

На правах рукописи

Шилова

ШИЛОВА

Любовь Алексеевна

РОЛЬ МЕХАНИЗМОВ РЕПАРАЦИИ ДНК В РАДИАЦИОННОМ АДАПТИВНОМ ОТВЕТЕ
DROSOPHILA MELANOGASTER

03.02.08 – экология (биология)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Сыктывкар 2014

Работа выполнена в отделе радиэкологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Москалев Алексей Александрович, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией молекулярной радиобиологии и геронтологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН, заведующий кафедрой экологии Сыктывкарского государственного университета, заведующий лабораторией генетики продолжительности жизни и старения в Московском физико-техническом институте

Официальные оппоненты:

Осипов Андреян Николаевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией радиационной биофизики Государственного научного центра Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна

Мыльников Сергей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук (г. Екатеринбург)

Защита состоится «___» _____ 2014 г. в часов на заседании диссертационного совета Д004.007.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН по адресу: 167982, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Коммунистическая, 28

e-mail: dissovet@ib.komisc.ru

Сайт института: www.ib.komisc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Коми научного центра Уральского отделения РАН по адресу: 167982, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Алевтина Григорьевна Кудяшева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Основной задачей факториальной экологии является изучение механизмов ответа биологических систем на стрессовые воздействия окружающей среды, которые отражают возможности данных систем использовать эволюционно возникшие адаптивные морфогенетические программы (Васильев, 1988, 2005). Основной целью естественного отбора является обеспечение воспроизводства вида, в связи с чем, генетические программы ограничивают жизнь репродуктивным периодом (Skulachev, 2001). Однако существуют разногласия относительно существования специальных генетических программ (Мыльников, 1997).

Эндогенные и экзогенные факторы приводят к большому количеству повреждений, при этом повреждения молекул ДНК наиболее опасны вследствие угрозы нарушения генетической информации. Например, облучение или поступление ионов тяжелых металлов в организм животных приводит к дозозависимому увеличению количества ДНК-белковых сшивок в клетках головного мозга (Осипов, Сыпин, 1999). Накопление большого количества не восстановленных повреждений ДНК, особенно в участках, которые кодируют жизненно-важные белки, снижает приспособленность особи. Репарация ДНК является одним из ключевых механизмов ответа на повреждения ДНК. На данный момент имеется небольшое количество данных о роли генов репарации ДНК в обеспечении стрессоустойчивости целого организма. Известно, что с возрастом происходит снижение эффективности репарации ДНК (Guo et al., 1998; Mechanisms and implications..., 2000; Age-related loss..., 2006; Vyjayanti, Rao, 2006). Установлено, что мутации некоторых генов репарации ДНК могут приводить к снижению продолжительности жизни (ПЖ) и гиперчувствительности к стрессовым воздействиям (Down-regulation of..., 1997; Restoring DNA repair..., 2005; Carter et al., 2005; Kujoth et al., 2005).

Для выявления роли генов в регуляции ПЖ и стрессоустойчивости, обычно используют экспериментальные подходы, заключающиеся в снижении активности или полном выключении исследуемых генов, либо в искусственной сверхактивации этих генов. Удобным объектом подобных исследований является плодовая мушка *Drosophila melanogaster*, находящаяся в контролируемых лабораторных условиях, которые позволяют оценивать действие исследуемого фактора в «чистом» виде. Наряду с этим, наличие полной информации о геноме и обширной коллекции лабораторных линий с различными генетическими модификациями, простоте содержания и короткому жизненному циклу позволяют не только исследовать механизмы действия фактора, но и оценить роль генотипа.

Цель и задачи исследования. Цель исследования заключалась в изучении роли генов репарации ДНК в обеспечении устойчивости *Drosophila melanogaster* к различным

повреждающим факторам окружающей среды (ионизирующее излучение, действие прооксидантов, гипертермия, голодание). Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) исследовать радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса по продолжительности жизни у особей *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S* и линий с мутациями генов репарации ДНК (*D-Gadd45*, *mei-9*, *Mus209*, *mus210*, *Mus309*, *okr*, *spn-B*);

2) оценить влияние хронического (40 сГр) воздействия γ -излучения на предимагинальных стадиях развития на изменение уровня экспрессии генов репарации ДНК (*D-Gadd45*, *mei-9*, *Mus209*, *mus210*, *Mus309*, *okr*, *spn-B*) у имаго линии дикого типа *Canton-S* с возрастом;

3) проанализировать выживаемость после острого (30 Гр) воздействия γ -излучения у дрозофил со сверхэкспрессией генов репарации ДНК (*Brca2*, *D-Gadd45*, *Hus1*, *Ku80*, *mei-9*, *mnk*, *mus210*, *Rrp1*, *spn-B*, *WRNexo*);

4) изучить устойчивость к действию прооксидантов, гипертермии и голодания у дрозофил со сверхэкспрессией генов репарации ДНК (*Brca2*, *D-Gadd45*, *Hus1*, *Ku80*, *mei-9*, *mnk*, *mus210*, *Rrp1*, *spn-B*, *WRNexo*).

Научная новизна. Впервые в комплексных экспериментах *in vivo* доказана роль генов, участвующих в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*, *Mus309*), генов эксцизионной репарации нуклеотидов (*mei-9*, *mus210*, *Mus209*) и оснований (*Mus209*, *Rrp1*), генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации (*Brca2*, *Mus309*, *okr*, *spn-B*) и негомологичного воссоединения концов (*Ku80*, *WRNexo*) в обеспечении устойчивости целостного организма к стресс-факторам различной природы – ионизирующему излучению, действию прооксидантов, гипертермии, голоданию. Доказано, что хроническое воздействие γ -излучения в малой дозе (40 сГр) на предимагинальных стадиях развития особей линии дикого типа *Canton-S* приводит к увеличению экспрессии большинства изученных генов репарации ДНК у имаго, которая сохраняется на протяжении всей жизни дрозофил. Показано, что кондиционная повсеместная сверхэкспрессия исследуемых генов репарации ДНК не индуцирует устойчивость к γ -излучению, но сверхактивация генов *Brca2*, *D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*, *mus210*, *Ku80*, *Rrp1*, *spn-B* и *WRNexo* повышает устойчивость дрозофил к действию прооксидантов, гипертермии и голоданию.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования раскрывают роль исследуемых механизмов репарации ДНК в ответе целого организма на такие факторы среды как, ионизирующее излучение, действие прооксидантов, гипертермия, голодание. С помощью доступных демографических методов анализа изучены и изложены связи между

отдельными клеточными процессами в изменении параметров жизнедеятельности целого организма, в частности, продолжительности жизни. Наличие ортологов исследуемых генов в геноме человека и млекопитающих позволяет рассматривать их в качестве мишеней для разработки препаратов фармакологического и генотерапевтического улучшения стрессоустойчивости организма в целях радиопротекции, геропротекции и цитопротекции, а также для прогнозирования отдаленных последствий облучения организма.

