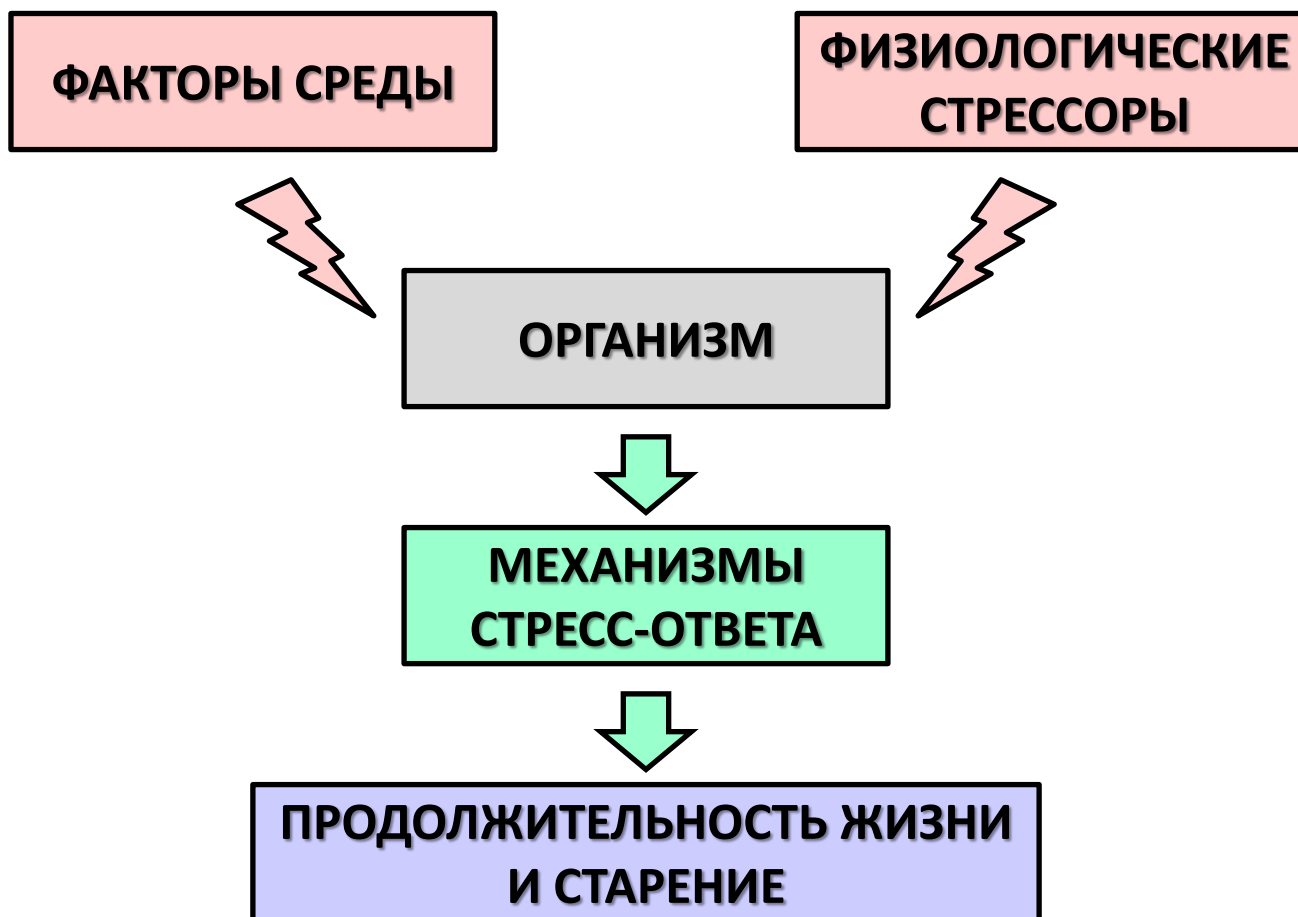


**Изучение молекулярно-генетических  
механизмов продолжительности  
жизни и старения на модели  
*Drosophila melanogaster***

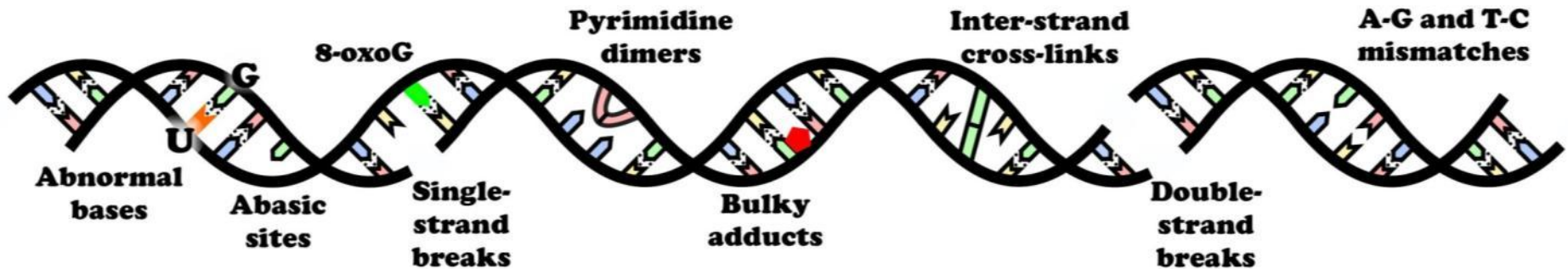
**Е.Н. Прошкина, М.В. Шапошников, Л.А. Шилова,  
Д.О. Перегудова, А.А. Данилов, Е.А. Лашманова,  
Е.В. Добровольская, Н.В. Земская, И.А. Соловьев, А.А. Москалев**

**Лаборатория молекулярной радиобиологии и геронтологии отдела радиозологии  
Института биологии Коми НЦ УрО РАН**

**Старение** – это закономерный разрушительный процесс, при котором происходит снижение адаптационных возможностей организма и увеличение вероятности его смерти [БЭС, 1995].

