Leist M., Manzo L. Neuronal cell death: a demise with different shapes // *Trends Pharmacol Sci.* – 1999. – T. 20, № 2. – C. 46-51.
254. Nikolettou V., Tavernarakis N. Calcium homeostasis in aging neurons // *Front Genet.* – 2012. – T. 3. – C. 200.
255. Noori H. R., Schottler J., Ercsey-Ravasz M., Cosa-Linan A., Varga M., Toroczka Z., Spanagel R. A multiscale cerebral neurochemical connectome of the rat brain // *PLoS Biol.* – 2017. – T. 15, № 7. – C. e2002612.

256. Noveen A., Daniel A., Hartenstein V. Early development of the *Drosophila* mushroom body: the roles of *eyeless* and *dachshund* // *Development*. – 2000. – T. 127, № 16. – C. 3475-88.
257. Nuzhdin S. V., Pasyukova E. G., Mackay T. F. C. // *Genetica*. – 1997. – T. 100, № 1/3. – C. 167-175.
258. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research // *Cell Res*. – 2014. – T. 24, № 1. – C. 9-23.
259. Orr W. C., Radyuk S. N., Prabhudesai L., Toroser D., Benes J. J., Luchak J. M., Mockett R. J., Rebrin I., Hubbard J. G., Sohal R. S. Overexpression of glutamate-cysteine ligase extends life span in *Drosophila melanogaster* // *J Biol Chem*. – 2005. – T. 280, № 45. – C. 37331-8.
260. Otting G., Qian Y. Q., Billeter M., Muller M., Affolter M., Gehring W. J., Wuthrich K. Protein--DNA contacts in the structure of a homeodomain--DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution // *EMBO J*. – 1990. – T. 9, № 10. – C. 3085-92.
261. Pance A. Tailoring the models of transcription // *Int J Mol Sci*. – 2013. – T. 14, № 4. – C. 7583-97.
262. Parkes T. L., Elia A. J., Dickinson D., Hilliker A. J., Phillips J. P., Boulianne G. L. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons // *Nat Genet*. – 1998. – T. 19, № 2. – C. 171-4.

263. 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* lifespan control. // *Life Extension: Lessons from Drosophila* / Vaiserman A. M. и др. – Switzerland: Springer International Publishing, 2015. – С. 3-37.
264. Pasyukova E. G., Vieira C., Mackay T. F. Deficiency mapping of quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 2000. – Т. 156, № 3. – С. 1129-46.
265. Pearson J. C., Lemons D., McGinnis W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning // *Nat Rev Genet*. – 2005. – Т. 6, № 12. – С. 893-904.
266. Peng J. J., Lin S. H., Liu Y. T., Lin H. C., Li T. N., Yao C. K. A circuit-dependent ROS feedback loop mediates glutamate excitotoxicity to sculpt the *Drosophila* motor system // *Elife*. – 2019. – Т. 8.
267. Pcreanu W., Hartenstein V. Neural lineages of the *Drosophila* brain: a three-dimensional digital atlas of the pattern of lineage location and projection at the late larval stage // *J Neurosci*. – 2006. – Т. 26, № 20. – С. 5534-53.
268. Perisse E., Burke C., Huetteroth W., Waddell S. Shocking revelations and saccharin sweetness in the study of *Drosophila* olfactory memory // *Curr Biol*. – 2013. – Т. 23, № 17. – С. R752-63.

269. Pflugfelder G. O., Heisenberg M. Optomotor-blind of *Drosophila melanogaster*: a neurogenetic approach to optic lobe development and optomotor behaviour // *Comp Biochem Physiol A Physiol.* – 1995. – T. 110, № 3. – C. 185-202.
270. Pipkin J. Mapping the mind of a fly // *Elife.* – 2020. – T. 9.
271. Pletcher S. D., Macdonald S. J., Marguerie R., Certa U., Stearns S. C., Goldstein D. B., Partridge L. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster* // *Curr Biol.* – 2002. – T. 12, № 9. – C. 712-23.
272. Plum L., Schubert M., Bruning J. C. The role of insulin receptor signaling in the brain // *Trends Endocrinol Metab.* – 2005. – T. 16, № 2. – C. 59-65.
273. Pollina E. A., Gilliam D. T., Landau A. T., Lin C., Pajarillo N., Davis C. P., Harmin D. A., Yap E. L., Vogel I. R., Griffith E. C., Nagy M. A., Ling E., Duffy E. E., Sabatini B. L., Weitz C. J., Greenberg M. E. A NPAS4-NuA4 complex couples synaptic activity to DNA repair // *Nature.* – 2023. – T. 614, № 7949. – C. 732-741.
274. Polo S. E., Jackson S. P. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications // *Genes Dev.* – 2011. – T. 25, № 5. – C. 409-33.
275. Poon P. C., Kuo T. H., Linford N. J., Roman G., Pletcher S. D. Carbon dioxide sensing modulates lifespan and physiology in *Drosophila* // *PLoS Biol.* – 2010. – T. 8, № 4. – C. e1000356.

276. Post S., Karashchuk G., Wade J. D., Sajid W., De Meyts P., Tatar M. *Drosophila* Insulin-Like Peptides DILP2 and DILP5 Differentially Stimulate Cell Signaling and Glycogen Phosphorylase to Regulate Longevity // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2018. – T. 9. – C. 245.
277. Post S., Liao S., Yamamoto R., Veenstra J. A., Nassel D. R., Tatar M. *Drosophila* insulin-like peptide dilp1 increases lifespan and glucagon-like Akh expression epistatic to dilp2 // *Aging Cell*. – 2019. – T. 18, № 1. – C. e12863.
278. Prahlad V., Cornelius T., Morimoto R. I. Regulation of the cellular heat shock response in *Caenorhabditis elegans* by thermosensory neurons // *Science*. – 2008. – T. 320, № 5877. – C. 811-4.
279. Prahlad V., Morimoto R. I. Neuronal circuitry regulates the response of *Caenorhabditis elegans* to misfolded proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – T. 108, № 34. – C. 14204-9.
280. Presente A., Andres A., Nye J. S. Requirement of Notch in adulthood for neurological function and longevity // *Neuroreport*. – 2001. – T. 12, № 15. – C. 3321-5.
281. Qiring R., Walldorf U., Kloter U., Gehring W. J. Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans // *Science*. – 1994. – T. 265, № 5173. – C. 785-9.
282. Ramat A., Audibert A., Louvet-Vallee S., Simon F., Fichelson P., Gho M. Escargot and Scratch regulate neural commitment by antagonizing Notch activity

- in *Drosophila* sensory organs // *Development*. – 2016. – T. 143, № 16. – C. 3024-34.
283. Ramirez F. A., Wedeen C. J., Stuart D. K., Lans D., Weisblat D. A. Identification of a neurogenic sublineage required for CNS segmentation in an Annelid // *Development*. – 1995. – T. 121, № 7. – C. 2091-7.
284. Rangaraju S., Hankins D., Madorsky I., Madorsky E., Lee W. H., Carter C. S., Leeuwenburgh C., Notterpek L. Molecular architecture of myelinated peripheral nerves is supported by calorie restriction with aging // *Aging Cell*. – 2009. – T. 8, № 2. – C. 178-91.
285. Rattan S. I. Hormetic modulation of aging and longevity by mild heat stress // *Dose Response*. – 2006. – T. 3, № 4. – C. 533-46.
286. Reisert J. Origin of basal activity in mammalian olfactory receptor neurons // *J Gen Physiol*. – 2010. – T. 136, № 5. – C. 529-40.
287. Ren K., Pena de Ortiz S. Non-homologous DNA end joining in the mature rat brain // *J Neurochem*. – 2002. – T. 80, № 6. – C. 949-59.
288. Restifo L. L., Merrill V. K. Two *Drosophila* regulatory genes, *deformed* and *the Broad-Complex*, share common functions in development of adult CNS, head, and salivary glands // *Dev Biol*. – 1994. – T. 162, № 2. – C. 465-85.
289. Ridgel A. L., Ritzmann R. E. Insights into age-related locomotor declines from studies of insects // *Ageing Res Rev*. – 2005. – T. 4, № 1. – C. 23-39.

290. Riera C. E., Dillin A. Emerging Role of Sensory Perception in Aging and Metabolism // *Trends Endocrinol Metab.* – 2016. – T. 27, № 5. – C. 294-303.
291. Ringrose L., Paro R. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity // *Development.* – 2007. – T. 134, № 2. – C. 223-32.
292. Robertson H. M., Preston C. R., Phillis R. W., Johnson-Schlitz D. M., Benz W. K., Engels W. R. A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster* // *Genetics.* – 1988. – T. 118, № 3. – C. 461-70.
293. Roblodowski C., He Q. *Drosophila* Dunc-115 mediates axon projection through actin binding // *Invert Neurosci.* – 2017. – T. 17, № 1. – C. 2.
294. Rodier F., Munoz D. P., Teachenor R., Chu V., Le O., Bhaumik D., Coppe J. P., Campeau E., Beausejour C. M., Kim S. H., Davalos A. R., Campisi J. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion // *J Cell Sci.* – 2011. – T. 124, № Pt 1. – C. 68-81.
295. Rogaev E. I., Sherrington R., Rogaeva E. A., Levesque G., Ikeda M., Liang Y., Chi H., Lin C., Holman K., Tsuda T., et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene // *Nature.* – 1995. – T. 376, № 6543. – C. 775-8.
296. Rogakou E. P., Boon C., Redon C., Bonner W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo // *J Cell Biol.* – 1999. – T. 146, № 5. – C. 905-16.