Личный вклад автора. Соискатель принимал активное участие в постановке и решении задач исследования, в сборе экспериментальных данных, самостоятельно провел статистическую обработку и анализ данных, обобщение результатов и подготовку публикаций.

Апробация. Результаты работы докладывались на научных конференциях молодых ученых Института биологии (Сыктывкар, 2012; 2013), на международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2012; 2014), международной конференции «Генетика старения и долголетия» (Москва, 2012; Сочи, 2014), ежегодном съезде европейского общества по радиационным исследованиям (Италия, 2012; Ирландия, 2013, Греция, 2014), международной школе молодых учёных по молекулярной генетике «Непостоянство генома» (Звенигород, 2012), международном съезде геронтологов и гериатров (Сеул, 2013), международной конференции «БИОРАД-2014» (Сыктывкар, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), выводов, приложения и списка цитируемой литературы, содержащего 432 источника публикаций, в том числе 378 публикаций из зарубежных изданий. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста и содержит 12 таблиц и 23 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе рассмотрены данные литературы по основным механизмам влияния экологических факторов (ионизирующее излучение, действие прооксидантов, голодание и гипертермия) на ПЖ и старение организма. Обсуждаются эффекты окислительного стресса основных клеточных структур (липидов, белков, нуклеиновых кислот), биологические ответы на действие ионизирующих излучений (в частности, в малых дозах) и их молекулярно-генетические механизмы. Особое внимание уделяется обсуждению механизмов репарации ДНК и их вкладу в регуляцию продолжительности жизни организма и стрессоустойчивость.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *Drosophila melanogaster*. Для проведения экспериментов использовали следующие лабораторные линии *Drosophila melanogaster*: линия дикого типа *Canton-S*; линии с мутациями в исследуемых генах репарации ДНК: *mei-9/* (генотип: $w^1 mei-9^{A1}$), *mei-9/+* (генотип: $w^1 mei-9^{A2}/C(1)DX, y^1 f^1$), *Mus209/+* (генотип: $Mus209^{B1} b pr cn/CyO$), *Mus309/+* (генотип: $Mus309^{D3} ry^{506}/TM3, Sb^1 ryRK$), *spn-B/+* (генотип: $Dp(1;Y)B^S, B^+; ru^1 st^1 spn-B^1 e^1 ca^1/TM3, Sb^1$), *okr/+* (генотип: $okr^{A19-10} cn^1 bw^1/CyO$) (Bloomington Stock Center, США), *D-Gadd45/ D-Gadd45, D-Gadd45/+* (генотип: y^*w^* ; $P\{GawB\}Gadd45^{NP0351}/CyO, P\{UAS-lacZ.UW14\}UW14$), *mus210/+* (генотип: $mus210^{G1}/CyO$) («Kyoto Stock Center», Япония); линии дрозофил, в геном которых встроены дополнительные копии исследуемых генов под контролем промотора UAS, индуцируемого драйвером *GAL4*: w^{1118} , *UAS-Brca2*; w^{1118} , *UAS-Hus1*; w^{1118} , *UAS-mnk*, *UAS-spn-B* (любезно предоставлены Dr. Schupbach, «Princeton University», Принстон, США), w^{1118} , *UAS-Ku80*; w^{1118} , *UAS-me-9*; w^{1118} , *UAS-mus210*; w^{1118} , *UAS-Rrp1*; w^{1118} , *UAS-WRNexo* (созданы с передачей авторских прав под заказ в «Genetivision», Хьюстон, США); В качестве драйверной (тестерной) использовали линию *P{Act5C(-FRT)GAL4.Switch.PR}3/TM6B, Tb¹* (далее – *GS-GAL4*) («Bloomington Stock Center», США).

Дрозофил содержали в термостате при 25 °C и 12-часовом режиме освещения на стандартной агарно-дрожжевой питательной среде (Ashburner, 1989).

Активация кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК. Для сверхактивации генов репарации ДНК использовали RU486-активируемый GeneSwitch (A conditional..., 2001; P[Switch]..., 2001), *GAL4/UAS* метод (Brand, Perrimon, 1993).

Оценка стрессоустойчивости. Для определения устойчивости к действию прооксидантов дрозофил рассаживали в банки с фильтровальной бумагой, пропитанной раствором 20 мМ параквата (Methyl Viologen, Sigma) в 5 % сахарозе, при температуре 25 °C. Для оценки устойчивости к тепловому шоку мух содержали на стандартной агарно-дрожжевой питательной среде, при температуре 35 °C. Для определения устойчивости к голоданию дрозофил помещали в банки с фильтровальной бумагой, пропитанной водой, при температуре 25 °C. Эксперименты вели до гибели последней дрозофилы. Два раза в день подсчитывали количество умерших особей, после чего анализировали показатели выживаемости: медианную и среднюю ПЖ, процент умерших особей через 24 ч и 48 ч после начала воздействия.

Оценка выживаемости при действии облучения. Хроническое воздействие ИИ в дозе 40 сГр осуществляли от внешнего источника ^{226}Ra (от стадии яйца до вылета имаго, в среднем 12 сут) при мощности дозы 0.14 сГр/ч. Острое воздействие в дозе 30 Гр осуществляли от внешнего источника ^{60}Co (50 мин) при мощности дозы 0.6 Гр/мин (Рокус АМ).

Для оценки влияния искусственной индукции генов репарации ДНК на радиоустойчивость исследовали выживаемость облученных в дозе 30 Гр молодых (2-3 сутки после вылета) имаго с кондиционной повсеместной сверхэкспрессией генов репарации ДНК, особей каждого варианта разделили на четыре группы: 1) без облучения, без сверхэкспрессии; 2) без облучения со сверхэкспрессией; 3) 30 Гр без сверхэкспрессии; 4) 30 Гр со сверхэкспрессией. Для исследования радиоадаптивного ответа у дрозофил линии дикого типа *Canton-S* и линий с мутациями в генах репарации ДНК, особей каждого из изучаемых генотипов разделили на четыре группы: 1) без облучения; 2) особи, подвергшиеся на предимагинальных стадиях развития хроническому воздействию ИИ в дозе 40 сГр; 3) особи, подвергшиеся острому воздействию ИИ в дозе 30 Гр сразу после вылета имаго; 4) особи, последовательно подвергшиеся хроническому и острому облучению (40 сГр + 30 Гр).