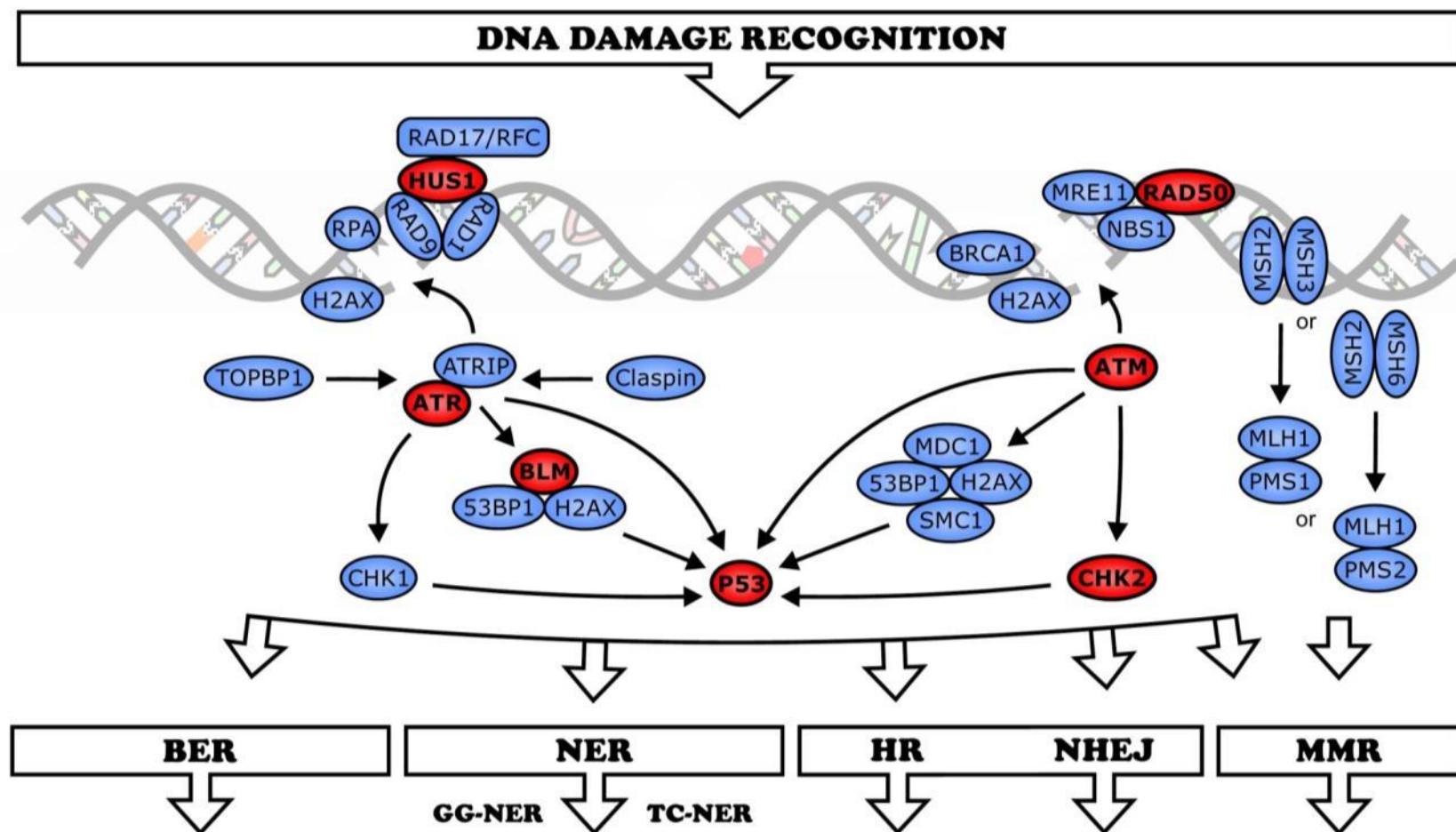


# Типы повреждений ДНК

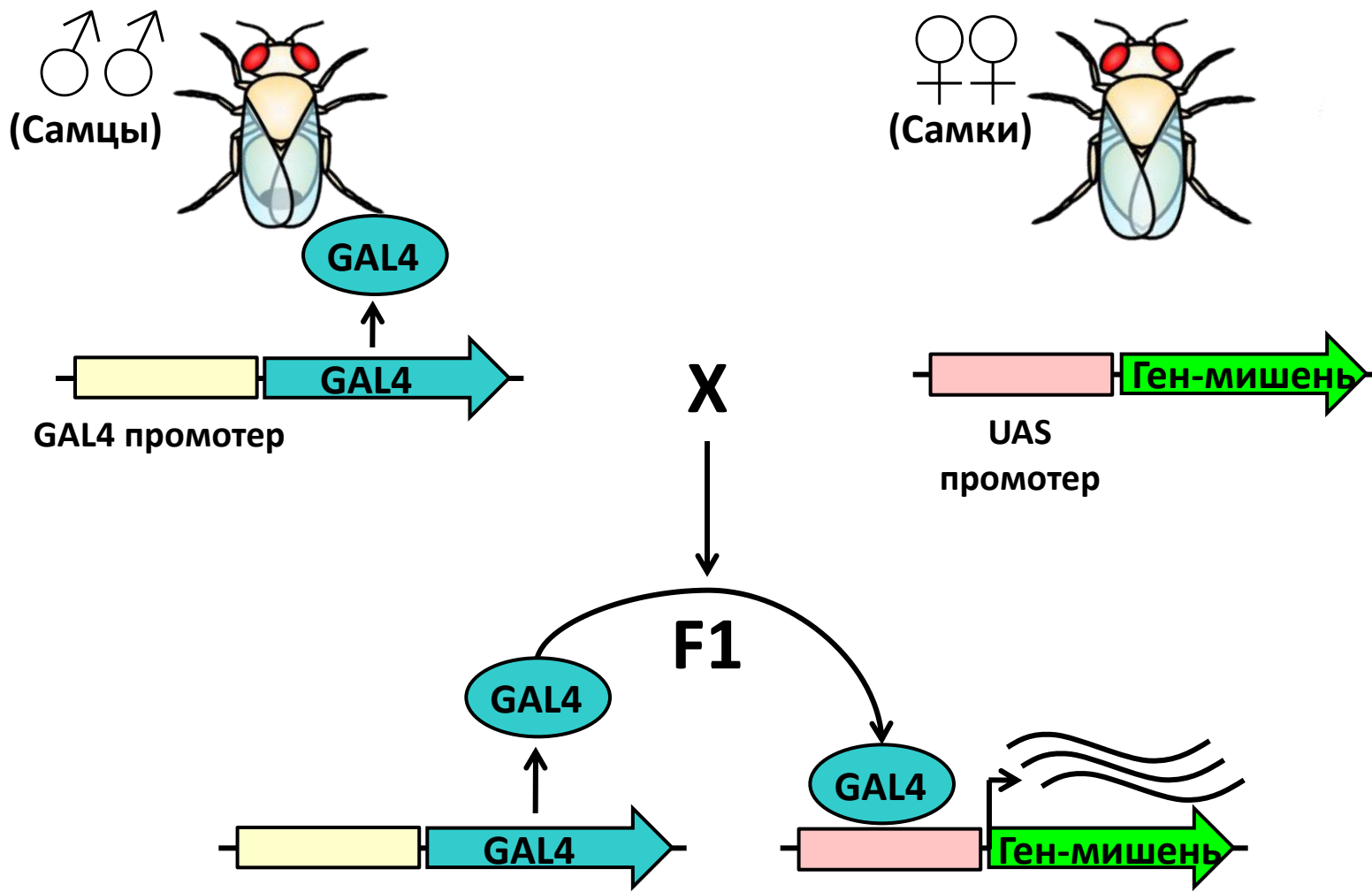


- Замена и модификация оснований ДНК
- Нарушение целостности ДНК
  - Апуриновые/апиримидиновые (АП) сайты
  - Однонитевые разрывы ДНК
  - Двунитевые разрывы ДНК
- Перекрестные сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок
- Мисмэтчи

# Распознавание и репарация повреждений ДНК

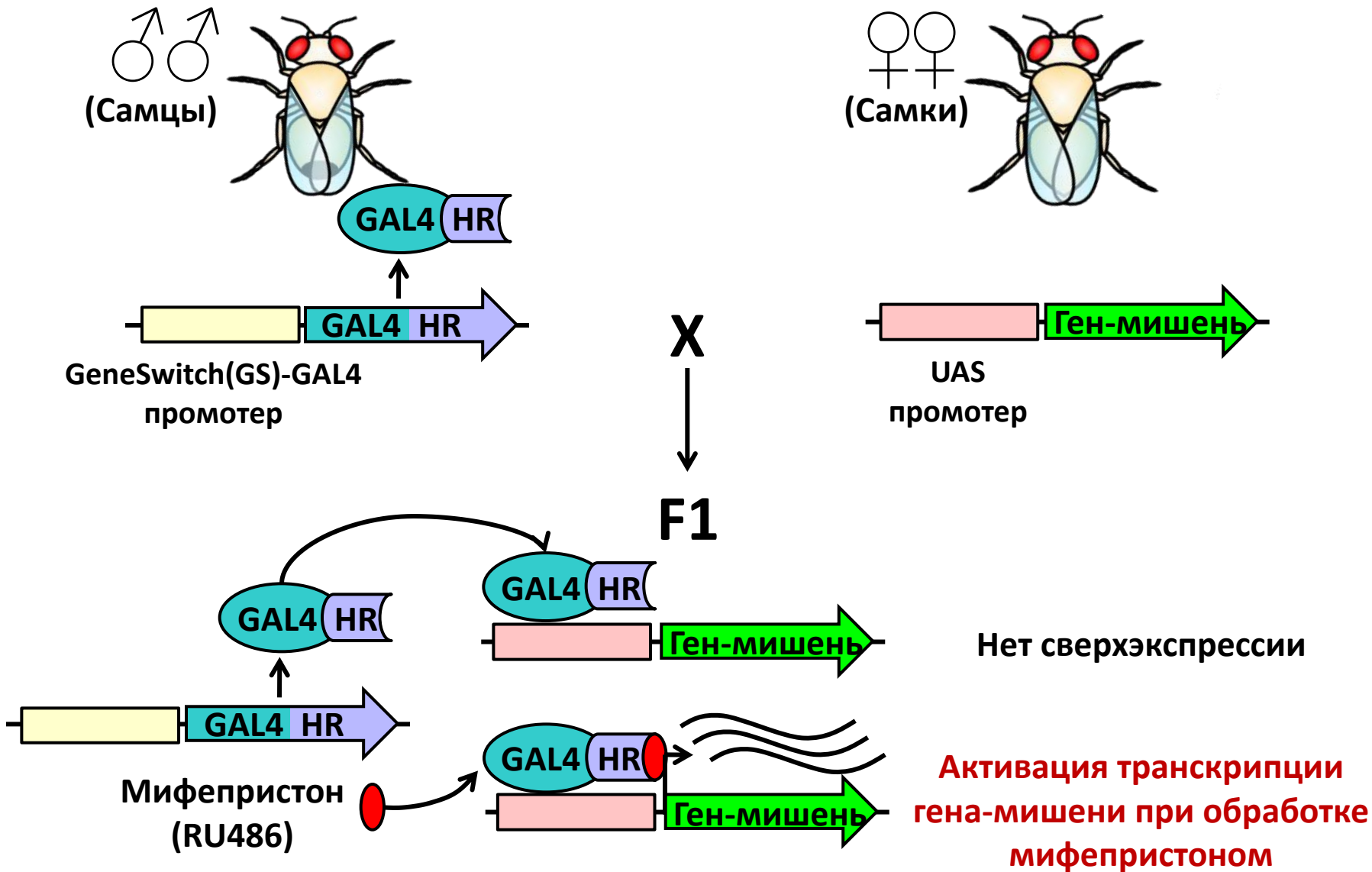


# Конститутивная сверхэкспрессия генов



**GAL4 активирует транскрипцию гена-мишень под контролем промотера UAS**

# Кондиционная (мифепристон-индуцибельная) сверхэкспрессия генов





# Повсеместная и тканеспецифичная сверхэкспрессия

**Повсеместная  
сверхэкспрессия**

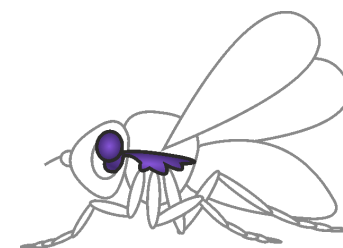
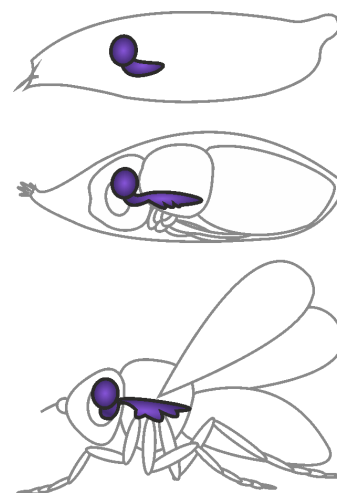
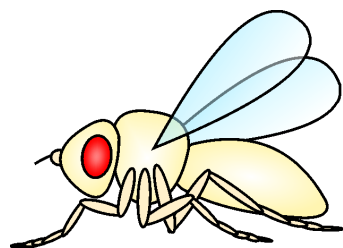
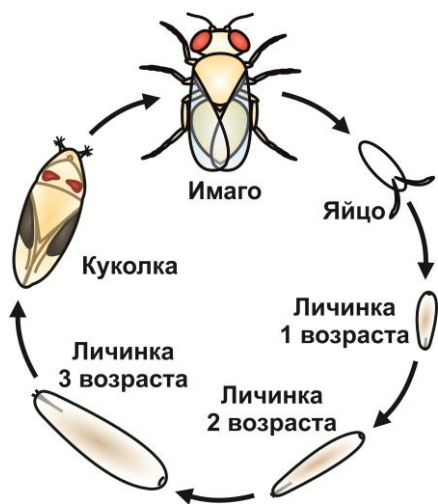
**Сверхэкспрессия в  
нервной системе**