297. Rogina B., Helfand S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – T. 101, № 45. – C. 15998-6003.
298. Rollins J. A., Howard A. C., Dobbins S. K., Washburn E. H., Rogers A. N. Assessing Health Span in *Caenorhabditis elegans*: Lessons From Short-Lived Mutants // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* – 2017. – T. 72, № 4. – C. 473-480.
299. Roshina N. V., Symonenko A. V., Kremetsova 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. – T. 6, № 12. – C. 1076-93.
300. Roshina N. V., Symonenko A. V., Kremetsova A. V., Tsybul'ko E. A., Alatortsev V. E., Pasyukova E. G., Mukha D. V. *Drosophila melanogaster* inhabiting northern regions of European Russia are infected with *Wolbachia* which adversely affects their life span // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* – 2018. – T. 22, № 5. – C. 568-573.
301. Ruiz M., Sanchez D., Canal I., Acebes A., Ganfornina M. D. Sex-dependent modulation of longevity by two *Drosophila* homologues of human Apolipoprotein D, GLaz and NLaz // *Exp Gerontol.* – 2011. – T. 46, № 7. – C. 579-89.
302. Rybina O. Y., Pasyukova E. G. A naturally occurring polymorphism at *Drosophila melanogaster* Lim3 Locus, a homolog of human LHX3/4, affects Lim3 transcription and fly lifespan // *PLoS One.* – 2010. – T. 5, № 9. – C. e12621.

303. Rybina O. Y., Sarantseva S. V., Veselkina E. R., Bolschakova O. I., Symonenko A. V., Krementsova A. V., Ryabova E. V., Roshina N. V., Pasyukova E. G. Tissue-specific transcription of the neuronal gene *Lim3* affects *Drosophila melanogaster* lifespan and locomotion // *Biogerontology*. – 2017. – Т. 18, № 5. – С. 739-757.
304. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. / Sambrook J., Fritsch E. R., Maniatis T. – 2 изд. – Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
305. Schaffner W. Enhancers, enhancers - from their discovery to today's universe of transcription enhancers // *Biol Chem*. – 2015. – Т. 396, № 4. – С. 311-27.
306. Scheffer L. K., Xu C. S., Januszewski M., Lu Z., Takemura S. Y., Hayworth K. J., Huang G. B., Shinomiya K., Maitlin-Shepard J., Berg S., Clements J., Hubbard P. M., Katz W. T., Umayam L., Zhao T., Ackerman D., Blakely T., Bogovic J., Dolafi T., Kainmueller D., Kawase T., Khairy K. A., Leavitt L., Li P. H., Lindsey L., Neubarth N., Olbris D. J., Otsuna H., Trautman E. T., Ito M., Bates A. S., Goldammer J., Wolff T., Svirskas R., Schlegel P., Neace E., Knecht C. J., Alvarado C. X., Bailey D. A., Ballinger S., Borycz J. A., Canino B. S., Cheatham N., Cook M., Dreher M., Duclos O., Eubanks B., Fairbanks K., Finley S., Forknall N., Francis A., Hopkins G. P., Joyce E. M., Kim S., Kirk N. A., Kovalyak J., Lauchie S. A., Lohff A., Maldonado C., Manley E. A., McLin S., Mooney C., Ndama M., Ogundeyi O., Okeoma N., Ordish C., Padilla N., Patrick C. M., Paterson

- T., Phillips E. E., Phillips E. M., Rampally N., Ribeiro C., Robertson M. K., Rymer J. T., Ryan S. M., Sammons M., Scott A. K., Scott A. L., Shinomiya A., Smith C., Smith K., Smith N. L., Sobeski M. A., Suleiman A., Swift J., Takemura S., Talebi I., Tarnogorska D., Tenshaw E., Tokhi T., Walsh J. J., Yang T., Horne J. A., Li F., Parekh R., Rivlin P. K., Jayaraman V., Costa M., Jefferis G. S., Ito K., Saalfeld S., George R., Meinertzhagen I. A., Rubin G. M., Hess H. F., Jain V., Plaza S. M. A connectome and analysis of the adult *Drosophila* central brain // *Elife*. – 2020. – T. 9.
307. Schmitt O., Eipert P., Hoffmann R., Morawska P., Klünker A., Meinhardt J., Lessmann F., Beier J., Kadir K., Karnitzki A., Jenssen J., Kuch L., Sellner L., Wree A. Central and peripheral monosynaptic, polysynaptic and collaterals connectivity in the rat // *Frontiers in Neuroinformatics*. – 2014. – T. 8.
308. Schmitt O., Eipert P., Philipp K., Kettlitz R., Fuellen G., Wree A. The intrinsic connectome of the rat amygdala // *Front Neural Circuits*. – 2012. – T. 6. – C. 81.
309. Schneider-Mizell C. M., Gerhard S., Longair M., Kazimiers T., Li F., Zwart M. F., Champion A., Midgley F. M., Fetter R. D., Saalfeld S., Cardona A. Quantitative neuroanatomy for connectomics in *Drosophila* // *Elife*. – 2016. – T. 5.
310. Schriener S. E., Kuramada S., Lopez T. E., Truong S., Pham A., Jafari M. Extension of *Drosophila* lifespan by cinnamon through a sex-specific dependence

- on the insulin receptor substrate chico // *Exp Gerontol.* – 2014. – T. 60. – C. 220-30.
311. Schuettengruber B., Chourrout D., Vervoort M., Leblanc B., Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins // *Cell.* – 2007. – T. 128, № 4. – C. 735-45.
312. Schulz B., Banuett F., Dahl M., Schlesinger R., Schafer W., Martin T., Herskowitz I., Kahmann R. The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif // *Cell.* – 1990. – T. 60, № 2. – C. 295-306.
313. Scott M. P., Weiner A. J. Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1984. – T. 81, № 13. – C. 4115-9.
314. Sedelnikova O. A., Horikawa I., Redon C., Nakamura A., Zimonjic D. B., Popescu N. C., Bonner W. M. Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging // *Aging Cell.* – 2008. – T. 7, № 1. – C. 89-100.
315. Sedelnikova O. A., Horikawa I., Zimonjic D. B., Popescu N. C., Bonner W. M., Barrett J. C. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks // *Nat Cell Biol.* – 2004. – T. 6, № 2. – C. 168-70.

316. Seimiya M., Naito M., Watanabe Y., Kurosawa Y. Homeobox genes in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* // *Prog Mol Subcell Biol.* – 1998. – T. 19. – C. 133-55.
317. Seo K., Choi E., Lee D., Jeong D. E., Jang S. K., Lee S. J. Heat shock factor 1 mediates the longevity conferred by inhibition of TOR and insulin/IGF-1 signaling pathways in *C. elegans* // *Aging Cell.* – 2013. – T. 12, № 6. – C. 1073-81.
318. Shaposhnikov M., Proshkina E., Shilova L., Zhavoronkov A., Moskalev A. Lifespan and Stress Resistance in *Drosophila* with Overexpressed DNA Repair Genes // *Sci Rep.* – 2015. – T. 5. – C. 15299.
319. Sherrington R., Rogaev E. I., Liang Y., Rogaeva E. A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., Tsuda T., Mar L., Foncin J. F., Bruni A. C., Montesi M. P., Sorbi S., Rainero I., Pinessi L., Nee L., Chumakov I., Pollen D., Brookes A., Sanseau P., Polinsky R. J., Wasco W., Da Silva H. A., Haines J. L., Pericak-Vance M. A., Tanzi R. E., Roses A. D., Fraser P. E., Rommens J. M., St George-Hyslop P. H. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease // *Nature.* – 1995. – T. 375, № 6534. – C. 754-60.
320. Shigenaga A., Kimura K., Kobayakawa Y., Tsujimoto Y., Tanimura T. Cell ablation by ectopic expression of cell death genes, *ced-3* and *Ice*, in *Drosophila* // *Dev Growth Differ.* – 1997. – T. 39, № 4. – C. 429-36.
321. Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N., Mizuta T., Arakawa-Kobayashi S., Thompson C. B., Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic

- programmed cell death dependent on autophagy genes // *Nat Cell Biol.* – 2004. – T. 6, № 12. – C. 1221-8.
322. Simonsen A., Cumming R. C., Brech A., Isakson P., Schubert D. R., Finley K. D. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila* // *Autophagy.* – 2008. – T. 4, № 2. – C. 176-84.
323. Simpson J. H. Mapping and manipulating neural circuits in the fly brain // *Adv Genet.* – 2009. – T. 65. – C. 79-143.
324. Sjoström L., Garellick G., Krotkiewski M., Luyckx A. Peripheral insulin in response to the sight and smell of food // *Metabolism.* – 1980. – T. 29, № 10. – C. 901-9.
325. Skeath J. B. At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system // *BioEssays.* – 1999. – T. 21, № 11. – C. 922-931.
326. Skeath J. B., Thor S. Genetic control of *Drosophila* nerve cord development // *Curr Opin Neurobiol.* – 2003. – T. 13, № 1. – C. 8-15.
327. Slawinska N., Krupa R. Molecular Aspects of Senescence and Organismal Ageing-DNA Damage Response, Telomeres, Inflammation and Chromatin // *Int J Mol Sci.* – 2021. – T. 22, № 2.