Ежедневно проводили подсчет числа умерших мух. По полученным данным строили кривые выживаемости и рассчитывали среднюю, медианную, минимальную, максимальную ПЖ, возраст 90 % смертности и время удвоения интенсивности смертности.

Оценка возраст-зависимой динамики экспрессии изучаемых генов. Изучали возраст-зависимое изменение экспрессии генов репарации ДНК у облученных в дозе 40 сГр и необлученных особей линии дикого типа *Canton-S* на 1, 14, 28, 42 и 56 сут после вылета имаго. Хроническое воздействие ИИ в дозе 40 сГр осуществляли от внешнего источника ^{226}Ra (от стадии яйца до вылета имаго, в среднем 12 сут) при мощности дозы 0.14 сГр/ч.

Экспрессию генов измеряли методом количественного ПЦР в «реальном времени» с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). РНК выделяли с помощью Aurum Total RNA mini kit (Bio-Rad) по инструкции изготовителя. Из полученного раствора РНК синтезировали кДНК по инструкции SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Реакционную смесь для проведения реакции ПЦР готовили по инструкции изготовителя Applied Biosystems (Invitrogen) с красителем SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) и праймеров (СИНТОЛ). Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad), используя следующую программу: 1) 95 °C в течение 10 мин, 2) 95 °C в течение 15 с, 3) 60 °C в течение 60 с, 4) этапы 2-3 повторяли 50 раз.

Экспрессию исследуемых генов рассчитывали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства *β -Tubulin* с использованием программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad).

Статистический анализ результатов. Для сравнения распределения смертности в выборках использовали критерий Колмогорова-Смирнова (Fleming et al., 1980), для сравнения различий по медианной ПЖ – критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона (Breslow, 1970). Достоверность различий по максимальной ПЖ оценивали с помощью метода Ванг-Аллисона

(Statistical methods..., 2004). Для сравнения доли умерших особей спустя 24 или 48 ч использовали ϕ -критерий Фишера для выборочных долей (Fisher, 1915). Достоверность различий между значениями относительной экспрессии генов оценивали с помощью t -критерия Стьюдента для независимых выборок (Student, 1908). Анализ данных выполняли в статистических пакетах Statistica 8.0 (StatSoft), WinModest 1.0.2 (Pletcher, 1999) и R 3.0.1 (R Core Team).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса по показателям продолжительности жизни у линии дикого типа *Canton-S* и линий с мутациями в генах репарации ДНК в ответ на γ -излучение

Исследовали радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса у линии дикого типа *Canton-S* и линий с мутациями в генах ответа на повреждение ДНК (*D-Gadd45*), эксцизионной репарации ДНК (*mei-9*, *mus210*, *Mus209*), репарации двуцепочечных разрывов ДНК (*okr*, *spn-B*, *Mus309*).

Хроническое воздействие γ -излучения в малых дозах на предимагинальных стадиях развития индуцировало радиоадаптивный ответ на острое воздействие γ -излучения у особей линии дикого типа *Canton-S*. Воздействие только острого облучения в дозе 30 Гр снизило медианную ПЖ (МПЖ) самцов и самок на 51 – 57 %, возраст 90 % смертности на 34 – 55 % ($p < 0.001$). Предварительное хроническое воздействие γ -излучения в дозе 40 сГр способствовало тому, что после острого облучения МПЖ снизилась только на 6 – 21 %, возраст 90 % смертности на 3 – 12 % ($p < 0.001$) (рис. 1). Обнаружено проявление радиационного гормезиса. Воздействие в дозе 40 сГр на предимагинальных стадиях развития способствовало увеличению МПЖ на 12 – 15 %, относительно необлученных особей ($p < 0.001$). Анализ других параметров ПЖ (средняя ПЖ, MRDT, возраст гибели 90 % особей) подтвердил данный результат. Радиоадаптивный ответ и радиационный гормезис сохранялись у гетерозигот с мутациями генов *Mus209* (гомолог гена *PCNA* млекопитающих) и *mus210* (*XPC*), но проявлялись в меньшей степени, чем у особей дикого типа *Canton-S*. Так, различия по МПЖ между вариантами эксперимента с острым облучением в дозе 30 Гр и последовательным воздействием излучения при дозах 40 сГр и 30 Гр у этих генотипов составил 5 – 21 % ($p < 0.001$) (рис. 1). У самцов и самок дрозофил с мутациями генов *mei-9* (*XPF*) и гена *D-Gadd45* (*Gadd45*) радиоадаптивный ответ и эффект гормезиса отсутствовали. У гомо- и гемизигот с мутацией гена *mei-9*, подверженных острому облучению с предоблучением относительно особей без предоблучения наблюдали снижение МПЖ на 18 – 34 %, возраста 90 % смертности на 7 – 9 % ($p < 0.001$). У гетерозигот наблюдали снижение МПЖ на 18 %, возраста 90 % смертности на 5 % (рис. 1). У особей-гомозигот с мутациями в гене *D-Gadd45* наблюдали снижение МПЖ на 10 – 30 %, возраста 90 % смертности на 19 %, по сравнению с

необлученными мухами. Здесь же у гетерозигот наблюдали снижение МПЖ лишь на 5 – 14 %, возраста 90 % смертности на 8 – 19 % ($p < 0.001$) (рис1).