**da-GAL4**  
конститутивная,  
в течение всей  
жизни

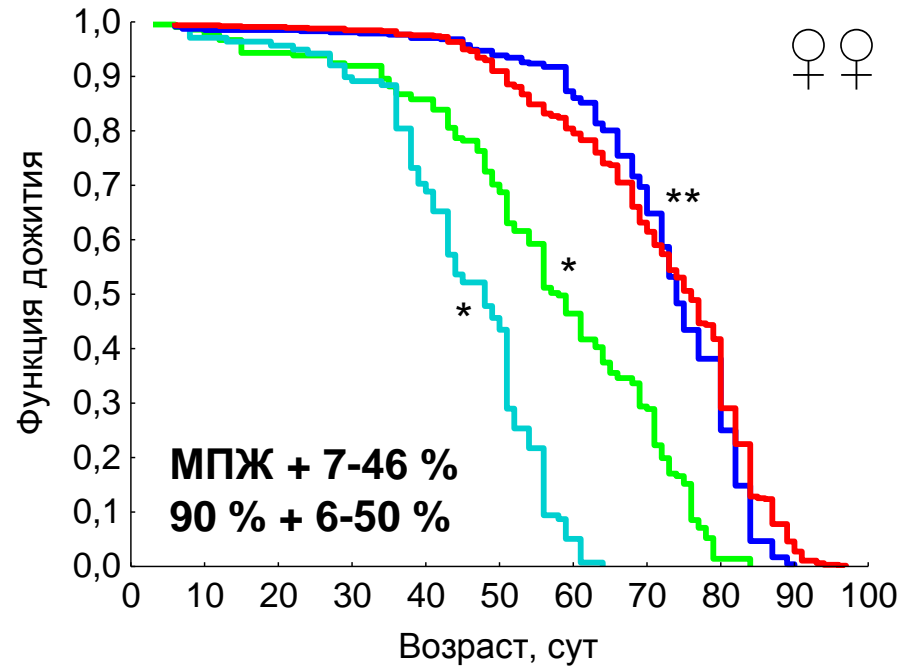
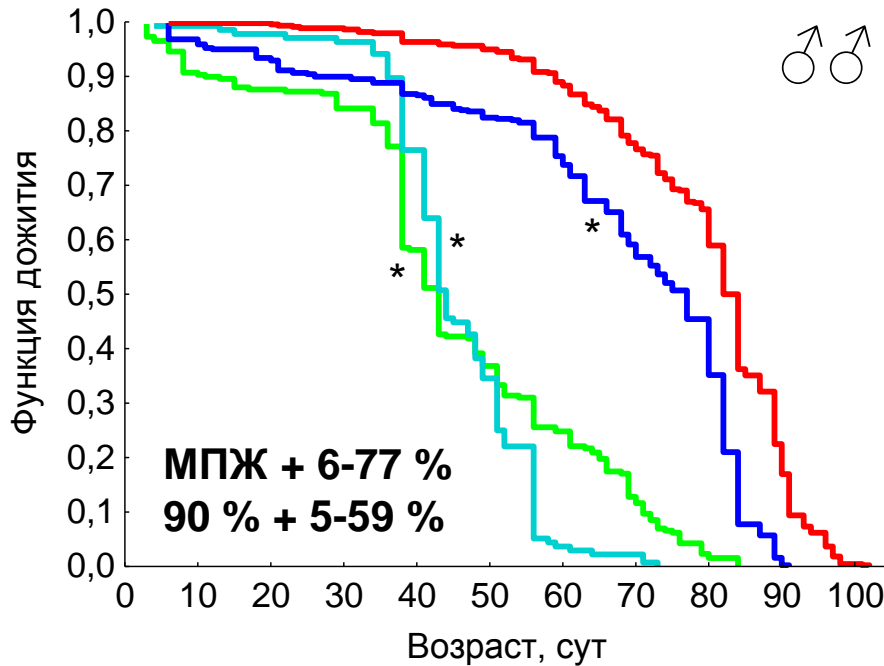
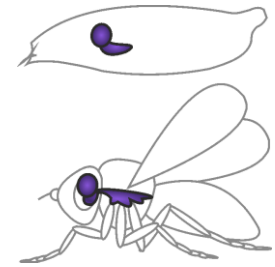
**Act-5C-GS**  
кондиционная,  
на стадии имаго

**GAL4-1407**  
конститутивная,  
в течение всей  
жизни

**ELAV-GS**  
кондиционная,  
на стадии имаго



# Влияние конститутивной сверхэкспрессии гена *D-GADD45* в нервной системе дрозофил на продолжительность жизни



— *UAS-D-GADD45*   
 — *GAL4-1407*   
 — *Canton-S/GAL4-1407*  
— *UAS-D-GADD45/GAL4-1407* (сверхэкспрессия *D-GADD45*)

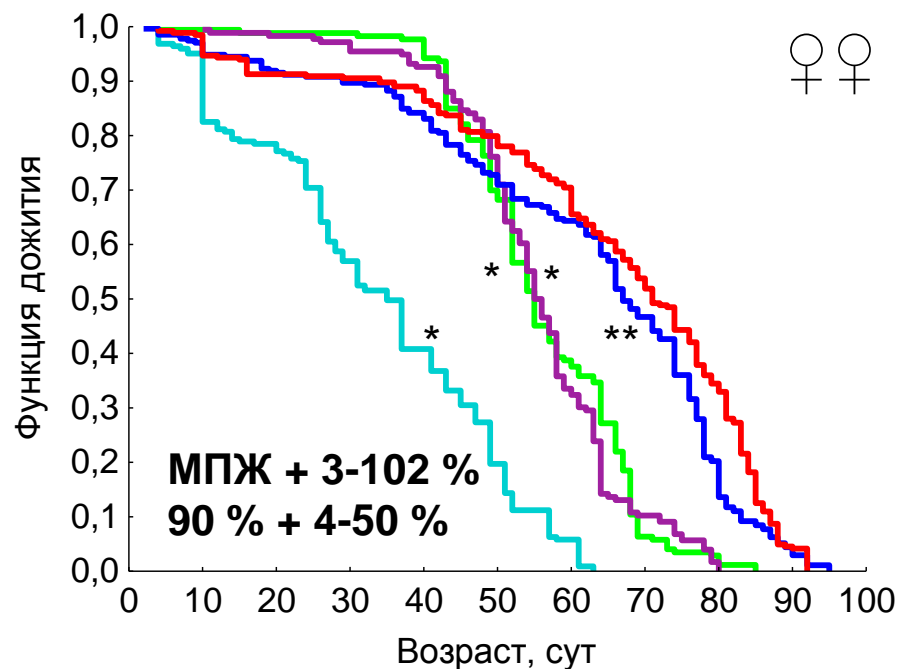
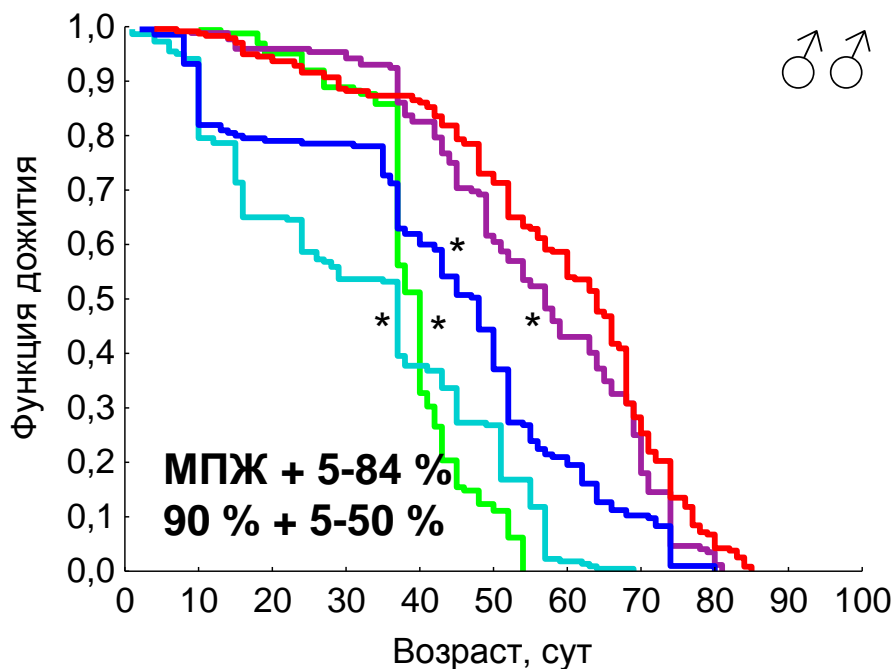
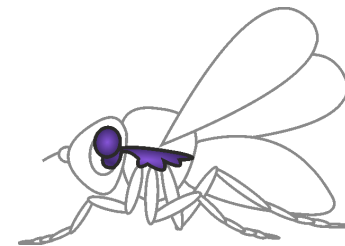
\* -  $p < 0.001$ , \*\* -  $p < 0.05$  по критерию Колмогорова-Смирнова

МПЖ - медианная продолжительность жизни

90 % - возраст 90 % смертности



# Влияние кондиционной сверхэкспрессии гена *D-GADD45* в нервной системе дрозофил на продолжительность жизни



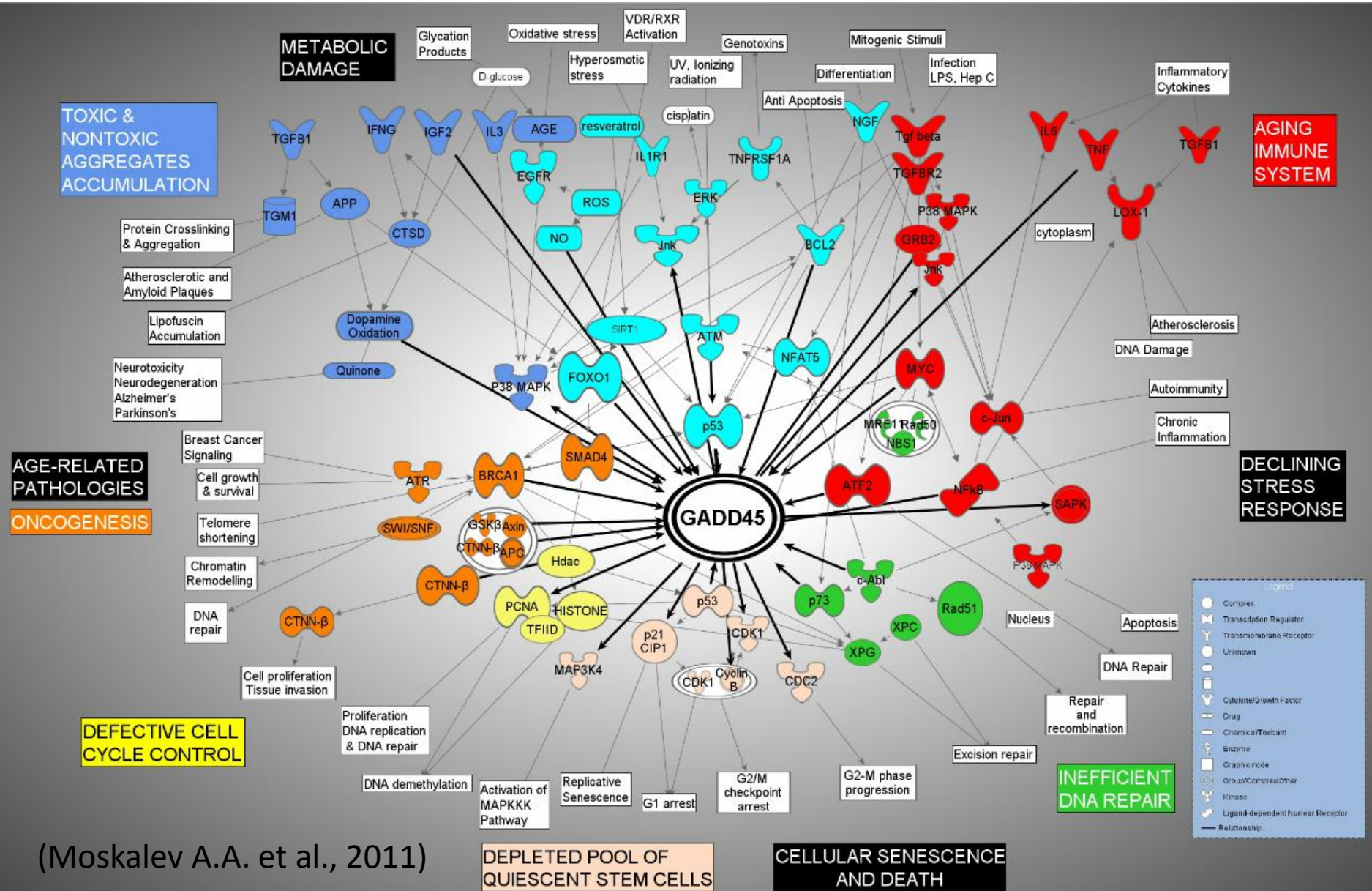
— *UAS-D-GADD45*   
 — *ELAV*   
 — *Canton-S/ELAV*   
 — *UAS-D-GADD45/ELAV*  
— *UAS-D-GADD45/ELAV* + мифепристон (сверхэкспрессия *D-GADD45*)