328. Song Z., Krishna S., Thanos D., Strominger J. L., Ono S. J. A novel cysteine-rich sequence-specific DNA-binding protein interacts with the conserved X-box motif of the human major histocompatibility complex class II genes via a repeated Cys-His domain and functions as a transcriptional repressor // *J Exp Med.* – 1994. – T. 180, № 5. – C. 1763-74.
329. Soo S. K., Rudich P. D., Traa A., Harris-Gauthier N., Shields H. J., Van Raamsdonk J. M. Compounds that extend longevity are protective in neurodegenerative diseases and provide a novel treatment strategy for these devastating disorders // *Mech Ageing Dev.* – 2020. – T. 190. – C. 111297.
330. Spencer C. C., Howell C. E., Wright A. R., Promislow D. E. Testing an 'aging gene' in long-lived drosophila strains: increased longevity depends on sex and genetic background // *Aging Cell.* – 2003. – T. 2, № 2. – C. 123-30.
331. Sperling E. A., Vinther J. A placozoan affinity for Dickinsonia and the evolution of late Proterozoic metazoan feeding modes // *Evol Dev.* – 2010. – T. 12, № 2. – C. 201-9.
332. Spitz F., Furlong E. E. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control // *Nat Rev Genet.* – 2012. – T. 13, № 9. – C. 613-26.
333. Stangor C., Walinga J. Putting It All Together: The Nervous System and the Endocrine System // *Introduction to Psychology / Cummings J. A., Sanders L.* – Saskatoon, SK: University of Saskatchewan Open Press, 2019.

334. Stavoe A. K. H., Holzbaur E. L. F. Autophagy in Neurons // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2019. – T. 35. – C. 477-500.
335. Stegeman R., Weake V. M. Transcriptional Signatures of Aging // *J Mol Biol.* – 2017. – T. 429, № 16. – C. 2427-2437.
336. Stein G. M., Murphy C. T. The Intersection of Aging, Longevity Pathways, and Learning and Memory in *C. elegans* // *Front Genet.* – 2012. – T. 3. – C. 259.
337. *Atlas of an Insect Brain.* / Strausfeld N. J. – Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag Berlin, 1976.
338. Strausfeld N. J. Crustacean-insect relationships: the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates // *Brain Behav Evol.* – 1998. – T. 52, № 4-5. – C. 186-206.
339. Strausfeld N. J., Buschbeck E. K., Gomez R. S. The arthropod mushroom body: Its functional roles, evolutionary enigmas and mistaken identities // *The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach.* 1995. – C. 349–381.
340. Strausfeld N. J., Hansen L., Li Y., Gomez R. S., Ito K. Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies // *Learn Mem.* – 1998. – T. 5, № 1-2. – C. 11-37.
341. Strausfeld N. J., Wolff G. H., Sayre M. E. Mushroom body evolution demonstrates homology and divergence across Pancrustacea // *Elife.* – 2020. – T. 9.

342. Striedter G. F. Preface: evo-devo on the brain // *Brain Behav Evol.* – 2011. – T. 78, № 3. – C. 197-8.
343. Strittmatter W. J., Saunders A. M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G. S., Roses A. D. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1993. – T. 90, № 5. – C. 1977-81.
344. Stroumbakis N. D., Li Z., Tolias P. P. A homolog of human transcription factor NF-X1 encoded by the *Drosophila* shuttle craft gene is required in the embryonic central nervous system // *Mol Cell Biol.* – 1996. – T. 16, № 1. – C. 192-201.
345. Studenski S., Perera S., Patel K., Rosano C., Faulkner K., Inzitari M., Brach J., Chandler J., Cawthon P., Connor E. B., Nevitt M., Visser M., Kritchevsky S., Badinelli S., Harris T., Newman A. B., Cauley J., Ferrucci L., Guralnik J. Gait speed and survival in older adults // *JAMA.* – 2011. – T. 305, № 1. – C. 50-8.
346. Suberbielle E., Sanchez P. E., Kravitz A. V., Wang X., Ho K., Eilertson K., Devidze N., Kreitzer A. C., Mucke L. Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid-beta // *Nat Neurosci.* – 2013. – T. 16, № 5. – C. 613-21.

347. Sugi T., Nishida Y., Mori I. Regulation of behavioral plasticity by systemic temperature signaling in *Caenorhabditis elegans* // *Nat Neurosci.* – 2011. – T. 14, № 8. – C. 984-92.
348. Symonenko A. V., Roshina N. V., Kremetsova A. V., Pasyukova E. G. Reduced Neuronal Transcription of *Escargot*, the *Drosophila* Gene Encoding a Snail-Type Transcription Factor, Promotes Longevity // *Front Genet.* – 2018. – T. 9. – C. 151.
349. Tacutu R., Thornton D., Johnson E., Budovsky A., Barardo D., Craig T., Diana E., Lehmann G., Toren D., Wang J., Fraifeld V. E., de Magalhaes J. P. Human Ageing Genomic Resources: new and updated databases // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – T. 46, № D1. – C. D1083-D1090.
350. Tatar M., Bartke A., Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals // *Science.* – 2003. – T. 299, № 5611. – C. 1346-51.
351. Tatum M. C., Ooi F. K., Chikka M. R., Chauve L., Martinez-Velazquez L. A., Steinbusch H. W. M., Morimoto R. I., Prahlad V. Neuronal serotonin release triggers the heat shock response in *C. elegans* in the absence of temperature increase // *Curr Biol.* – 2015. – T. 25, № 2. – C. 163-174.
352. Tavernarakis N. Moderation of neural excitation promotes longevity // *Nature.* – 2019. – T. 574, № 7778. – C. 338-340.

353. Technau G., Heisenberg M. Neural reorganization during metamorphosis of the corpora pedunculata in *Drosophila melanogaster* // *Nature*. – 1982. – T. 295, № 5848. – С. 405-7.
354. *Advances in Experimental Medicine and Biology. Brain development in Drosophila melanogaster. Preface. Advances in experimental medicine and biology.* / Technau G. M.: Springer, 2008. – Т. 628: *Advances in experimental medicine and biology.*
355. Technau G. M. Fiber number in the mushroom bodies of adult *Drosophila melanogaster* depends on age, sex and experience // *J Neurogenet.* – 1984. – Т. 1, № 2. – С. 113-26.
356. Tolias P. P., Stroubakis N. D. The *Drosophila* zygotic lethal gene shuttle craft is required maternally for proper embryonic development // *Dev Genes Evol.* – 1998. – Т. 208, № 5. – С. 274-82.
357. Ton C. C., Hirvonen H., Miwa H., Weil M. M., Monaghan P., Jordan T., van Heyningen V., Hastie N. D., Meijers-Heijboer H., Drechsler M., et al. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region // *Cell*. – 1991. – Т. 67, № 6. – С. 1059-74.
358. *Principles of Anatomy and Physiology.* / Tortora G. J., Derrickson B. H. – 16th изд. – New York: Wiley, 2020. – 1296 с.
359. Tricoire H., Battisti V., Trannoy S., Lasbleiz C., Pret A. M., Monnier V. The steroid hormone receptor EcR finely modulates *Drosophila* lifespan during