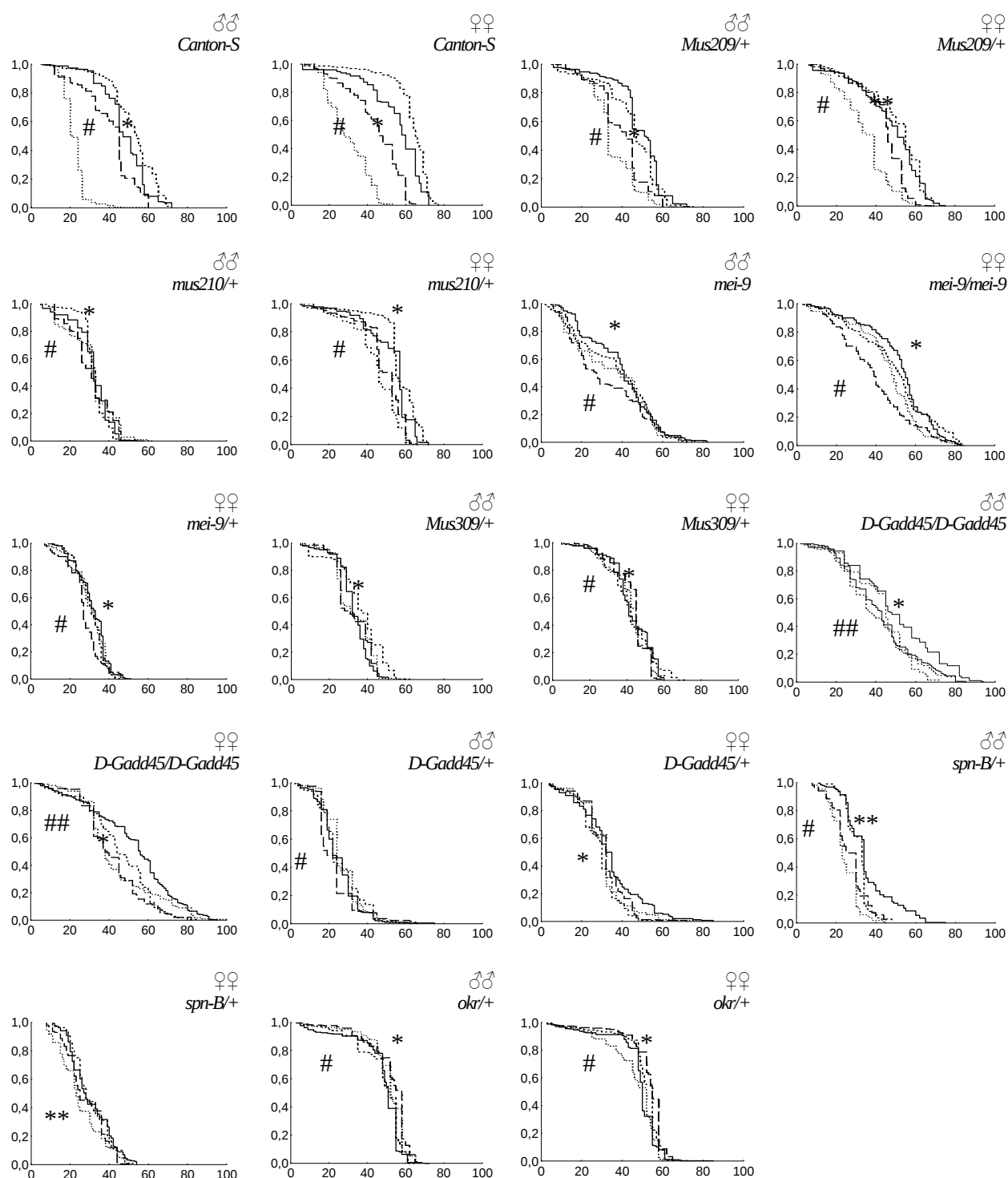


Рис. 1. Влияние различных режимов воздействия γ -излучения на продолжительность жизни самцов (♂♂) и самок (♀♀) дрозофил линии дикого типа *Canton-S* и особей с мутациями в генах репарации ДНК. Данные двух повторностей были объединены. По оси ОУ – Функция дожития, по оси ОХ – Возраст, сут.

Обозначения: — без облучения, --- 40 сГр, 30 Гр, —·— 40 сГр + 30 Гр; * - $p < 0.001$, ** - $p < 0.05$ Без облучения относительно 40 сГр, # - $p < 0.001$, ## - $p < 0.05$ 30 Гр относительно 40 сГр + 30 Гр по критерию Колмогорова-Смирнова.

У гетерозигот с мутацией в гене *Mus309 (Blm)* радиоадаптивный ответ отсутствовал. Однако у самцов данной линии проявлялся эффект гормезиса. Наблюдали увеличение МПЖ на 16 %, возраста 90 % смертности на 21 %, по сравнению с необлученными особями ($p < 0.001$) (рис. 1). Радиоадаптивный ответ сохранялся у гетерозигот с мутациями в генах *spn-B (XRCC3)* и *okr (rad54)*, но проявлялся в меньшей степени по сравнению с особями линии дикого типа *Canton-S*. МПЖ увеличилась на 10 – 14 %, возраст 90 % смертности на 5 – 13 %. Эффекта радиационного гормезиса у данных линий не обнаружено (рис. 1).

Таким образом, у особей с мутациями в генах эксцизионной репарации ДНК и генов репарации двухнитевых разрывов ДНК радиоадаптивный ответ отсутствует, либо проявляется в меньшей степени, чем у особей линии дикого типа *Canton-S*.

3.2. Возраст-зависимое изменение уровня экспрессии генов репарации ДНК у линии дикого типа *Canton-S* после хронического воздействия γ -излучения

После хронического воздействия ИИ на предимагинальных стадиях развития в дозе 40 сГр у имаго линии дикого типа *Canton-S* наблюдали повышение экспрессии генов репарации ДНК *mei-9*, *mus210*, *Mus209*, *Mus309*, *spn-B* и *okr* в 1.6 – 2.6 раза по сравнению с необлученными животными ($p < 0.05$ по t-критерию Стьюдента). Повышенные уровни экспрессии генов *mei-9*, *Mus209* и *Mus309* сохранялись до 56 сут жизни. Активность гена *D-Gadd45* на протяжении всей жизни не различалась между контрольными и облученными животными.

Таким образом, хроническое воздействие ионизирующего излучения в малой дозе на предимагинальных стадиях развития приводит к увеличению экспрессии большинства изученных генов ответа на повреждение ДНК, эксцизионной репарации ДНК и гомологичной рекомбинации, которая сохраняется на протяжении всей жизни дрозофил.

3.3. Оценка выживаемости при остром облучении у линий со сверхэкспрессией генов репарации ДНК

Кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК *D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk* не повышала устойчивость дрозофил к действию облучения в дозе 30 Гр, а наоборот, усиливала негативное влияние острого облучения на ПЖ. Наблюдали снижение МПЖ на 71 – 75 % по сравнению с облученными особями без сверхэкспрессии ($p < 0.05$) (рис. 2). У облученных дрозофил, с кондиционной повсеместной сверхактивацией генов эксцизионной репарации *Rrp1*, *mei-9*, *mus210* наблюдали снижение МПЖ на 59 – 74 % (рис. 2). У дрозофил с кондиционной повсеместной сверхэкспрессией генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК *Brca2*, *spn-B*, *Ku80* и *WRNexo* также не обнаружили

повышения устойчивости к острому γ -излучению. Наблюдали снижение МПЖ на 58 – 67 % ($p<0.05$). Анализ других параметров ПЖ (средняя ПЖ, MRDT, возраст гибели 90 % особей) подтвердил данный результат.

Во всех вариантах исследования кондиционная повсеместная сверхактивация генов репарации ДНК приводила к снижению параметров ПЖ, относительно мух без сверхэкспрессии. Например наблюдали снижение МПЖ на 49 – 72 % ($p<0.05$) (рис. 2).

Таким образом, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия исследуемых генов репарации ДНК не индуцировала устойчивость *Drosophila melanogaster* к острому воздействию γ -излучения, а наоборот усиливала негативное влияние острого воздействия в дозе 30 Гр на ПЖ.