\* -  $p < 0.001$ , \*\* -  $p < 0.05$  по критерию Колмогорова-Смирнова

МПЖ - медианная продолжительность жизни

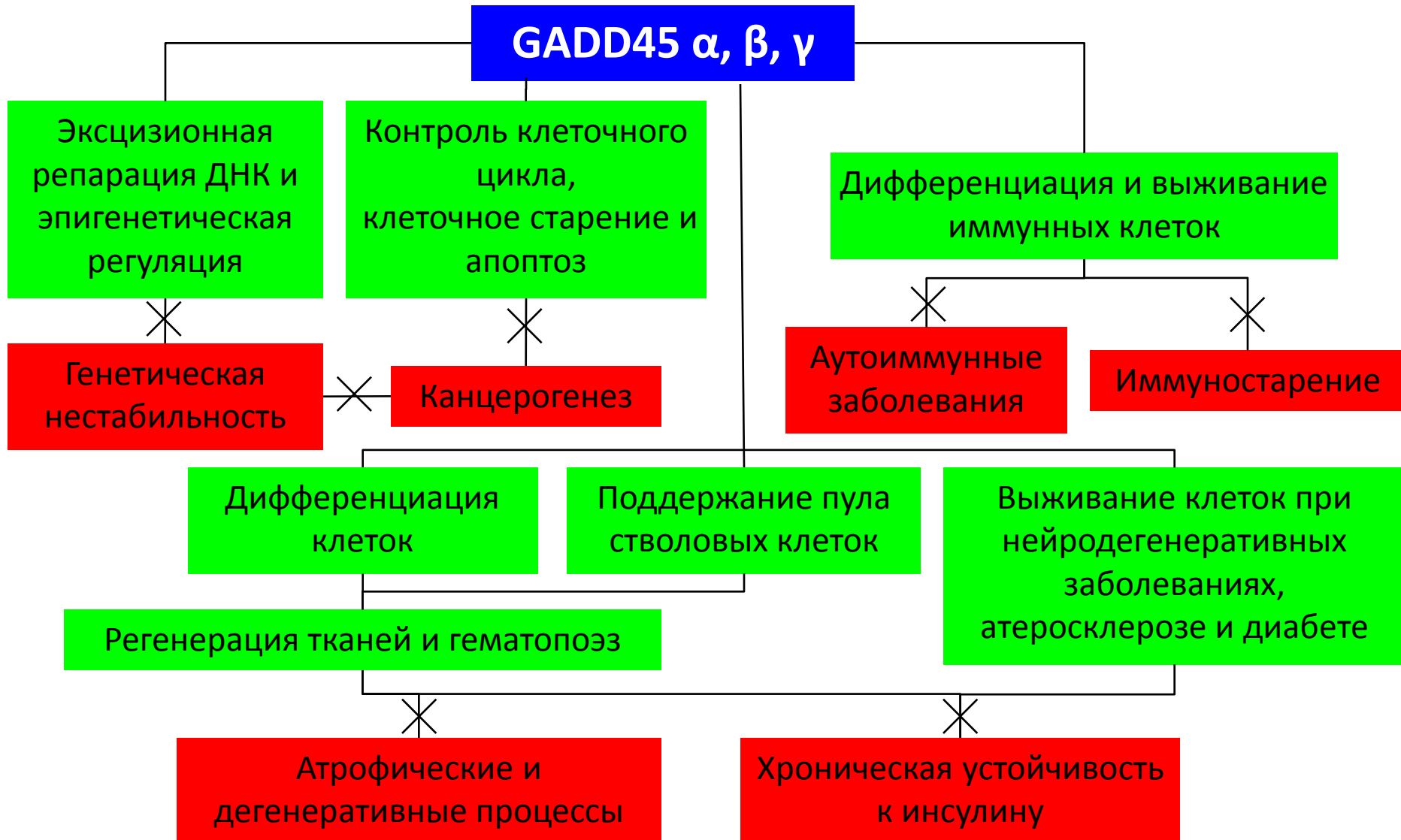
90 % - возраст 90 % смертности

# Участие GADD45 в генных сетях, связанных со старением (с помощью Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems))



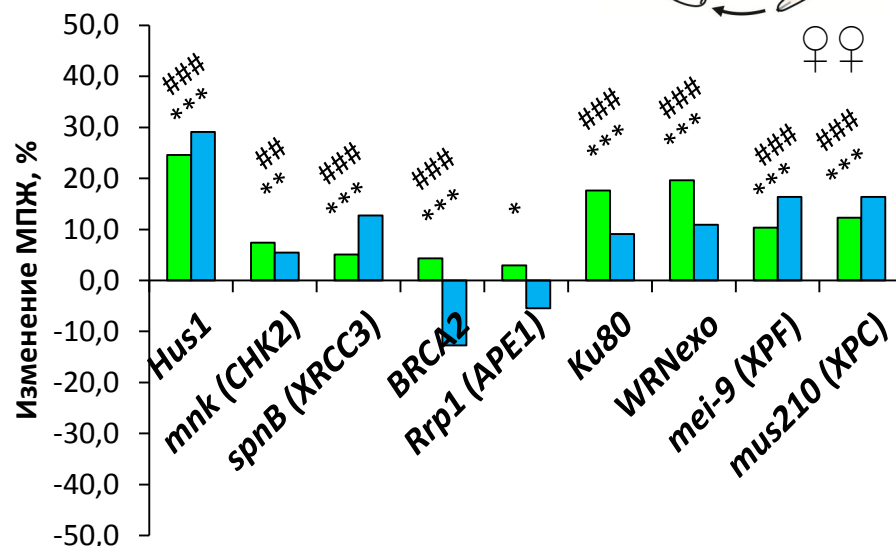
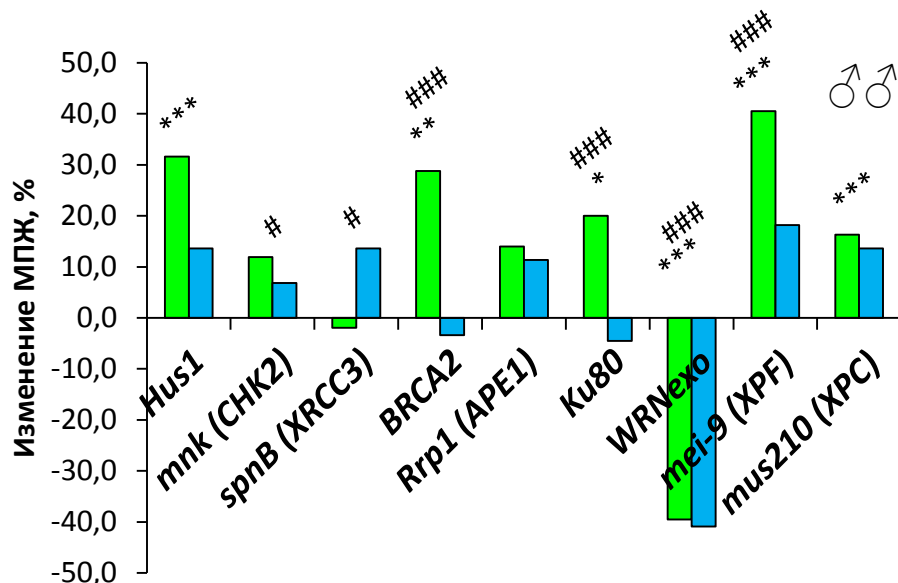
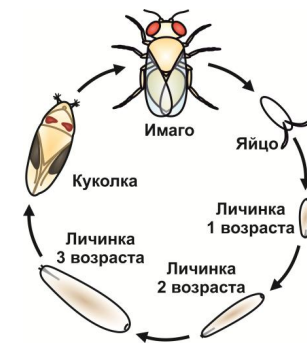
(Moskalev A.A. et al., 2011)

# Геропротекторная активность белков семейства GADD45



(Moskalev A.A. et al., 2011)

# Влияние конститутивной повсеместной сверхэкспрессии генов распознавания и репарации повреждений ДНК на продолжительность жизни