- adulthood in a sex-specific manner // *Mech Ageing Dev.* – 2009. – T. 130, № 8. – C. 547-52.
360. Troulinaki K., Bano D. Mitochondrial deficiency: a double-edged sword for aging and neurodegeneration // *Front Genet.* – 2012. – T. 3. – C. 244.
361. Truman J. W. Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila* // *J Neurobiol.* – 1990. – T. 21, № 7. – C. 1072-84.
362. Truman J. W. Steroid receptors and nervous system metamorphosis in insects // *Dev Neurosci.* – 1996. – T. 18, № 1-2. – C. 87-101.
363. Ulland T. K., Colonna M. TREM2 - a key player in microglial biology and Alzheimer disease // *Nat Rev Neurol.* – 2018. – T. 14, № 11. – C. 667-675.
364. Ullian E. M., Sapperstein S. K., Christopherson K. S., Barres B. A. Control of synapse number by glia // *Science.* – 2001. – T. 291, № 5504. – C. 657-61.
365. Urbach R., Technau G. M. Early steps in building the insect brain: neuroblast formation and segmental patterning in the developing brain of different insect species // *Arthropod Struct Dev.* – 2003. – T. 32, № 1. – C. 103-23.
366. van Lengerich B., Zhan L., Xia D., Chan D., Joy D., Park J. I., Tatarakis D., Calvert M., Hummel S., Lianoglou S., Pizzo M. E., Prorok R., Thomsen E., Bartos L. M., Beumers P., Capell A., Davis S. S., de Weerd L., Dugas J. C., Duque J., Earr T., Gadkar K., Giese T., Gill A., Gnorich J., Ha C., Kannuswamy M., Kim D. J., Kunte S. T., Kunze L. H., Lac D., Lechtenberg K., Leung A. W., Liang C. C., Lopez I., McQuade P., Modi A., Torres V. O., Nguyen H. N., Pesamaa I., Propson N.,

- Reich M., Robles-Colmenares Y., Schlepckow K., Slemann L., Solanoy H., Suh J. H., Thorne R. G., Vieira C., Wind-Mark K., Xiong K., Zuchero Y. J. Y., Diaz D., Dennis M. S., Huang F., Scearce-Levie K., Watts R. J., Haass C., Lewcock J. W., Di Paolo G., Brendel M., Sanchez P. E., Monroe K. M. A TREM2-activating antibody with a blood-brain barrier transport vehicle enhances microglial metabolism in Alzheimer's disease models // *Nat Neurosci.* – 2023.
367. Varon S., Adler R. Nerve growth factors and control of nerve growth // *Curr Top Dev Biol.* – 1980. – T. 16. – C. 207-52.
368. Verdu E., Ceballos D., Vilches J. J., Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration // *J Peripher Nerv Syst.* – 2000. – T. 5, № 4. – C. 191-208.
369. Vigh B., Manzano e Silva M. J., Frank C. L., Vincze C., Czirok S. J., Szabo A., Lukats A., Szel A. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain // *Histol Histopathol.* – 2004. – T. 19, № 2. – C. 607-28.
370. Vollbrecht E., Veit B., Sinha N., Hake S. The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family // *Nature.* – 1991. – T. 350, № 6315. – C. 241-3.
371. Voog J., Sandall S. L., Hime G. R., Resende L. P., Loza-Coll M., Aslanian A., Yates J. R., 3rd, Hunter T., Fuller M. T., Jones D. L. Escargot restricts niche

- cell to stem cell conversion in the *Drosophila* testis // *Cell Rep.* – 2014. – T. 7, № 3. – C. 722-34.
372. Vosshall L. B., Stocker R. F. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila* // *Annu Rev Neurosci.* – 2007. – T. 30. – C. 505-33.
373. Waddell S. Reinforcement signalling in *Drosophila*; dopamine does it all after all // *Curr Opin Neurobiol.* – 2013. – T. 23, № 3. – C. 324-9.
374. Wagh D. A., Rasse T. M., Asan E., Hofbauer A., Schwenkert I., Durrbeck H., Buchner S., Dabauvalle M. C., Schmidt M., Qin G., Wichmann C., Kittel R., Sigrist S. J., Buchner E. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila* // *Neuron.* – 2006. – T. 49, № 6. – C. 833-44.
375. Waldvogel A. M., Feldmeyer B., Rolshausen G., Exposito-Alonso M., Rellstab C., Kofler R., Mock T., Schmid K., Schmitt I., Bataillon T., Savolainen O., Bergland A., Flatt T., Guillaume F., Pfenninger M. Evolutionary genomics can improve prediction of species' responses to climate change // *Evol Lett.* – 2020. – T. 4, № 1. – C. 4-18.
376. Wang H. D., Kazemi-Esfarjani P., Benzer S. Multiple-stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – T. 101, № 34. – C. 12610-5.

377. Wang J. W., Wong A. M., Flores J., Vosshall L. B., Axel R. Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain // *Cell*. – 2003. – T. 112, № 2. – C. 271-82.
378. Warren N., Caric D., Pratt T., Clausen J. A., Asavaritikrai P., Mason J. O., Hill R. E., Price D. J. The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex // *Cereb Cortex*. – 1999. – T. 9, № 6. – C. 627-35.
379. Werren J. H., Windsor D. M. Wolbachia infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? // *Proc Biol Sci*. – 2000. – T. 267, № 1450. – C. 1277-85.
380. West A. E., Greenberg M. E. Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2011. – T. 3, № 6.
381. White J. G., Southgate E., Thomson J. N., Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans* // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 1986. – T. 314, № 1165. – C. 1-340.
382. White R. R., Milholland B., de Bruin A., Curran S., Laberge R. M., van Steeg H., Campisi J., Maslov A. Y., Vijg J. Controlled induction of DNA double-strand breaks in the mouse liver induces features of tissue ageing // *Nat Commun*. – 2015. – T. 6. – C. 6790.

383. Whiteley M., Noguchi P. D., Sensabaugh S. M., Odenwald W. F., Kassis J. A. The *Drosophila* gene *escargot* encodes a zinc finger motif found in snail-related genes // *Mech Dev.* – 1992. – T. 36, № 3. – C. 117-27.
384. Whittington P. M., Leach D., Sandeman R. Evolutionary change in neural development within the arthropods: axonogenesis in the embryos of two crustaceans // *Development.* – 1993. – T. 118, № 2. – C. 449-61.
385. Wilkinson G. S., South J. M. Life history, ecology and longevity in bats // *Aging Cell.* – 2002. – T. 1, № 2. – C. 124-31.
386. Wilmoth J. R., Horiuchi S. Rectangularization revisited: Variability of age at death within human populations* // *Demography.* – 1999. – T. 36, № 4. – C. 475-495.
387. Wodarz A., Huttner W. B. Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates // *Mech Dev.* – 2003. – T. 120, № 11. – C. 1297-309.
388. Wolfner M. F. Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products // *Insect Biochem Mol Biol.* – 1997. – T. 27, № 3. – C. 179-92.
389. Wolkow C. A. Life span: getting the signal from the nervous system // *Trends Neurosci.* – 2002. – T. 25, № 4. – C. 212-6.
390. Woodruff-Pak D. S. Stereological estimation of Purkinje neuron number in C57BL/6 mice and its relation to associative learning // *Neuroscience.* – 2006. – T. 141, № 1. – C. 233-43.

391. Wray G. A. Transcriptional regulation and the evolution of development // Int J Dev Biol. – 2003. – T. 47, № 7-8. – C. 675-84.
392. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation // Nature. – 2016. – T. 539, № 7628. – C. 180-186.
393. Xu P. X., Zhang X., Heaney S., Yoon A., Michelson A. M., Maas R. L. Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies // Development. – 1999. – T. 126, № 2. – C. 383-95.
394. Yamasaki Y., Lim Y. M., Minami R., Tsuda L. A splicing variant of Charlatan, a Drosophila REST-like molecule, preferentially localizes to axons // Biochem Biophys Res Commun. – 2021. – T. 578. – C. 35-41.
395. Yasothornsrikul S., Davis W. J., Cramer G., Kimbrell D. A., Dearolf C. R. viking: identification and characterization of a second type IV collagen in Drosophila // Gene. – 1997. – T. 198, № 1-2. – C. 17-25.
396. Younossi-Hartenstein A., Salvaterra P. M., Hartenstein V. Early development of the Drosophila brain: IV. Larval neuropile compartments defined by glial septa // J Comp Neurol. – 2003. – T. 455, № 4. – C. 435-50.
397. Yu L., Alva A., Su H., Dutt P., Freundt E., Welsh S., Baehrecke E. H., Lenardo M. J. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8 // Science. – 2004. – T. 304, № 5676. – C. 1500-2.