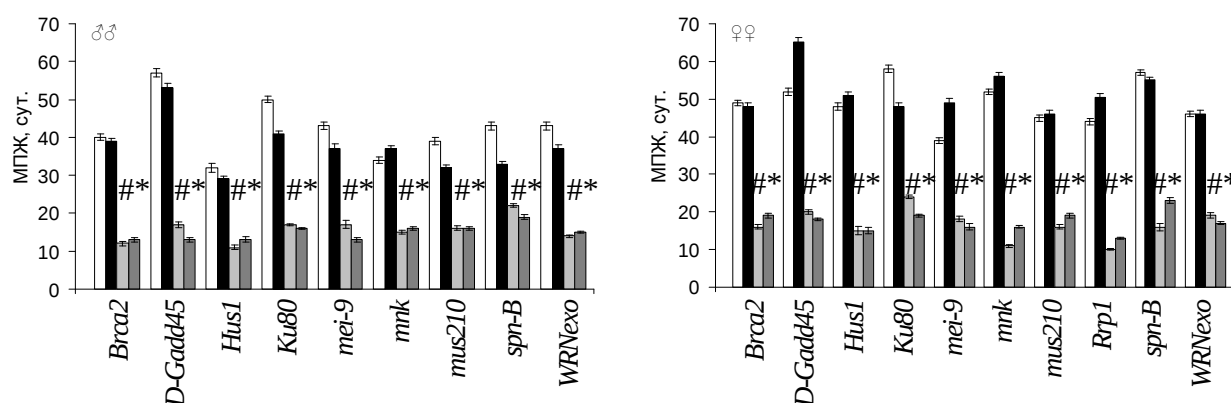


Рис. 2. Влияние кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК на медианную продолжительность жизни (МПЖ) самцов (♂♂) и самок (♀♀) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр. Данные двух повторностей были объединены. Показаны ошибки медианы.

Обозначения: □ - без сверхэкспрессии, ■ - без сверхэкспрессии 30 Гр, ▒ - сверхэкспрессия, ▒ - сверхэкспрессия 30 Гр. * – $p<0.05$ без сверхэкспрессии 30 Гр относительно сверхэкспрессия 30 Гр, # – $p<0.05$ без сверхэкспрессии относительно сверхэкспрессия по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона

3.4. Влияние кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию стресс-факторов различной природы (прооксиданту параквату, гипертермии, голоданию)

Сверхэкспрессия генов репарации ДНК *spn-B* и *mus210* у самцов и генов *D-Gadd45*, *Hus1* и *spn-B* у самок увеличивала МПЖ в условиях прооксиданта параквата на 15 – 77 %, относительно особей без сверхэкспрессии ($p<0.05$) (таблица). У самцов со сверхэкспрессией генов *Brca2*, *Hus1* и *Rrp1*, а также самок со сверхэкспрессией *mnk* средняя ПЖ в условиях гипертермии была выше на 7 – 55 % по сравнению с контрольными особями ($p<0.05$) (таблица). Повышенная транскрипционная активность генов *Brca2*, *D-Gadd45*, *spn-B*, *WRNexo* у самцов привела к повышению средней ПЖ в условиях голодания на 8 – 45 %, относительно особей без сверхэкспрессии ($p<0.05$). Сверхэкспрессия генов репарации ДНК в остальных вариантах не повлияла на медианную выживаемость, либо вызвала негативный эффект (таблица).

Влияние сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию окислительного стресса, гипертермии и голоданию

Вариант эксперимента	Параquat 20 мМ			Гипертермия 35 °C			Голодание		
	М	$\bar{X} \pm \Delta m$	48 ч	М	$\bar{X} \pm \Delta m$	24 ч	М	$\bar{X} \pm \Delta m$	48 ч
♂ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (-)	54	53.3±1.7*	46	33	36.6±0.9	6	32	36.4±1.0	98
♂ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (+)	46	49.6±3.0	59*	48*	39.6±1.0*	12	48*	44.1±1.5*	81*
♀ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (-)	31	40.9±2.0	73	48	41.8±0.8	5	48	42.3±1.1	80
♀ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (+)	22*	35.1±2.1*	82*	33*	34.5±0.6*	14*	33*	38.8±1.0	96*
♂ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (-)	48	42±1.2	92	33	34.7±0.8	31	56	62.9±0.9	85
♂ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (+)	33*	33.9±1*	97*	33	37±0.7*	30	69*	57±1.9*	33*
♀ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (-)	24	29.4±0.6	100	48	39.9±0.7	13	56	55.6±0.5	24
♀ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (+)	33*	34.8±0.9*	96*	24*	33.8±1.1*	54*	56	60±2.4*	49*
♂ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (-)	55	62.4±2.3	28	23	29.8±1.0	9	48	40.6±0.8	86
♂ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (+)	55*	51.6±3.1*	50*	32*	34.6±1.1*	31*	48	48.9±1.2*	78*
♀ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (-)	46	45.9±2.0	66	32	29.5±0.8	45	48	52.1±1.2	59
♀ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (+)	55*	62.3±2.8*	46*	32	37.0±0.9*	9*	48	44.6±1.3*	71*
♂ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (-)	78	80.0±1.5	9	39	32.8±0.8	38	32	38.9±1.0	30
♂ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (+)	70	76.7±2.6	18*	24*	26.3±0.8*	76*	32	34.9±1.1*	99*
♀ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (-)	46	58.3±2.4	56	39	38.9±0.3	2	48	42.1±1.2	100
♀ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (+)	31	56.1±3.5	58	39	35.8±0.7*	17*	32*	36.6±0.9*	76*
♂ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (-)	78	84.9±3.5	25	39	32.2±0.9	40	48	42.2±2.1	66
♂ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (+)	46*	59.1±2.6*	52*	24*	28.0±0.8*	69*	48	40.3±1.0*	87*
♀ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (-)	70	69.9±3.5	41	39	36.7±0.7	14	48	53.4±1.8	68
♀ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (+)	70	73.7±4.4	43	39	39.6±0.7*	9	48	48.6±1.6*	65
♂ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (-)	54	54.3±2.2	26	31	33.8±0.9	23	33	37.9±0.8	93
♂ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (+)	31*	38.3±1.6*	66*	31	32.5±0.8	20	48	40.9±1.4*	73*
♀ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (-)	55	51.4±1.8	46	31	36.1±0.6	4	48	43.2±1.1	84
♀ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (+)	48	50.9±2.1	60*	48*	40.1±0.8*	5	48	39.3±1.1	94
♂ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (-)	55	60.4±2.3	32	32	27.4±0.5	49	48	43.1±1.1	88
♂ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (+)	70*	69.5±2.4	30	23*	23.7±0.4*	85*	48	38.1±1.1	99*
♀ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (-)	46	49.1±2.3	67	39	39.4±0.3	2	48	41.4±1.0	93
♀ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (+)	30*	42.6±2.1	81*	39	32.6±0.8*	34*	48	44.7±1.3*	69*
♂ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (-)	72	63.2±1.9	31	24	27.5±0.8	67	56	60.1±1.4	29
♂ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (+)	72	62.3±2.2	33	39*	34.4±0.7*	26*	47*	50.7±1.3*	62*
♀ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (-)	72	68.0±2.7	38	39	38.6±0.5	7	47	55.0±1.1	55
♀ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (+)	47*	48.2±2.0*	73*	24*	29.3±0.9*	57*	47	49.8±1.6*	51
♂ <i>UAS-sp1-B/GS-GAL4</i> (-)	31	38.4±2.2	4	48	28.7±0.5	5	31	34.6±0.9	100
♂ <i>UAS-sp1-B/GS-GAL4</i> (+)	55*	61.4±1.5	4	48	32.2±0.9	4	48*	40.9±1.1	91*
♀ <i>UAS-sp1-B/GS-GAL4</i> (-)	31	38.3±1.9	4	31	42.2±0.8	2	48	50.2±1.4	5
♀ <i>UAS-sp1-B/GS-GAL4</i> (+)	40*	38.3±1.7	5	31	44.1±0.7	1	48	52.1±1.1	4
♂ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (-)	80	81.6±3.0	26	32	29.4±0.6	42	31	32.2±1.1	98
♂ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (+)	80	64.9±3.3*	37	32	30.4±0.5	26*	48*	46.8±1.0*	75*
♀ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (-)	95	91.1±4.0	28	32	29.8±0.5	37	48	44.4±0.8	93
♀ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (+)	72*	77.9±3.5*	36*	32	33.6±0.8	21*	48	43.0±0.9	91