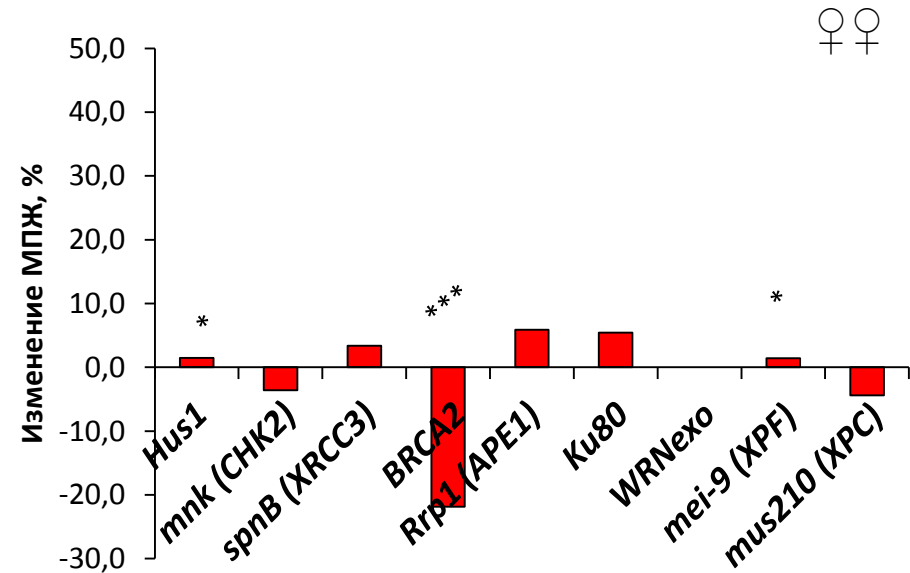
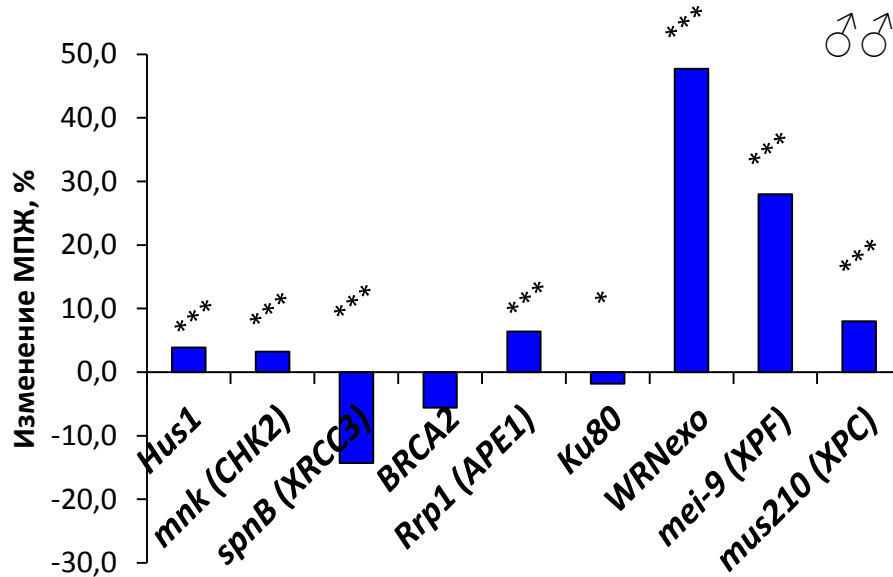
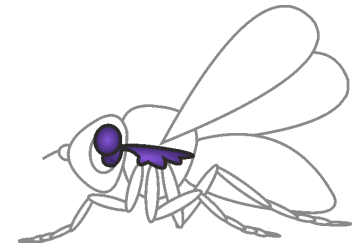
Сравнение значений медианной продолжительности жизни (МПЖ) у мух со сверхэкспрессией генов репарации ДНК (*da-GAL4>UAS*) и родительских линий ■ UAS и ■ da-GAL4.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , критерий Мантеля-Кокса (для различий между мухами со сверхэкспрессией генов репарации ДНК *da-GAL4>UAS* и линиями UAS)

## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , критерий Мантеля-Кокса (для различий между мухами со сверхэкспрессией генов репарации ДНК *da-GAL4>UAS* и линиями da-GAL4)



# Влияние кондиционной сверхэкспрессии генов распознавания и репарации повреждений ДНК в нервной системе на продолжительность жизни



Сравнение значений медианной продолжительности жизни (МПЖ) у мух с мифепристон-индуцибельной сверхэкспрессией генов репарации ДНК и без сверхэкспрессии.

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , критерий Мантеля-Кокса

# Эффекты применения фармакологических препаратов и биологически активных веществ

**Аспирин**



**Фукоксантин**



**β-Каротин**



**Ибупрофен**



**Ксантин**



**Кверцетин**

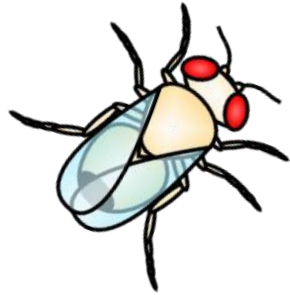


**Эпикатехин**

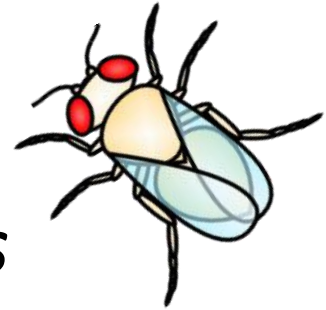




# Схема эксперимента



Муши линии дикого типа *Canton-S*



Без обработки  
(контроль)

**β-каротин**

(0.3, 0.5, 1.0 мкМ)

**Фукоксантин**

(0.3, 0.5, 1.0 мкМ)

**Ибупрофен**

(0.3, 0.5, 1.0 мкМ)

**Кверцетин**

(0.3, 0.5, 1.0 мкМ)

**Эпикатехин**

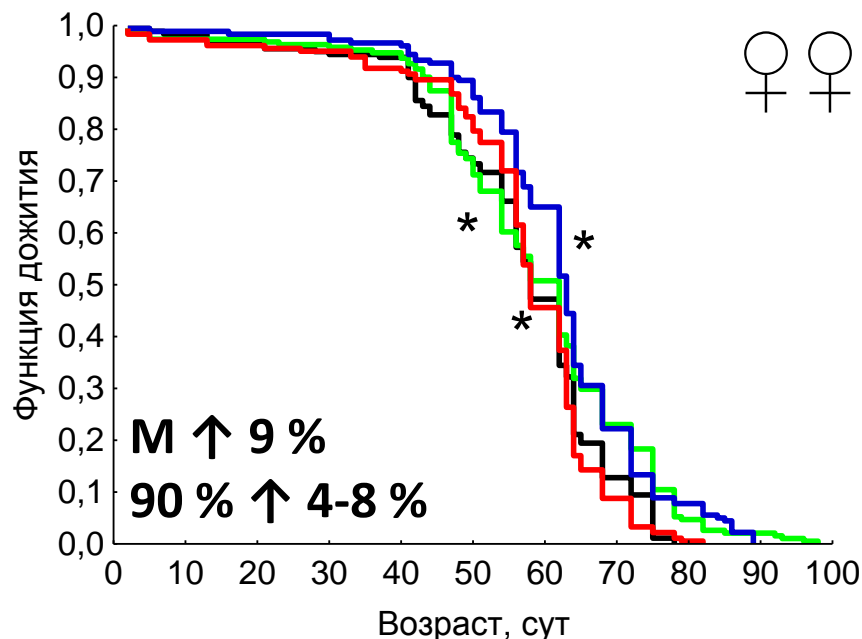
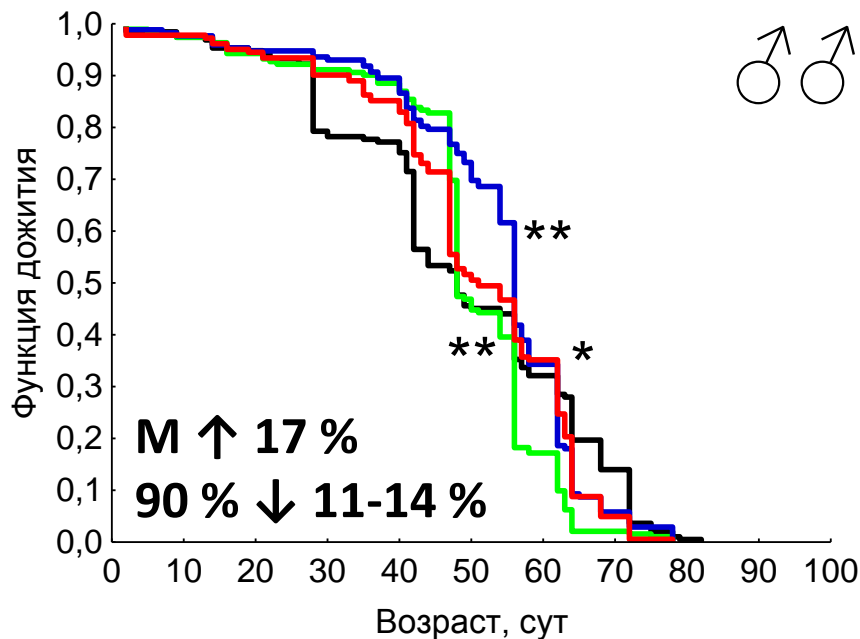
(0.3, 0.5, 1.0 мкМ)

**Ксантин**

(0.3, 0.5, 1.0 мкМ)

25°C, 12-часовой режим освещения,  
агарно-дрожжевая питательная среда

# Влияние ибупрофена на продолжительность жизни дрозифил



— Контроль — 0.3 мкМ — 0.5 мкМ — 1.0 мкМ

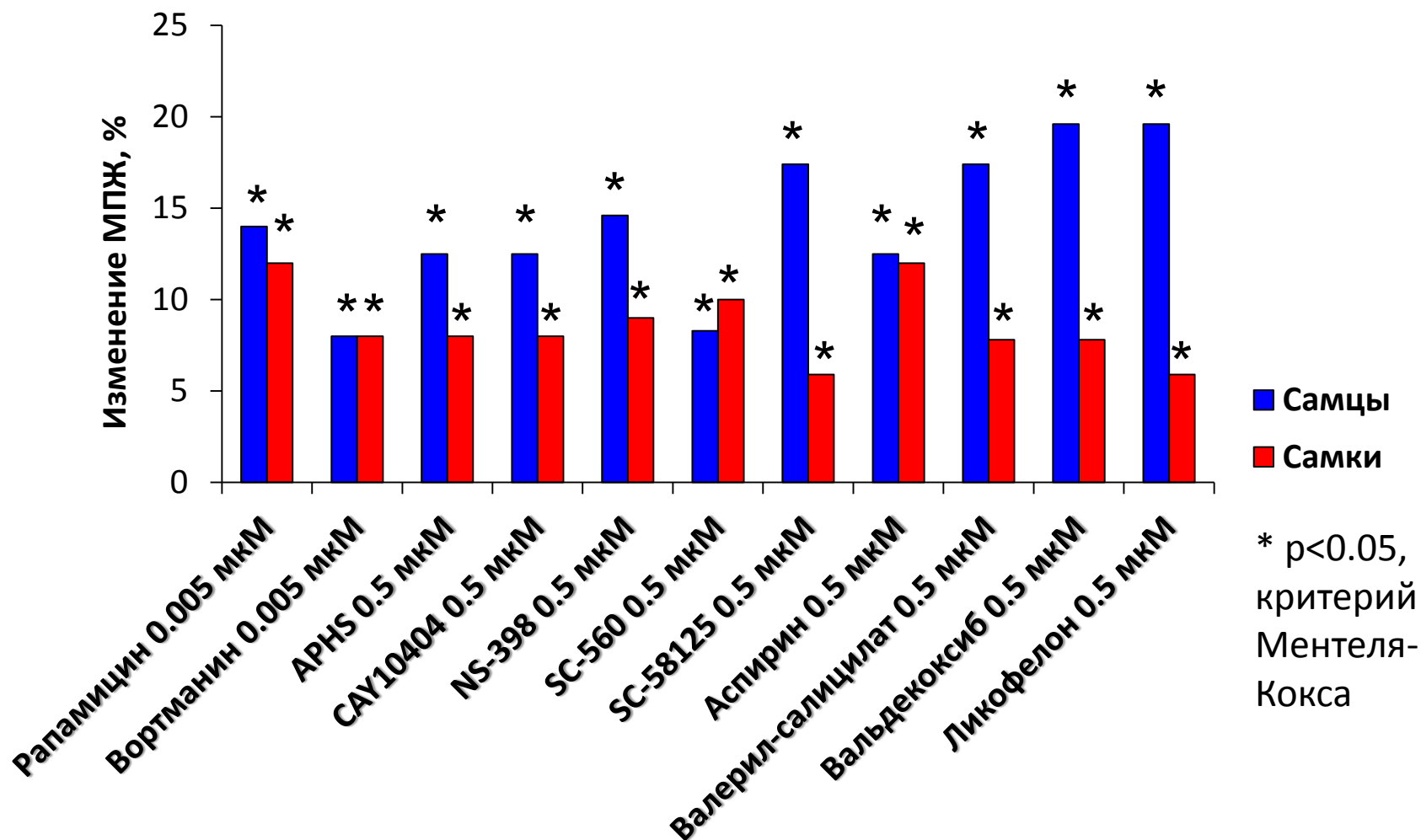
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , критерий Колмгорова-Смирнова