398. Yu S., Jang Y., Paik D., Lee E., Park J. J. Nmdmc overexpression extends *Drosophila* lifespan and reduces levels of mitochondrial reactive oxygen species // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2015. – T. 465, № 4. – C. 845-50.
399. Zanazzi G., Einheber S., Westreich R., Hannocks M. J., Bedell-Hogan D., Marchionni M. A., Salzer J. L. Glial growth factor/neuregulin inhibits Schwann cell myelination and induces demyelination // *J Cell Biol.* – 2001. – T. 152, № 6. – C. 1289-99.
400. Zelena J., Vyskocil F., Jirmanova I. The elimination of polyneuronal innervation of end-plates in developing rat muscles with altered function // *Prog Brain Res.* – 1979. – T. 49. – C. 365-72.
401. Zhang G., Li J., Purkayastha S., Tang Y., Zhang H., Yin Y., Li B., Liu G., Cai D. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH // *Nature.* – 2013. – T. 497, № 7448. – C. 211-6.
402. Zhao C., Widmer Y. F., Diegelmann S., Petrovici M. A., Sprecher S. G., Senn W. Predictive olfactory learning in *Drosophila* // *Sci Rep.* – 2021. – T. 11, № 1. – C. 6795.
403. Zhao N., Bu G. A TREM2 antibody energizes microglia // *Nat Neurosci.* – 2023.
404. Zhong W., McClure C. D., Evans C. R., Mlynski D. T., Immonen E., Ritchie M. G., Priest N. K. Immune anticipation of mating in *Drosophila*: Turandot M

- promotes immunity against sexually transmitted fungal infections // *Proc Biol Sci.*
– 2013. – T. 280, № 1773. – C. 20132018.
405. Zhou X., Escala W., Papapetropoulos S., Zhai R. G. beta-N-methylamino-L-alanine induces neurological deficits and shortened life span in *Drosophila* // *Toxins (Basel)*. – 2010. – T. 2, № 11. – C. 2663-79.
406. Zimmer M., Gray J. M., Pokala N., Chang A. J., Karow D. S., Marletta M. A., Hudson M. L., Morton D. B., Chronis N., Bargmann C. I. Neurons detect increases and decreases in oxygen levels using distinct guanylate cyclases // *Neuron*. – 2009. – T. 61, № 6. – C. 865-79.
407. Zullo J. M., Drake D., Aron L., O'Hern P., Dhamne S. C., Davidsohn N., Mao C. A., Klein W. H., Rotenberg A., Bennett D. A., Church G. M., Colaiacovo M. P., Yankner B. A. Regulation of lifespan by neural excitation and REST // *Nature*. – 2019. – T. 574, № 7778. – C. 359-364.

8. ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Параметры, характеризующие продолжительность жизни самцов и самок с мутацией и нокдауном гена *esg*.

Номер опыта	Генотип	N	Среднее	Медиана	Минимум	Максимум	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль	Процентиль 10	Процентиль 90	Варианса	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка	Достоверность различия, тест Манна-Уитни
Мутация <i>esg</i>, девственные самки														
1	esgK1	114	45	47	10	78	33	58	22	66	266.0	16.3	1.5	<u>0.0001</u>
	esgP	124	58	61	12	88	46	73	32	77	322.0	17.9	1.6	
	esgRev3	114	50	51	12	87	36	69	20	76	411.1	20.3	1.9	<u>0.0054;</u> <u>0.0243</u>
	esgRev5	115	56	54	19	89	46	69	41	72	184.7	13.6	1.3	<u>0,1075;</u> <u>0.0001</u>
2	esgK1	100	36	38	5	59	23	51	8	53	272.9	16.5	1.7	0.0001
	esgP	100	48	55	5	72	39	61	19	65	266.2	16.3	1.6	
3	esgK1	150	41	45	5	68	29	51	22	59	201.9	14.2	1.2	0.0001
	esgP	150	51	56	8	76	38	67	23	72	326.1	18.1	1.5	
Мутация <i>esg</i>, девственные самцы														
1	esgK1	195	45	48	6	73	34	59	18	61	281.2	16.8	1.2	<u>0.0001</u>
	esgP	110	66	69	16	97	61	73	45	83	237.4	15.4	1.5	
	esgRev3	150	49	48	14	89	35	61	27	76	309.4	17.6	1.4	<u>0.0001;</u> <u>0.1856</u>
	esgRev5	205	56	59	6	87	46	69	31	77	319.2	17.9	1.2	<u>0.0001;</u> <u>0.0001</u>
2	esgK1	100	36	38	4	65	24	47	14	53	207.2	14.4	1.4	0.0001

3	esgP	100	57	66	3	74	54	69	19	72	379.1	19.5	1.9	
	esgK1	150	28	26	4	62	18	38	11	48	179.3	13.4	1.1	0.0001
	esgP	150	55	58	16	76	43	67	28	71	242.2	15.6	1.3	
Мутация <i>esg</i>, скреживавшиеся самки														
1	esgK1	60	37	38	8	56	30	46	16	50	150.4	12.3	1.6	0.9581
	esgP	60	37	37	4	64	24	50	19	57	207.7	14.4	1.9	
2	esgK1	60	34	37	2	50	26	42	16	45	125.0	11.2	1.4	0.8011
	esgP	60	34	34	8	70	22	46	15	50	206.0	14.4	1.9	
Мутация <i>esg</i>, скреживавшиеся самцы														
1	esgK1	60	30	30	3	58	16	43	11	50	223.7	15.0	1.9	0.0001
	esgP	60	46	50	7	74	29	58	24	66	287.3	16.9	2.2	
2	esgK1	60	33	36	9	57	22	43	17	45	136.0	11.7	1.5	0.0001
	esgP	60	44	46	2	75	36	58	17	67	316.0	17.8	2.3	
Нокдаун <i>esg</i> в нейронах, девственные самки														
1	HC1 x esgK3	100	76	82	11	106	69	87	45	97	385.9	19.6	2.0	
	HC1 x esgHD2	100	71	77	9	100	63	85	33	92	444.7	21.1	2.1	<i>0.0311</i>
	HC1 x esgHD3	100	84	90	28	105	72	95	66	98	249.1	15.8	1.6	<i>0.0004</i>
2	HC1 x esgK3	100	88	92	36	105	84	98	66	101	205.2	14.3	1.4	
	HC1 x esgHD3	100	93	95	24	114	88	101	78	105	169.0	13.0	1.3	0.0049
Нокдаун <i>esg</i> в нейронах, девственные самцы														
1	HC1 x esgK3	100	51	52	8	91	41	61	33	70	258.4	16.1	1.6	
	HC1 x esgHD2	100	47	46	9	78	41	55	38	59	87.0	9.3	0.9	<i>0.0112</i>
	HC1 x esgHD3	100	58	58	4	89	47	74	38	79	323.8	18.0	1.8	<i>0.0021</i>
2	HC1 x esgK3	100	61	64	7	90	53	70	44	74	217.1	14.7	1.5	
	HC1 x esgHD3	100	65	67	9	103	59	74	44	85	300.0	17.3	1.7	0.0351

Описание генотипов дано в разделе «Материалы и методы».

При анализе мутации достоверности указаны для сравнения контроля с мутантом и для сравнения реверсий с мутантом и контролем. При анализе нокдаунов достоверности указаны для сравнения с контролем. Достоверные значения *P* выделены жирным шрифтом. В случае множественных сравнений (значения *P* выделены курсивом) значения *P*, достоверные после коррекции Бонферрони подчеркнуты одной жирной чертой.

Таблица 2. Количество транскриптов *esg* у особей с мутацией гена.

Источник РНК	Генотип	Число опытов	Средняя относительная нормализованная экспрессия (стандартная ошибка), условные единицы	Достоверность отличия	
				t тест, ANOVA	Тест Краскела-Уоллеса
Девственные самцы, 1 день	esgK1	2	0,023 (0,012)	0,1689	0,0809
	esgP	2	0,056 (0,005)		
Девственные самцы, 10 дней	esgK1	3	0,071 (0,013)	0,2015	0,0495
	esgP	3	0,046 (0,002)		
Девственные самцы, 20 дней	esgK1	2	0,165 (0,042)	0,6043	0,4386
	esgP	2	0,135 (0,027)		
Девственные самцы, 1 день	esgK1	2	0,81 (0,09)	0,0460	0,0495
	esgP	2	0,41 (0,10)		
	esgRev3	2	0,84 (0,07)	0,0156; 0,8568	0,0495 1
	esgRev5	2	0,41 (0,03)	0,5872 0,0623	0,5761 0,08663
Эмбрионы, 14-22 часа	esgK1	3	1,26 (0,11)	0,0254	0,0495
	esgP	3	0,72 (0,11)		
	esgRev3	3	1,06 (0,23)	0,0483; 0,2543	0,0923 0,2752
	esgRev5	3	0,74 (0,06)	0,7635; 0,0142	0,8130 0,04995

Описание генотипов дано в разделе «Материалы и методы».

При анализе мутации достоверности указаны для сравнения контроля с мутантом и для сравнения реверсий с мутантом и контролем. При анализе нокдаунов достоверности указаны для сравнения с контролем. Достоверности указаны для сравнения с контролем. Достоверные значения P выделены жирным шрифтом, в случае множественных сравнений (значения P выделены курсивом) значения P , достоверные после коррекции Бонферрони, подчеркнуты жирной чертой.

Таблица 3. Подвижность особей с мутацией *esg*.