Обозначения: ♂ - самцы; ♀ - самки; (-) – без сверхэкспрессии; (+) – сверхэкспрессия; *M* – медианная продолжительность жизни (сут); $\bar{X} \pm \Delta m$ – средняя продолжительность жизни (сут); 24 ч и 48 ч – процент умерших особей через 24 ч и 48 ч после начала воздействия; *N* – количество мух в выборке; * – $p < 0.05$ (*M* – критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; $\bar{X} \pm \Delta m$ – критерий Колмогорова-Смирнова, 24 ч и 48 ч – ϕ -критерий Фишера). Объем выборки: 90 – 230 мух на вариант.

Таким образом, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов *Brca2*, *D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*, *mus210*, *Ku80*, *Rrp1*, *sp1-B* и *WRNexo* повышает устойчивость (повышение одного или нескольких параметров выживаемости) дрозофил к исследуемым стресс-факторам. В остальных

вариантах экспериментов наличие в геноме дрозофил дополнительных активных копий генов репарации ДНК либо не стимулировало стрессоустойчивость особей, либо ухудшало ее.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день остаются нерешенными вопросы о дифференцированном вкладе молекулярно-клеточных процессов в эффекты, наблюдаемые на организменном уровне. В то же время это именно те изменения, которые играют определяющую роль в приспособленности особи и популяции к условиям окружающей среды. Согласно данным Лауры Саундерс и Эрика Вердина, неблагоприятные условия среды вызывают активацию внутриклеточных механизмов стрессоустойчивости и формирование адаптивного ответа по ПЖ у *Caenorhabditis elegans* (Saunders, Verdin, 2009). Используя линии *Drosophila melanogaster* с мутациями и сверхэкспрессией генов репарации ДНК и применяя ПЖ в качестве интегрального показателя стрессоустойчивости организма, мы изучили участие данных генов в обеспечении устойчивости дрозофил к действию различных факторов окружающей среды (ионизирующее излучение, действие прооксидантов, гипертермия, голодание).

В проведенных нами экспериментах, дрозофилы с мутациями генов *mei-9*, *D-Gadd45*, *Mus309* не проявляли радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса, за исключением самцов с мутацией в гене *Mus309*, у которых наблюдали эффект гормезиса (рис. 1). Это свидетельствует о важной роли данных генов в защите организма от воздействия радиационных повреждений. Ген *mei-9* является ортологом гена эксцизионной репарации ДНК млекопитающих *XPF*, который необходим для инициации эксцизионной репарации нуклеотидов (Boyd et al., 1976). Из данных литературы, известно, что рентгеновское облучение личинок третьего возраста (перед стадией куколки) с мутацией *mei-9^{Al}* индуцирует остановку клеточного цикла в клетках крыла имагинального диска (Kondo, Perimon, 2011) и возникновение апоптотических участков в клетках сетчатки (Jassim et al., 2003). Гомо- и гемизиготы с мутацией *mei-9^{Al}* и *mei-9^{A2}* чувствительны к таким факторам среды, как метил-метансульфонат и γ -лучи (Gatti, 1979; Smith, 1976; Flores, Engels, 1999; Radford et al., 2005). Ген *D-Gadd45* контролирует активность белков эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований, а также обеспечивает доступность поврежденных участков ДНК для ферментов репарации (Ma et al., 2009). По данным литературы известно, что гены семейства *Gadd45* также участвуют в ответе на окислительный стресс, гипоксию, низкочастотные электромагнитные поля, гиперосмотический стресс, воспалительный и онкогенный стресс, воздействие ксенобиотиков (например, мышьяк) и алкилирующих агентов (например, сульфонат метил метан), соединения хрома (VI), цисплатин, а также на другие загрязнители почв, воздуха и воды (Induction by ionizing..., 1991; Price, Calderwood,