**M** – изменение медианной продолжительности жизни,

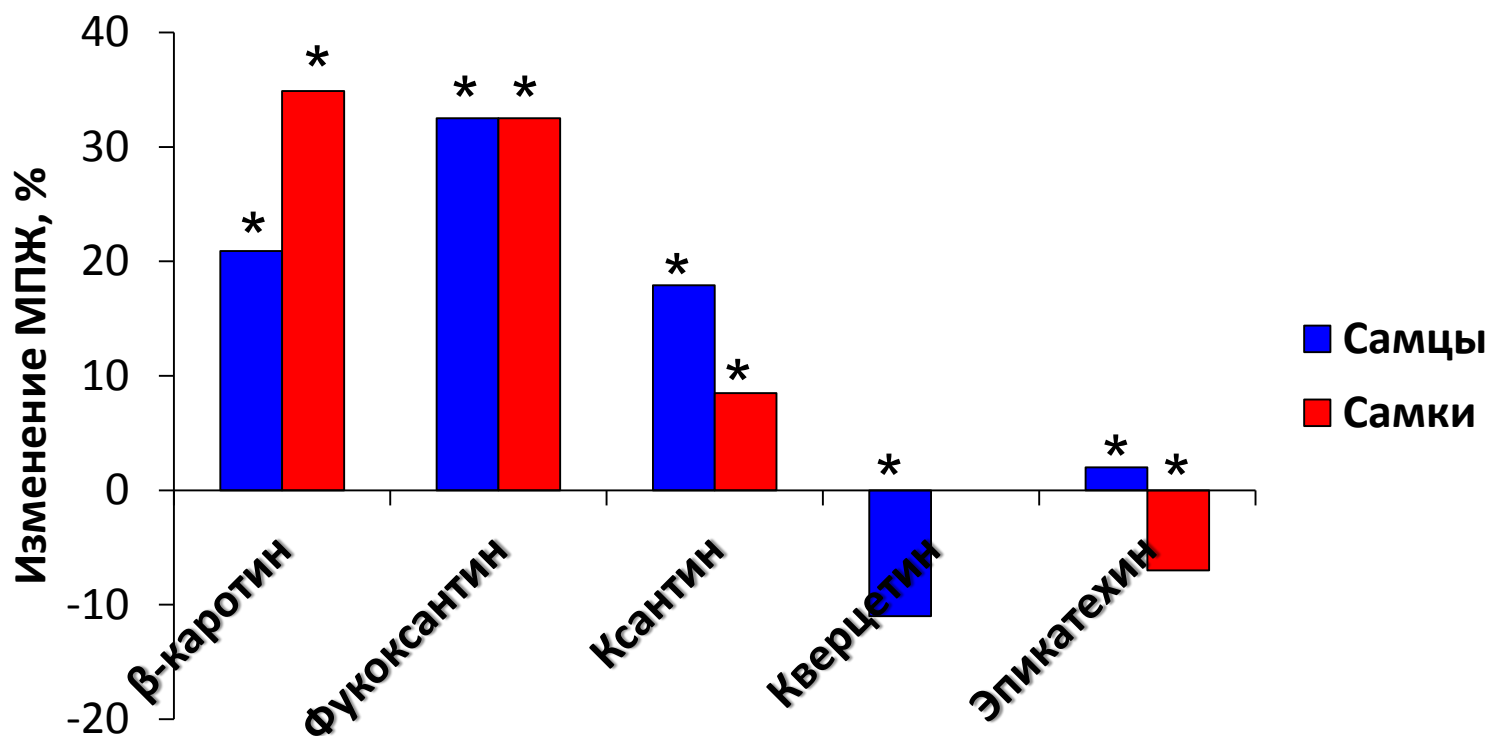
**90 %** - изменение возраста 90 % смертности

He C., Tsuchiyama S.K., Nguyen Q.T., Plyusnina E.N., Terrill S.R., Sahibzada S., Patel B., Faulkner A.R., Shaposhnikov M.V., Tian R., Tsuchiya M., Kaeberlein M., Moskalev A.A., Kennedy B.K., Polymenis M. Enhanced longevity by ibuprofen, conserved in multiple species, occurs in yeast through inhibition of tryptophan import // PLoS Genetics. 2014. Vol. 10. № 12. P. e1004860.

# Влияние фармакологических препаратов на продолжительность жизни дрозифил

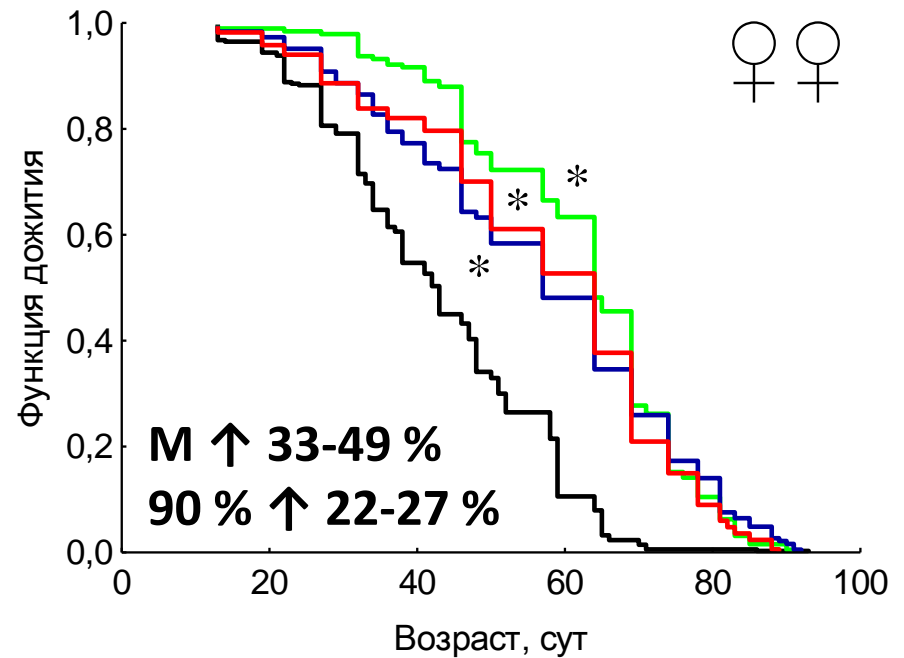
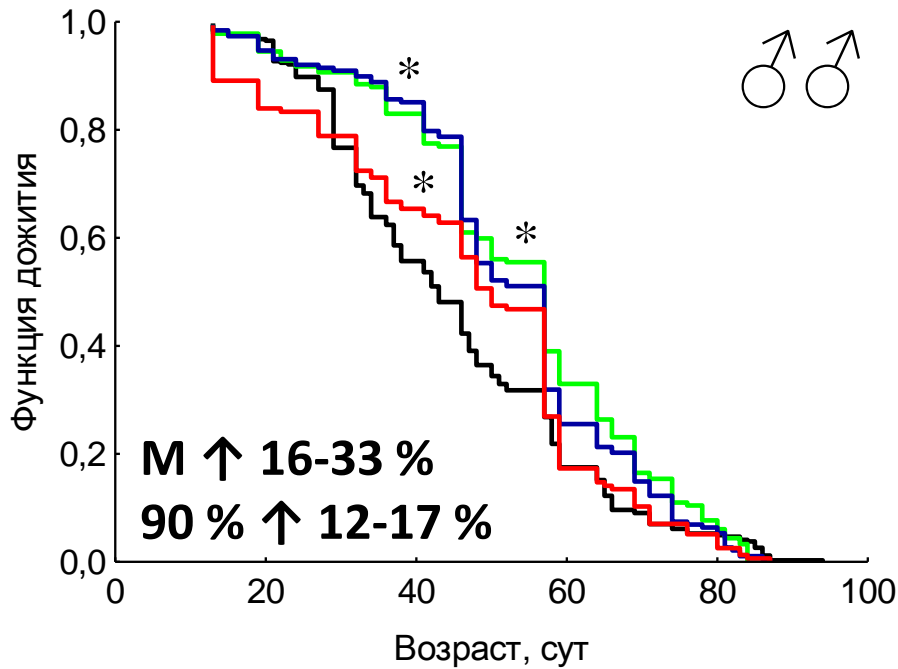