Направление движения	Пол	Возраст, дни	Генотип	Число пробирок*	Среднее число пересечений** (стандартная ошибка)	Достоверность отличия			
						t тест, ANOVA	Тест Краскела-Уоллеса		
Горизонтально	Самки девственные	1	esgK1	21	197 (10)	0,2942	0,0780		
			esgP	21	173 (16)				
		10	esgK1	10	233 (15)	0,0400	0,1086		
			esgP	10	344 (23)				
		20	esgK1	10	358 (18)	0,5734	0,6688		
			esgP	10	381 (14)				
		30	esgK1	10	284 (10)	0,4431	0,7436		
			esgP	10	294 (11)				
		40	esgK1	12	256 (12)	0,5913	0,6205		
			esgP	12	268 (19)				
		50	esgK1	13	211 (10)	0,0001	0,0001		
			esgP	13	363 (17)				
		Горизонтально	Самцы девственные	1	esgK1	21	150 (11)	0,3360	0,1437
					esgP	19	132 (18)		
10	esgK1			11	186 (22)	0,3271	0,4960		
	esgP			11	132 (13)				
20	esgK1			12	354 (21)	0,0001	0,0001		
	esgP			12	480 (30)				
30	esgK1			11	242 (18)	0,0026	0,0024		
	esgP			11	311 (26)				
40	esgK1			13	184 (10)	0,0379	0,0268		
	esgP			12	242 (23)				
50	esgK1			12	165 (13)	0,0001	0,0002		

Горизонтально	Самцы скрещивавшиеся	1	esgP	12	302 (31)	0,8076	0,6303		
			esgK1	22	131 (17)				
		10	esgP	22	137 (17)	0,8580	0,7627		
			esgK1	21	143 (13)				
		20	esgP	21	140 (10)	0,2285	0,2907		
			esgK1	21	158 (10)				
		30	esgP	21	141 (9)	0,5623	0,6358		
			esgK1	20	105 (5)				
		40	esgP	20	112 (1)0	0,8266	0,8817		
			esgK1	20	68 (9)				
		50	esgP	20	71 (8)	0,0357	0,0487		
			esgK1	11	48 (11)				
					esgP	11	91 (15)		

* Каждая пробирка содержала по 5 особей.

** Среднее число пересечений мухами трех светодиодных колец, работающих в инфракрасном диапазоне, за 5 минут.

Описание генотипов дано в разделе «Материалы и методы».

Достоверности указаны для сравнения контроля с мутантом. Достоверные значения P выделены жирным шрифтом.

2	stcK1	100	54	55	10	79	48	65	34	72	225,95	15,03	1,50	0,0052
	stcP	100	60	60	12	84	51	71	46	78	203,94	14,28	1,43	
3	stcK1	100	53	58	6	78	48	65	20	70	300,37	17,33	1,73	0,0002
	stcP	100	62	62	7	92	54	80	29	87	419,75	20,49	2,05	
Мутация stc, девственные самцы														
1	stcK1	100	67	68	10	95	60	81	48	86	296,4	17,2	1,7	<i>0,0507</i>
	stcP	100	62	65	10	84	54	74	46	78	206,2	14,4	1,4	
	stcRev1	100	66	72	15	89	52	78	30	81	373,1	19,3	1,9	<u>0,0018</u>
	stcRev3	100	68	73	11	93	58	81	39	85	340,6	18,5	1,8	<u>0,0004</u>
	stcRev4	100	65	66	34	88	58	72	46	79	164,2	12,8	1,3	<i>0,3956</i>
	stcRev5	100	62	66	15	85	55	72	47	73	135,9	11,7	1,2	<i>0,4274</i>
2	stcK1	100	51	57	4	89	40	65	22	76	402,5	20,1	2,0	0,3035
	stcP	100	48	52	5	77	33	64	16	70	377,2	19,4	1,9	
3	stcK1	100	48	53	7	84	33	65	14	72	471,9	21,7	2,2	0,7410
	stcP	100	49	53	6	71	40	65	17	65	324,3	18,0	1,8	
Мутация stc, скрещивавшиеся самки														
1*	stcK1	60	56	59	29	84	44	67	35	76	221,3	14,9	1,9	<u>0,0009</u>
	stcP	60	48	48	15	71	41	55	32	61	121,7	11,0	1,4	
	stcRev1	60	54	57	19	76	43	67	29	71	241,1	15,5	2,0	<u>0,0037</u>
	stcRev3	60	58	61	23	86	49	71	37	78	241,6	15,5	2,0	<u>0,0001</u>
	stcRev4	60	59	61	32	73	54	66	47	68	82,0	9,1	1,2	<u>0,0001</u>
2*	stcRev5	60	58	62	18	75	51	68	42	72	162,7	12,8	1,6	<u>0,0001</u>
	stcK1	60	55	57	10	83	45	67	36	74	257,4	16,0	2,1	<u>0,0011</u>
	stcP	60	47	49	9	75	41	55	34	58	132,8	11,5	1,5	
	stcRev1	60	52	53	11	77	42	68	25	71	298,6	17,3	2,2	<u>0,0435</u>
	stcRev3	60	57	57	28	82	45	67	36	74	194,2	13,9	1,8	<u>0,0002</u>
	stcRev4	60	55	56	28	68	52	59	45	65	68,1	8,3	1,1	<u>0,0001</u>
	stcRev5	60	56	58	10	70	54	60	47	66	86,2	9,3	1,2	<u>0,0001</u>
	1+2*	stcK1	120	56	58	10	84	44	67	35	76	237,6	15,4	1,4
	stcP	120	47	48	9	75	41	55	33	60	126,3	11,2	1,0	
	stcRev1	120	52	55	11	77	42	67	28	71	268,6	16,4	1,5	<u>0,0004:</u> <i>0,2542</i>
	stcRev3	120	58	60	23	86	47	67	36	77	216,6	14,7	1,3	<u>0,0001:</u> <i>0,3366</i>
	stcRev4	120	57	58	28	73	54	63	46	68	79,1	8,9	0,8	<u>0,0001:</u> <i>0,6245</i>
	stcRev5	120	57	58	10	75	53	65	44	69	124,0	11,1	1,0	<u>0,0001:</u> <i>0,4784</i>
3	sctK1	60	59	62	24	85	51	69	36	79	245,6	15,7	2,0	0,0041
	stcP	60	50	53	10	71	42	61	27	65	211,6	14,5	1,9	
4	stcK1	60	60	68	13	85	50	72	35	77	295,1	17,2	2,2	0,0275

	stcP	60	56	61	7	78	50	66	35	72	205,1	14,3	1,8		
5	stcK1	60	61	66	18	82	52	72	36	78	256,8	16,0	2,1	0,0226	
	stcP	60	54	62	7	79	44	67	25	71	314,4	17,7	2,3		
Мутация stc, скрещивавшиеся самцы															
1	stcK1	60	60	67	11	87	58	73	20	77	429,3	20,7	2,7	0,0563	
	stcP	60	59	59	13	83	53	69	44	75	164,9	12,8	1,7		
	stcRev1	60	58	62	11	84	48	71	31	77	326,7	18,1	2,3	0,9497	
	stcRev3	60	58	58	31	85	50	64	42	74	141,2	11,9	1,5	0,3689	
	stcRev4	60	61	63	28	77	57	65	53	69	73,2	8,6	1,1	0,2619	
	stcRev5	60	58	62	16	76	56	63	43	69	144,9	12,0	1,6	0,9225	
3	stcK1	60	55	58	6	83	52	66	33	70	263,9	16,2	2,1	0,8850	
	stcP	60	55	56	10	73	53	65	23	70	242,8	15,6	2,0		
4	stcK1	60	52	55	7	68	47	58	44	61	115,9	10,8	1,4	0,8561	
	stcP	60	50	56	15	67	41	61	29	64	183,5	13,5	1,7		
5	stcK1	60	48	57	7	77	44	58	22	70	120,1	11,0	1,4	0,6532	
	stcP	60	49	52	7	70	46	55	27	66	263,5	16,2	2,1		
Нокдаун stc в эмбрионах, девственные самки															
1	Эмб1 x stcK2	100	85	90	9	112	79	97	62,5	100	391,9	19,8	2,0		
	Эмб1 x stcHD	100	87	95	11	121	83	101	54	107	487,4	22,1	2,2	0,0729	
2	Эмб1 x stcK2	100	91	92	11	115	87	100	76,5	106	225,3	15,0	1,5		
	Эмб1 x stcHD	100	93	96	13	123	85	103	74	112	360,9	19,0	1,9	0,1134	
3	Эмб2 x stcK2	100	81	85	25	97	78	89	66	93	164,7	12,8	1,3		
	Эмб2 x stcHD	100	86	87	56	108	78	95	70	100	141,9	11,9	1,2	0,0044	
Нокдаун stc в эмбрионах, девственные самцы															
1	Эмб1 x stcK2	100	64	66	10	100	51	80	35	87	393,3	19,8	19,8		
	Эмб1 x stcHD	100	69	76	8	104	60	85	37	92	507,6	22,5	22,5	0,0142	
2	Эмб1 x stcK2	100	66	66	10	93	57	77	46,5	82	213,6	14,6	14,6		
	Эмб1 x stcHD	100	71	75	17	103	60	84	39	97	418,6	20,5	20,5	0,0043	
3	Эмб2 x stcK2	100	76	77	45	98	67	83	63,5	98	97,0	9,8	9,8		
	Эмб2 x stcHD	100	82	85	37	108	78	90	65	96	176,6	13,3	13,3	< 0,0001	
Нокдаун stc в нервной системе эмбрионов, девственные самки															
1	ЭмбНС x stcK2	100	82	88	3	102	79	92	59	97	270,6	16,5	1,7		
	ЭмбНС x stcHD	100	95	98	16	116	93	102	79	106	181,5	13,5	1,4	< 0,0001	
2	ЭмбНС x stcK2	100	80	84	18	105	72	92	55	97	273,8	16,5	1,7		
	ЭмбНС x stcHD	100	81	88	5	106	69	94	54	101	344,7	18,6	1,9	0,3219	
Нокдаун stc в нервной системе эмбрионов, девственные самцы															
1	ЭмбНС x stcK2	100	75	78	6	92	72	85	56	90	270,6	16,5	1,7		
	ЭмбНС x stcHD	100	84	89	9	120	79	93	91	97	242,3	15,6	1,6	< 0,0001	
2	ЭмбНС x stcK2	100	76	78	44	104	72	82	61	88	115,3	10,7	1,1		
	ЭмбНС x stcHD	100	81	83	9	106	79	88	66	91	149,2	12,2	1,2	< 0,0001	
Нокдаун stc в нейронах, девственные самки															