1992; Zhang et al., 2001; DeHaan et al., 2001; Bulavin et al., 2003; Induction of pro-apoptotic..., 2004; Bower et al., 2006; Electromagnetic fields affect..., 2005; Low pH induces..., 2006; Sen et al., 2007; The transcription..., 2009). Ген *Mus309* кодирует гомолог RecQ-геликазы синдрома Блума, которая осуществляет раскручивание двойной спирали ДНК (Weinert, Rio, 2007), данный процесс необходим для различных видов репарации однонитевых и двунитевых разрывов ДНК. Из литературы известно, что личинки с мутацией *Mus309^{D2}/Mus309^{D3}* обладают повышенной чувствительностью к таким факторам среды, как метил-метансульфонат и γ -излучение (Beall, Rio, 1996; McVey et al., 2007). У особей-гетерозигот с мутациями в генах *Mus209*, *mus210*, *spn-B* и *okr* радиоадаптивный ответ сохранялся, но проявлялись в меньшей степени, чем у особей линии дикого типа *Canton-S* (рис. 1), это указывает на то, что данные гены принимают участие в ответе на действие ИИ. Ген *Mus209* кодирует гомолог белка млекопитающих PCNA и участвует в эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов, репарации мисматчей, репарации двунитевых разрывов, а также в процессе репликации ДНК (Henderson et al., 1994; Characterization of a..., 2006). Из литературы известно, что особи с мутацией *Mus209^{Bl}* чувствительны к гипертермии, ИИ и метил-метансульфонату (Henderson et al., 1994). Ген *mus210* является гомологом гена белка ХРС млекопитающих, который необходим для инициации эксцизионной репарации нуклеотидов. Известно, что в ответ на ИИ происходит активация данного гена (Long-term ХРС..., 2007; In vitro radiation..., 2007). У особей с мутацией *mus210^{G1}* скорость удаления УФ-индуцированных пиримидиновых димеров значительно ниже, чем у особей дикого типа (Luchkina et al., 1982). Ген *spn-B* является гомологом гена белка репарации двунитевых разрывов ДНК XRCC3 млекопитающих, который отвечает за гомологичную рекомбинацию и нехомологичное воссоединение концов ДНК (Lee, Orr-Weaver, 2003). Известно, что мутанты *spn-B¹* малочувствительны к рентгеновскому облучению в период от 24 до 72 ч после откладки яиц (Staeva-Vieira et al., 2003). Ген *okr* является ортологом гена *rad54* млекопитающих, продукт данного гена участвует в гомологичной рекомбинации (The *Drosophila melanogaster*..., 1999). Мутанты по данному гену характеризуются гиперчувствительностью к факторам среды метил-метансульфонату и рентгеновскому облучению (The *Drosophila melanogaster*..., 1999).

Феномен радиационного гормезиса и радиоадаптивного ответа связан с активацией защитных систем организма в ответ на воздействие радиоактивного излучения в малой дозе. В результате организм становится подготовленным к последующему острому повреждающему воздействию фактора. В пользу данного общепринятого объяснения говорят полученные нами результаты по возраст-зависимому изменению экспрессии генов репарации ДНК. После хронического воздействия γ -излучения в дозе 40 сГр у особей линии дикого типа *Canton-S* наблюдали повышение экспрессии генов *mei-9*, *mus210*, *Mus209*, *spn-B*, *okr*, *Mus309* в 1.6-2.6 раза,

по сравнению с необлученными животными. Повышенный уровень экспрессии генов *mei-9*, *Mus209* и *Mus309*, после воздействия ИИ, сохранялся до 56 сут жизни. Вероятно, увеличение активности этих генов способствует устойчивости организма к последующему воздействию спонтанных и индуцированных стресс-факторов, и обеспечивает долгосрочные эффекты хронического облучения в малой дозе, в частности, гормезис по ПЖ.

Основываясь на полученных данных, предположили, что избыточная экспрессия генов репарации ДНК приведет к повышению устойчивости к ионизирующей радиации, действию прооксидантов, гипертермии и голоданию. Было показано, что кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*), эксцизионной репарации нуклеотидов (*mei-9*, *mus210*) и оснований (*Rrp1*), репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации (*Brca2*, *spn-B*) и негомологичного воссоединения концов (*Ku80*, *WRNexo*) не индуцировала устойчивость к острому воздействию γ -излучения, а наоборот усиливала негативное влияние острого воздействия в дозе 30 Гр на ПЖ. При этом сама кондиционная повсеместная активация генов репарации ДНК приводит к достоверному снижению исследуемых параметров ПЖ, относительно мух без сверхэкспрессии. Сверхэкспрессия генов репарации *Brca2*, *D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*, *mus210*, *Ku80*, *Rrp1*, *spn-B* и *WRNexo* у самцов и/или самок приводила к повышению устойчивости к действию прооксидантов, гипертермии и голодания. В целом, белки, кодируемые этими генами необходимы для инициации и координации различных механизмов репарации одностранных и двуцепочечных разрывов ДНК (An essential role..., 2007; Functional analysis of..., 2008; Klovstad et al., 2008; Saunders et al., 2008; Ma et al., 2009; A network of..., 2009; DmWRNexo is..., 2009; Structure and functional..., 2009; Roy et al., 2011; Kadir et al., 2012; Kuper, Kisker, 2013). По-видимому, эти процессы играют важную роль в обеспечении устойчивости дрозофил к данным факторам. В остальных вариантах экспериментов наличие в геноме дрозофил дополнительных активных копий генов репарации ДНК либо не стимулировало стрессоустойчивость особей, либо ухудшало ее.

Причиной отсутствия или слабой выраженности стимулирования стрессо- и радиоустойчивости может быть недостаточная эпигенетическая регуляция процесса репарации ДНК. Например, показано, что в фибробластах человека повышенная активность генов репарации ДНК замедляет клеточное старение только на фоне одновременной сверхэкспрессии гена деацетилазы гистонов SIRT6 (Sirtuin 6..., 2012). Другой причиной снижения ПЖ может быть нарушение баланса между различными внутриклеточными путями и энергетическое истощение, поскольку репарация ДНК – это процесс, требующий больших энергетических затрат (Effect of poly..., 2001). Следовательно, сверхактивация изучаемых генов могла привести к чрезмерному

расходу энергии в ущерб другим жизненно важным процессам. При этом наши данные согласуются с теорией Михаила Благодосклонного, согласно которой, старение организма и возраст-зависимые болезни начинаются с гиперфункций клетки (Blagosklonny, 2009).

ВЫВОДЫ

1) Хроническое воздействие γ -излучения в малых дозах (40 сГр) на предимагинальных стадиях развития индуцировало эффект радиационного гормезиса и радиоадаптивный ответ на острое (30 Гр) воздействие излучения у особей линии дикого типа *Canton-S*. Особи с мутациями в генах, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*), эксцизионной репарации нуклеотидов (*mei-9*) и репарации по типу гомологичной рекомбинации (*Mus309*) радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса не проявляли, за исключением самцов с мутацией в гене *Mus309*, у которых наблюдали эффект гормезиса. У особей с мутациями в остальных генах радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса сохранялся, но проявлялся в меньшей степени, чем у особей линии дикого типа *Canton-S*.

2) Хроническое воздействие ионизирующего излучения в малой дозе (40 сГр) на предимагинальных стадиях развития особей линии дикого типа *Canton-S* привело к увеличению экспрессии генов эксцизионной репарации ДНК (*mei-9*, *mus210*, *Mus209*) и репарации двуцепочечных разрывов (*Mus309*, *spn-B*, *okr*) у имаго, которая сохранялась до конца жизни дрозофил. Экспрессия гена *D-Gadd45* между облученными и необлученными особями с возрастом не изменялась.