# Влияние биологически активных веществ растительного происхождения (0.5 мкМ) на продолжительность жизни дрозophil



\*  $p < 0.05$ , критерий Менделя-Кокса

# Влияние фукоксантина на продолжительность жизни дрозophil



— Контроль — 0.3 мкМ — 0.5 мкМ — 1.0 мкМ

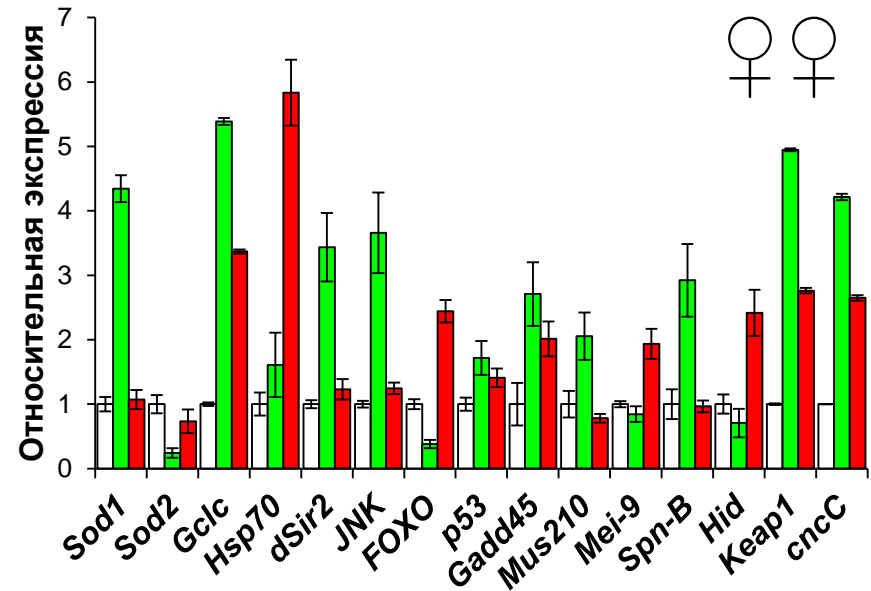
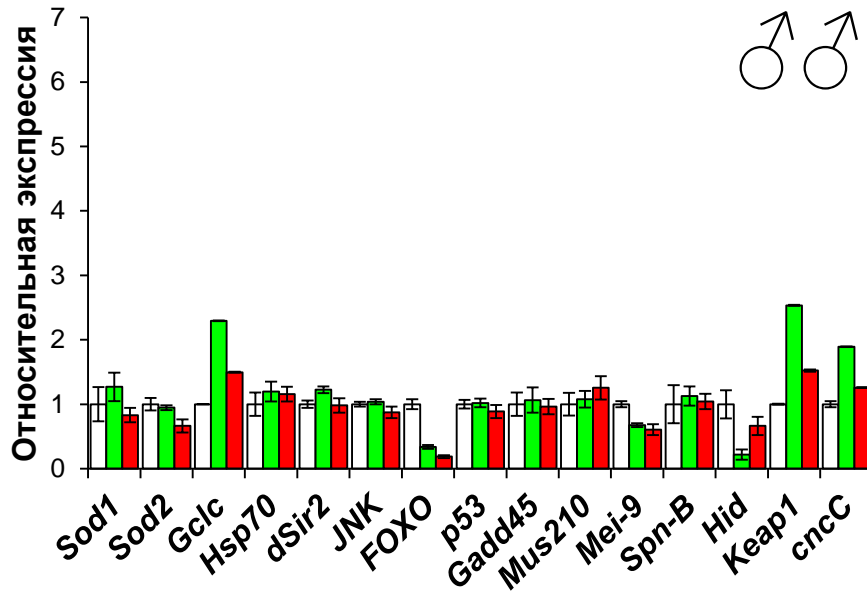
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , критерий Колмгорова-Смирнова

**M** – изменение медианной продолжительности жизни,

**90 %** - изменение возраста 90 % смертности

Lashmanova E., Proshkina E., Zhikrivetskaya S., Shevchenko O., Marusich E., Leonov S., Melerzanov A., Zhavoronkov A., Moskalev A. Fucoxanthin increases lifespan of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* // Pharmacological Research. 2015. Vol. 100. P. 228–241.

# Влияние фукоксантина на экспрессию генов стресс-ответа

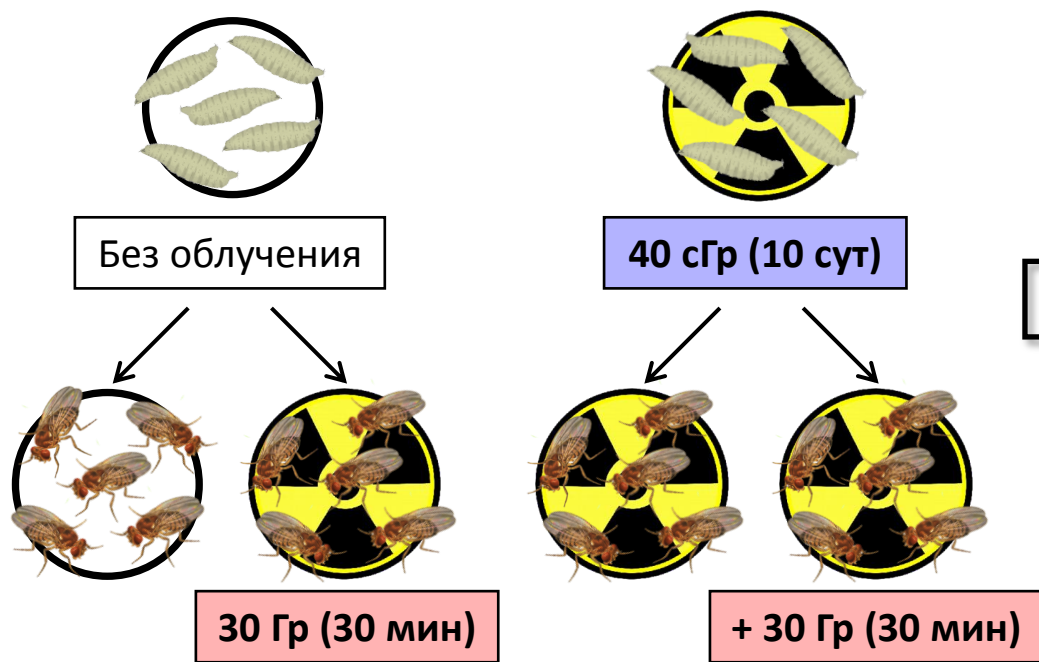


□ Контроль    ■ 0.3 мкМ    ■ 1.0 мкМ

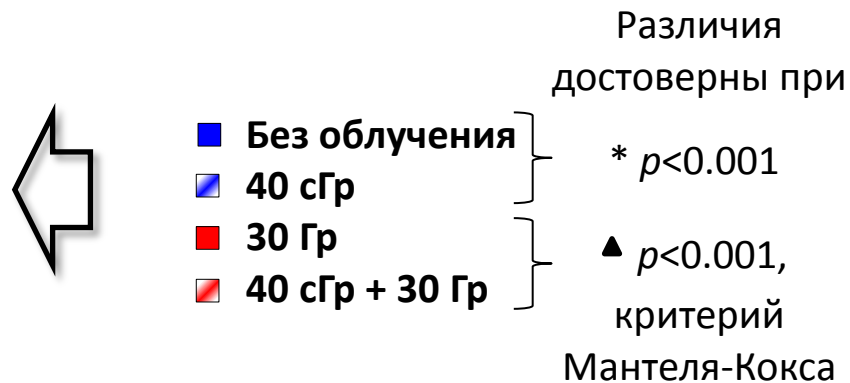
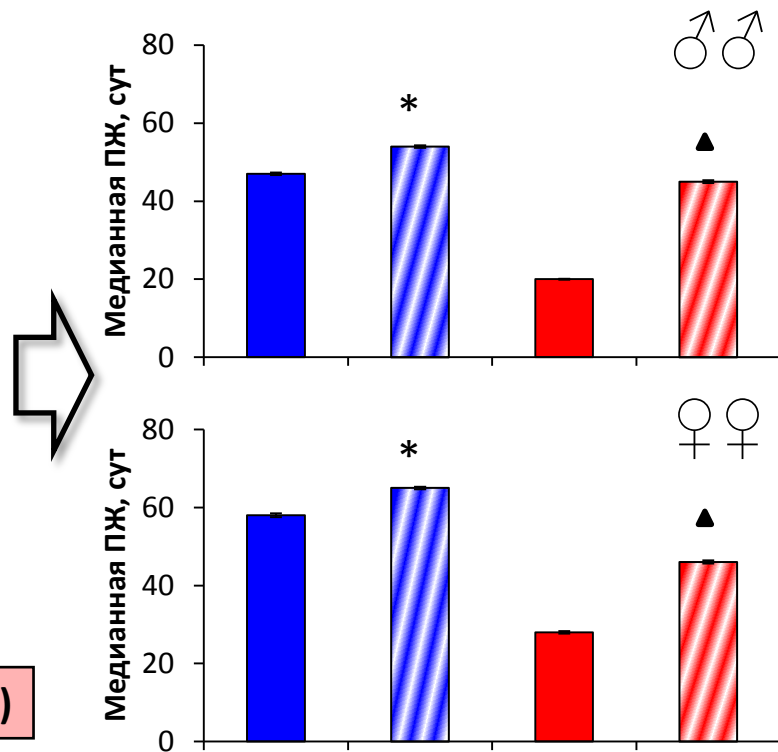
Lashmanova E., Proshkina E., Zhikrivetskaya S., Shevchenko O., Marusich E., Leonov S., Melerzanov A., Zhavoronkov A., Moskalev A. Fucoxanthin increases lifespan of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* // Pharmacological Research. 2015. Vol. 100. P. 228–241.