1	НС1 x stcK2	100	76	79	15	104	68	87	87	93	231,3	15,2	1,5	
	НС1 x stcНД	100	73	77	18	97	66	84	84	87	217,2	14,7	1,5	0,1249
2	НС1 x stcK2	100	88	90	49	109	82	97	97	101	152,0	12,3	1,2	
	НС1 x stcНД	100	84	87	13	106	79	95	95	98	243,8	15,6	1,6	0,0665
3	НС2 x stcK2	100	60	64	6	92	45	78	78	85	492,3	22,2	2,2	
	НС2 x stcНД	100	63	68	11	95	50	81	81	86	423,7	20,6	2,1	0,3296
4	НС1 x stcK2, глутамат10 мкМ	50	83	85	13	112	69	99	54	108	495,1	22,6	3,2	
	НС1 x stcНД, глутамат10 мкМ	50	84	90	10	88	73	98	50	104	424,1	21,2	3,0	0,7752
5	НС1 x stcK2, глутамат10 мМ	50	83	90	9	91	69	97	54	104	346,5	19,1	2,7	
	НС1 x stcНД, глутамат10 мМ	50	73	79	5	92	58		40	99	449,8	22,0	3,1	0,0131
Покдаун stc в нейронах, девственные самцы														
1	НС1 x stcK2	100	52	50	5	78	45	60	39	65	158,1	12,6	1,3	
	НС1 x stcНД	100	44	43	7	75	39	51	31	60	164,4	12,8	1,3	<0,0001
2	НС1 x stcK2	100	59	60	9	89	53	68	39,5	76	243,4	15,6	1,6	
	НС1 x stcНД	100	52	53	8	78	45	61	37	66	181,2	13,5	1,4	<0,0001
3	НС2 x stcK2	100	66	70	9	98	59	76	41,5	86	330,8	18,2	1,8	
	НС2 x stcНД	100	62	64	7	92	53	78	28	83	419,6	20,5	2,0	0,0935
4	НС1 x stcK2, глутамат10 мкМ	50	74	77	15	117	69	107	32	99	569,3	24,1	3,4	
	НС1 x stcНД, глутамат10 мкМ	50	52	61	23	112	72	103	15	80	604,8	24,8	3,5	<0,0001
5	НС1 x stcK2, глутамат10 мМ	50	58	64	40	111	69	103	17	86	628,6	25,5	3,6	
	НС1 x stcНД, глутамат10 мМ	50	64	70	19	100	58	98	37	82	283,2	17,0	2,4	0,4320

* Результаты этих опытов входят в Диссертационную работу Рожиной Н. В., 2008.

Описание генотипов дано в разделе «Материалы и методы».

При анализе мутации достоверности указаны для сравнения контроля и реверсий с мутантом и, для обчетов суммы экспериментов у самок, для сравнения реверсий с мутантом и контролем. При анализе нокдаунов достоверности указаны для сравнения с контролем. Достоверные значения P выделены жирным шрифтом.

Таблица 5. Количество транскриптов *stc* у особей с мутацией и нокдаунами гена.

Источник РНК	Генотип	Число опытов	Среднее (стандартная ошибка), условные единицы	Достоверность отличия	
				t тест, ANOVA	Тест Краскела-Уоллиса
Эмбрионы, 0-12 часов	stcK1	1	0.320 (0.02)*		
	stcP	1	0.224 (0.01)*		
Эмбрионы, 12-18 часов	stcK1	1	0.333 (0.02)*		
	stcP	1	0.133 (0.03)*		
Эмбрионы, 0-18 часов	stcK1	4	0.294 (0.003)	<u>0.0033</u>	<u>0.0209</u>
	stcP	4	0.140 (0.001)		
	stcRev3	4	0.444 (0.100)	<u>0.0273;</u> <u>0,1011</u>	<u>0.0833;</u> <u>0,1945</u>
Эмбрионы, 0-18 часов	stcK1	4	0.894 (0.138)	<u>0.0073</u>	<u>0.0209</u>
	stcP	4	0.286 (0,066)		
	stcRev3	4	0.869 (0.097)	<u>0.0025;</u> <u>0,8372</u>	<u>0.0209;</u> <u>0,9012</u>
Личинки-самки, III стадия	stcK1	5	0.459 (0.040)	0.5493	0.6242
	stcP	4	0.407 (0.077)		
Самки, 5-6 часов	stcK1	5	0.318 (0.021)	0.7415	0.8065
	stcP	5	0.300 (0.045)		
Девственные самки, 20 дней	stcK1	4	0.565 (0.110)	0.3977	0.5637
	stcP	4	0.449 (0.063)		
Девственные самки, 20 дней, RB	stcK1	2	0.401 (0.083)	0.8511	1
	stcP	2	0.433 (0.123)		
Девственные самки, 60 дней	stcK1	5	0.286 (0.064)	0.4960	0.6015
	stcP	5	0.376 (0.110)		
Скрещивавшиеся самки, 20 дней	stcK1	4	0.658 (0.017)	0.5074	0.4624
	stcP	5	0.630 (0.034)		

Скрещивавшиеся самки, 60 дней	stcK1	5	0.834 (0.126)	0.4645	0.6242
	stcP	4	1.048 (0.268)		
Яичники, девственные самки, 20 дней	stcK1	2	0.757 (0.197)	0.9851	1
	stcP	2	0.747 (0.054)		
Яичники, девственные самки, 50 дней	stcK1	2	0.782 (0.292)	0.9232	0.4386
	stcP	2	0.707 (0.275)		
Яичники, скрещивавшиеся самки, 20 дней	stcK1	2	1.019 (0.329)	0.8572	0.4386
	stcP	2	1.242 (0.284)		
Яичники, скрещивавшиеся самки, 50 дней	stcK1	2	0.749 (0.202)	0.9879	0.4386
	stcP	2	0.738 (0.194)		
Мозг, самки-личинки, III стадия	stcK1	5	0.251 (0.090)	0.7809	0.7540
	stcP	5	0.221 (0.069)		
Головы самок, 5-6 часов	stcK1	4	2.867 (0.420)	0.8848	0.3272
	stcP	5	3.074 (0.515)		
Девственные самцы, 20 дней	stcK1	4	0.211 (0.036)	0.3113	0.2482
	stcP	4	0.162 (0.026)		
Девственные самцы, 20 дней, RB	stcK1	2	0.207 (0.010)	0.1618	0.1213
	stcP	2	0.154 (0.019)		
Девственные самцы, 60 дней	stcK1	2	0.513 (0.165)	0.7832	0.4386
	stcP	2	0.441 (0.162)		
Эмбрионы	ЭмбНС x stcK2	5	1,758 (0,506)		
	ЭмбНС x stcНД	4	0,729 (0,160)	0,1248	0,0495
Девственные самцы, 15-20 дней, головы	НС1 x stcK2	5	0,944 (0,075)		
	НС1 x stcНД	4	0,423 (0,025)	0,0020	
Девственные самцы, 15-20 дней, каркасы	НС1 x stcK2	3	1,534 (0,351)		
	НС1 x stcНД	2	1,530 (0,311)	0,9635	

* Ошибка вычислена на основе технических повторностей одного опыта.

Измерено количество всех транскриптов *stc*, если не указано иначе.

Описание генотипов дано в разделе «Материалы и методы».

При анализе мутации достоверности указаны для сравнения контроля с мутантом и для сравнения реверсий с мутантом и контролем. При анализе нокдаунов достоверности указаны для сравнения с контролем. Достоверные значения P выделены жирным шрифтом, в случае множественных сравнений (значения P выделены курсивом) значения P , достоверные после коррекции Бонферрони, подчеркнуты жирной чертой.