3) У трансгенных линий дрозофил, кондиционно-индуцированная повсеместная сверхэкспрессия генов эксцизионной репарации (*mei-9*, *mus210*, *Rrp1*), репарации двуцепочечных разрывов (*Brca2*, *spn-B*, *Ku80*, *WRNexo*) и генов распознавания повреждений (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*) снижала устойчивость дрозофил к гамма-излучению в дозе 30 Гр по параметрам продолжительности жизни, относительно облученных особей без сверхэкспрессии.

4) Кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*), генов эксцизионной репарации нуклеотидов (*mus210*) и оснований (*Rrp1*), генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации (*Brca2*, *spn-B*) и нехомологичного воссоединения концов (*Ku80*, *WRNexo*) повышает устойчивость дрозофил к исследуемым стресс-факторам. В остальных вариантах экспериментов наличие в геноме дрозофил дополнительных активных копий генов репарации ДНК либо не стимулировало стрессоустойчивость особей, либо ухудшало ее.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1) The role of *D-GADD45* in oxidative, thermal and genotoxic stress resistance / A. Moskalev, E. Plyusnina, M. Shaposhnikov, **L. Shilova**, et al. // *Cell Cycle*. 2012. Vol. 11. № 22. P. 4222–4241.

2) Анализ экспрессии генов как метод детектирования малых доз ионизирующих излучений, формальдегида и диоксинов / М.В. Шапошников, Е.Н. Плюснина, С.Н. Плюснин, О.А. Шосталь, **Л.А. Шилова**, и др. // *Теоретическая и прикладная экология*. 2013. №2. С. 20–28.

3) The effects of pectins on life span and stress resistance in *Drosophila melanogaster* / M. Shaposhnikov, D. Latkin, E. Plyusnina, **L. Shilova**, et al. // *Biogerontology*. 2014. Vol. 15. I. 2. P. 113–127.

4) **Шилова Л.А.**, Плюснина Е.Н., Москалев А.А. Влияние кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию стресс-факторов различной природы (оксидативному стрессу, тепловому шоку, голоданию) // *Известия Коми НЦ УрО РАН*. 2014. №2. С. 41–45.

5) Роль генов репарации ДНК в радиационно-индуцированном изменении продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* / **Л.А. Шилова**, Е.Н. Плюснина, Н.В. Земская, А.А. Москалев // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014. №5. С. 482–492.

В прочих изданиях:

1) Участие генов репарации ДНК в радиоадаптивном ответе у *Drosophila melanogaster* / Е.Н. Плюснина, Е.В. Романова, **Л.А. Шилова** и др. // 16-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых. Пушкино, 2012. С. 331–332.

2) Плюснина Е.Н., **Шилова Л.А.**, Москалев А.А. Исследование радиоадаптивного ответа у особей *Drosophila melanogaster* с мутациями в генах репарации ДНК // *Материалы докладов XIX Всероссийской молодежной научной конференции*. Сыктывкар, 2012. С. 202.

3) Plyusnina E.N., **Shilova L.A.**, Moskalev A.A. The role of D-GADD45 gene in lifespan regulation and radioadaptive response formation in *Drosophila melanogaster* // *Genetics of aging and longevity: Abstracts of reports of 2nd international conference*. Moscow, 2012. P. 71.

4) Radiation-induced adaptive response in fruit flies with mutations in DNA repair genes / A. Moskalev, E. Plyusnina, E. Romanova, **L. Shilova** // 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society. Vietri sul Mare, Italy, 2012. P.30.

5) **Шилова Л.А.**, Плюснина Е.Н., Москалев А.А. Роль генов репарации ДНК в формировании адаптивного ответа у *Drosophila melanogaster* // *Пятая Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике*. Звенигород, 2012. С. 69.

- 6) **Шилова Л.А.**, Сивергина Ю.С., Плюснина Е.Н. Влияние сверхэкспрессии генов репарации ДНК на стрессоустойчивость *Drosophila melanogaster* // II Всероссийская (XVII) молодежная научная конференция. Сыктывкар, 2013. С.154–155.
- 7) Plyusnina E.N., **Shilova L.A.**, Moskalev A.A. Stress-response genes in lifespan regulation and formation of long-term effects induced by ionizing irradiation in *Drosophila melanogaster* // The Journal of Nutrition, Health & Aging, 2013. V. 17. P. S169 – S170.
- 8) Plyusnina E.N., **Shilova L.A.**, Moskalev A.A. Effects of DNA excision repair gene activity on lifespan and radioresistance in *Drosophila melanogaster* // 40th Annual Meeting of the European radiation research society. Dublin Castle, Ireland, 2013. P. 19.
- 9) **Shilova L.A.**, Plyusnina E.N., Moskalev A.A. Effects of gamma-irradiation on age-dependent dynamics of stress-response gene expression in *Drosophila melanogaster* // 40th Annual Meeting of the European radiation research society. Dublin Castle, Ireland, 2013. P. 21.
- 10) Плюснина Е.Н., **Шилова Л.А.**, Москалев А.А. Влияние активности генов репарации ДНК на ПЖ и радиочувствительность *Drosophila melanogaster* // Материалы Международной конференции БИОРАД-2014. Сыктывкар, 2014. С. 95.
- 11) Механизмы радиационного гормезиса на модели дрозофилы / А.А. Москалев, М.В. Шапошников, Е.Н. Плюснина, **Л.А. Шилова** и др. // Материалы Международной конференции БИОРАД-2014. Сыктывкар, 2014. С. 64–68.
- 12) DNA repair in *Drosophila* aging and hormesis / E.N. Plyusnina, **L.A. Shilova**, M.V. Shaposhnikov et al. // Genetics of aging and longevity: Abstracts reports of 3rd international conference. Sochi, 2014. P. 48.
- 13) Investigation of resistance to acute γ -irradiation of *Drosophila melanogaster* individuals with DNA repair gene overexpression / **L.A. Shilova**, E.N. Plyusnina, N.V. Zemskaya et al. // Genetics of aging and longevity: Abstracts reports of 3rd international conference. Sochi, 2014. P. 97.
- 14) Влияние активности гена *D-GADD45* на продолжительность жизни и стрессоустойчивость особей *Drosophila melanogaster* / Е.Н. Плюснина, **Л.А. Шилова**, О.В. Шосталь и др. // 18-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых. Пушино, 2014. С. 270–271.
- 15) Investigation of resistance to acute γ -irradiation of *Drosophila melanogaster* individuals with different types of conditional overexpression of DNA repair genes / **L. Shilova**, N. Zemskaya, A. Moskalev // 41th Annual Meeting of the European radiation research society. Rhodes, Greece, 2014. P. 212.