Таблица 6. Подвижность особей с мутацией и нокдауном гена *stc* в нейронах.

Направление движения	Пол	Возраст, дни	Генотип	Число пробирок*	Среднее число пересечений ** (стандартная ошибка)	Достоверность отличия			
						t тест, ANOVA	Тест Краскела-Уоллиса		
Горизонтально	Самки девственные	1	stcK1	16	171 (47)	0,3320	0,2662		
			stcP	16	237 (49)				
		20	stcK1	20	564 (35)	0,1259	0,0909		
			stcP	20	653 (45)				
		40	stcK1	17	313 (26)	<u>0,0001</u>	<u>0,0001</u>		
			stcP	17	596 (27)				
			stcRev 3	14	366 (13)				
		60	stcK1	14	260 (25)	0,0001	0,0001		
			stcP	14	490 (26)				
		Вертикально	Самки девственные	1	stcK1	16	293 (39)	0,2916	0,2912
stcP	16				365 (55)				
20	stcK1			20	657 (36)	0,8062	0,8181		
	stcP			20	641 (53)				
40	stcK1			17	358 (41)	0,0001	0,0001		
	stcP			17	613 (29)				
60	stcK1			14	265 (24)	0,0001	0,0001		
	stcP			14	533 (36)				
Горизонтально	Самки скрещивавшиеся			1	stcK1	12	148 (16)	0,0001	0,0001
					stcP	12	734 (47)		
		20	stcK1	14	288 (32)	0,0001	0,0001		
			stcP	14	579 (45)				

		40	stcK1	6	263 (20)	0,0001	0,0001
			stcP	6	551 (29)		
		60	stcK1	12	332 (31)	0,2226	0,2928
			stcP	12	386 (27)		
Вертикально	Самки скре- щивав- шиеся	1	stcK1	12	322 (25)	0,0001	0,0001
			stcP	12	847 (44)		
		20	stcK1	14	390 (33)	0,0001	0,0006
			stcP	14	664 (51)		
		40	stcK1	6	308 (32)	0,0001	0,0039
			stcP	6	757 (43)		
		60	stcK1	12	387 (27)	0,0144	0,0327
			stcP	12	495 (31)		
Горизонтально	Самки	10	ЭмбНС x stcK2	14	177 (6)	0,0127	
			ЭмбНС x stcHD	13	202 (7)		
		20	ЭмбНС x stcK2	15	174 (7)	0,4871	
			ЭмбНС x stcHD	15	180 (6)		
		40	ЭмбНС x stcK2	15	98 (6)	0,2567	
			ЭмбНС x stcHD	15	108 (6)		
		50	ЭмбНС x stcK2	17	89 (4)	0,4736	
			ЭмбНС x stcHD	20	94 (7)		
Горизонтально	Самцы	10	ЭмбНС x stcK2	21	157 (7)	0,3281	
			ЭмбНС x stcHD	10	145 (12)		
		20	ЭмбНС x stcK2	16	206 (8)	0,1431	
			ЭмбНС x stcHD	15	187 (10)		
		40	ЭмбНС x stcK2	16	134 (5)	0,0041	
			ЭмбНС x stcHD	21	161 (7)		
		50	ЭмбНС x stcK2	24	106 (6)	0,1268	
			ЭмбНС x stcHD	18	92 (7)		
Горизонтально	Самки	10	НС1 x stcK	20	214 (8)		

		20	HC1 x stcHD	40	210 (7)	0,738			
			HC1 x stcK	30	156 (5)				
			HC1 x stcHD	30	165 (10)	0,393			
		40	HC1 x stcK	31	86 (5)				
			HC1 x stcHD	32	95 (6)	0,305			
		50	HC1 x stcK	33	64 (5)				
			HC1 x stcHD	30	75 (5)	0,113			
		Горизонтально	Самцы	10	HC1 x stcK	32	164 (11)		
					HC1 x stcHD	34	132 (9)	0,0310	
20	HC1 x stcK			30	143 (12)				
	HC1 x stcHD			30	111 (9)	0,0360			
40	HC1 x stcK			30	37 (4)				
	HC1 x stcHD			30	80 (7)	< 0,0001			
50	HC1 x stcK			35	27 (3)				
	HC1 x stcHD			28	63 (7)	< 0,0001			

* Каждая пробирка содержала по 10 особей (анализ мутации) или 5 особей (анализ нокдаунов).

** Среднее число пересечений мухами трех светодиодных колец, работающих в инфракрасном диапазоне, за 5 минут.

Описание генотипов дано в разделе «Материалы и методы».

При анализе мутации достоверности указаны для сравнения контроля с мутантом и для сравнения реверсий с мутантом и контролем. При анализе нокдаунов достоверности указаны для сравнения с контролем.

Достоверные значения *P* выделены жирным шрифтом. В случае множественных сравнений (значения *P* выделены курсивом) значения *P*, достоверные после коррекции Бонферрони, подчеркнуты жирной чертой.

Таблица 7. Плодовитость самок с мутацией и жизнеспособность их потомства.

Возраст, дни	Генотип	Число пробирок	Среднее (стандартная ошибка)	Достоверность отличия	
				t тест, ANOVA	Тест Краскела-Уоллиса
Число яиц на самку					
3	stcK1	20	3,67 (0,44)	0,0122	0,0049
	stcP	20	2,04 (0,43)		
20	stcK1	20	4,25 (0,91)	0,4711	0,7762
	stcP	20	3,54 (0,77)		
40	stcK1	20	4,41 (0,97)	0,0069	0,0077
	stcP	20	2,28 (0,46)		
60	stcK1	20	3,51 (0,74)	0,0004	0,0001
	stcP	20	0,36 (0,12)		
Число взрослых потомков на самку					
3	stcK1	20	2,34 (0,28)	0,0188	0,0097
	stcP	20	1,34 (0,29)		
20	stcK1	20	3,07 (0,69)	0,0190	0,1711
	stcP	20	1,71 (0,39)		
40	stcK1	20	1,21 (0,27)	0,0007	0,0001
	stcP	20	0,42 (0,05)		
60	stcK1	20	0,02 (0,02)		
	stcP	20	0		
Жизнеспособность от яйца до куколки					
3	stcK1	20	0,674 (0,035)	0,6229	0,7571
	stcP	20	0,705 (0,051)		
20	stcK1	20	0,714 (0,037)	0,0012	0,0015

	stcP	20	0,485 (0,054)		
40	stcK1	20	0,276 (0,042)	0,0001	0,0001
	stcP	20	0,030 (0,014)		
60	stcK1	20	0		
	stcP	20	0		
Жизнеспособность от яйца до взрослой особи					
3	stcK1	20	0,655 (0,067)	0,9655	0,8286
	stcP	20	0,658 (0,047)		
20	stcK1	20	0,696 (0,036)	0,0005	0,0005
	stcP	20	0,460 (0,050)		
40	stcK1	20	0,267 (0,041)	0,0001	0,0001
	stcP	20	0,029 (0,014)		
60	stcK1	20	0		
	stcP	20	0		

Описание генотипов дано в разделе «Материалы и методы».

Достоверности указаны для сравнения контроля с мутантом. Достоверные значения P выделены жирным шрифтом.

Таблица 8. Изменение количества транскриптов потенциальных генов-нейрональных мишеней при нокадауне *stc* в потомстве от скрещивания ЭмбНСхstcНД по сравнению с контрольной линией stcК2.

Изучаемый ген	Генотип	Число опытов	Средняя относительная нормализованная экспрессия (стандартная ошибка), условные единицы	Изменение экспрессии	Достоверность отличия	
					t тест	Тест Краскела-Уоллиса
<i>N</i>	stcК2	3	0,977 (0,28)			
	ЭмбНСхstcНД	3	1,66 (0,08)	+70%	0,0407	0,0495
<i>Unc-115a</i>	stcК2	3	1,200 (0,07)			
	ЭмбНСхstcНД	3	1,480 (0,08)	+23%	0,0142	0,0453
<i>Unc-115b</i>	stcК2	4	0,007 (0,00)			
	ЭмбНСхstcНД	4	1,832 (0,21)	+26071%	0,0007	0,0209
<i>Vkg</i>	stcК2	3	0,824 (0,13)			
	ЭмбНСхstcНД	3	1,687 (0,11)	+105%	0,0034	0,0495
<i>Col4a1</i>	stcК2	3	0,894 (0,17)			
	ЭмбНСхstcНД	3	2,094 (0,07)	+134%	0,0016	0,0495

Описание генотипов дано в разделе «Материалы и методы».

При анализе мутации достоверности указаны для сравнения контроля с мутантом и для сравнения реверсий с мутантом и контролем. При анализе нокадаунов достоверности указаны для сравнения с контролем. Достоверные значения *P* выделены жирным шрифтом.