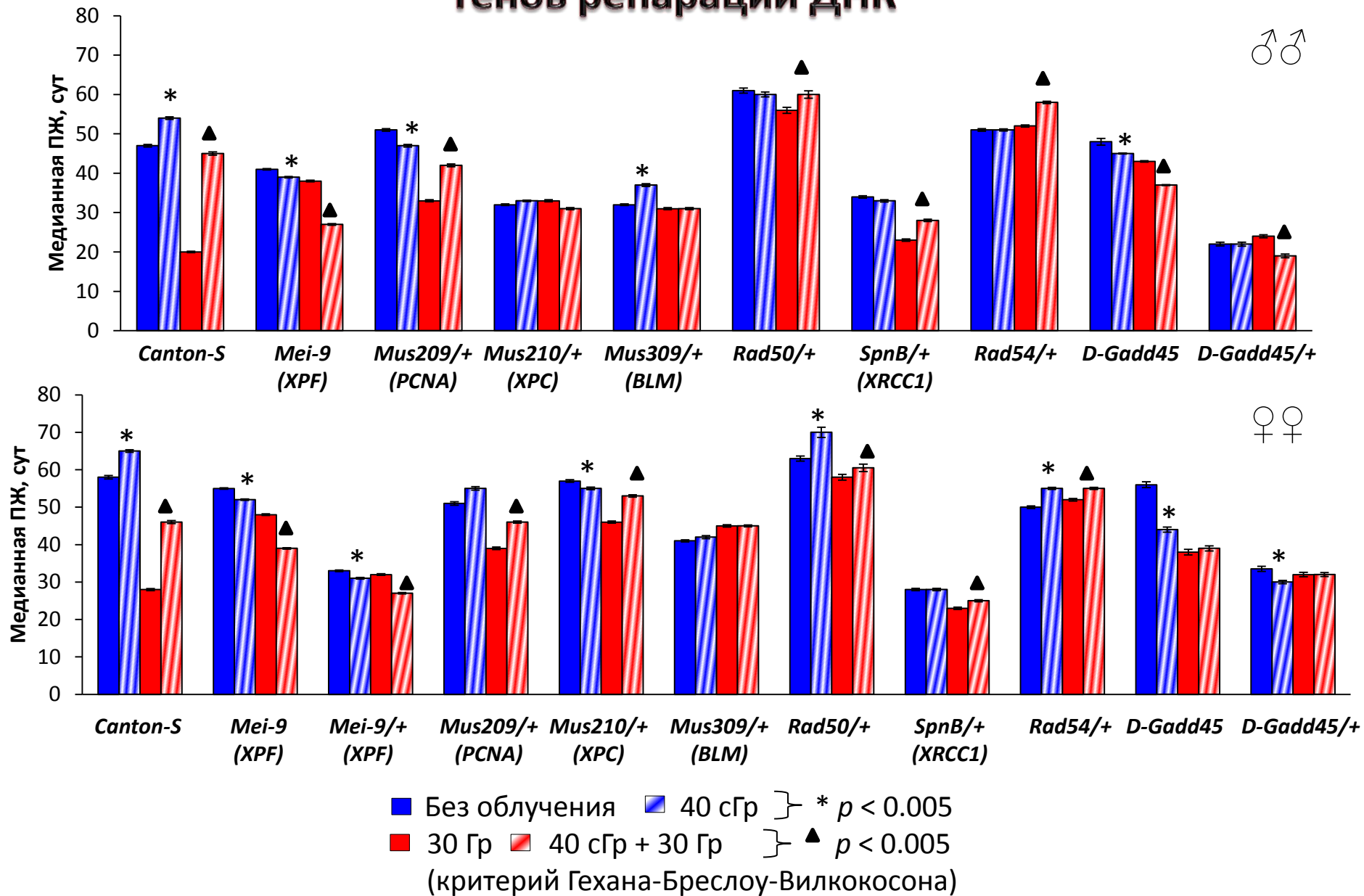
# Изучение молекулярно-генетических механизмов реакции организма на ионизирующее излучение в малых дозах



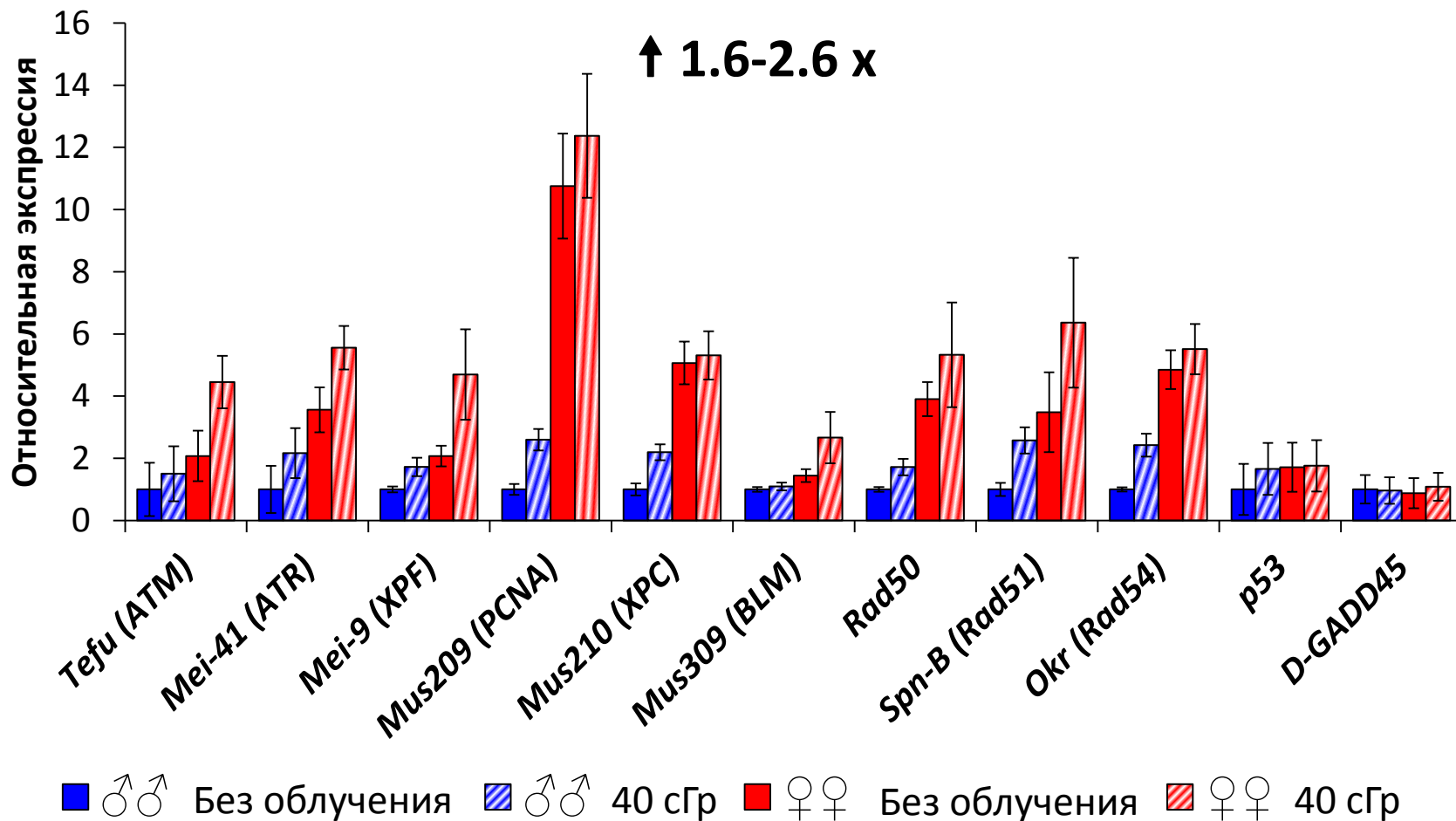
Интенсивное  $\gamma$ -облучение снижает длительность жизни дрозофил. Однако излучение в малых дозах может оказывать положительное влияние – продлевать жизнь (**эффект гормезиса**) и повышать устойчивость к последующим вредным воздействиям (**адаптивный ответ**).



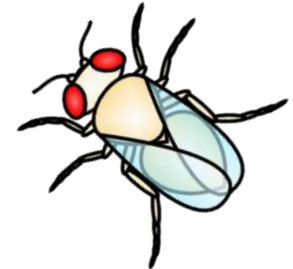
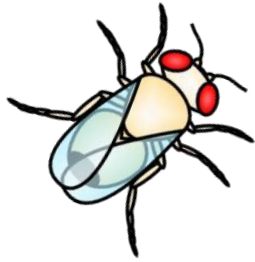
# Изменение радиоустойчивости линий дрозофил с мутациями генов репарации ДНК



# Изменение экспрессии генов стресс-ответа после хронического воздействия $\gamma$ -излучения в малой дозе у дрозофил линии дикого типа *Canton-S*

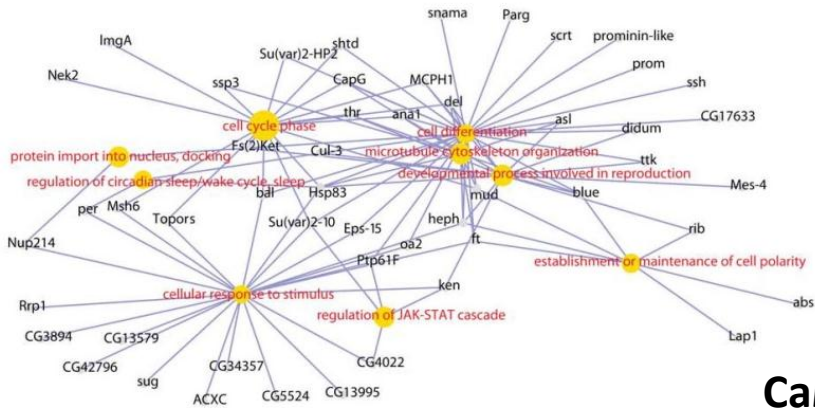


# Схема эксперимента

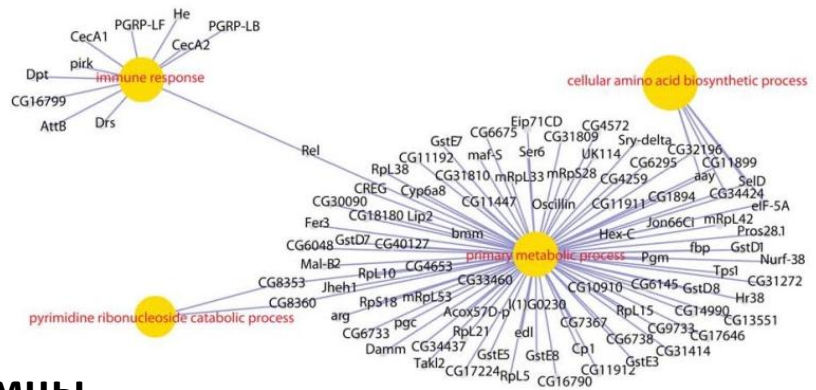


# Построение генных сетей с использованием анализа Gene Ontology для дрозофил, подвергшихся действию $\gamma$ -излучения

## Увеличение экспрессии

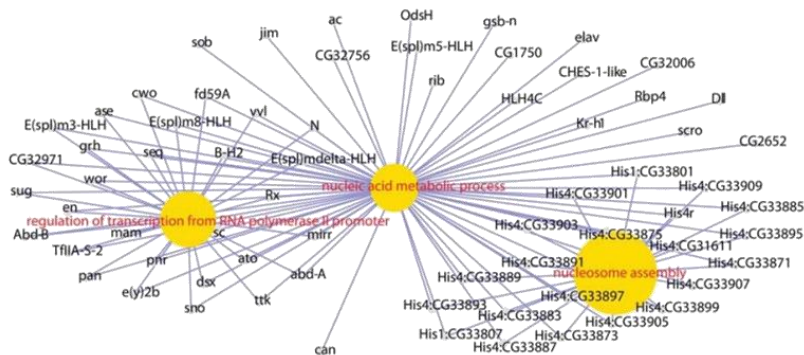


## Снижение экспрессии

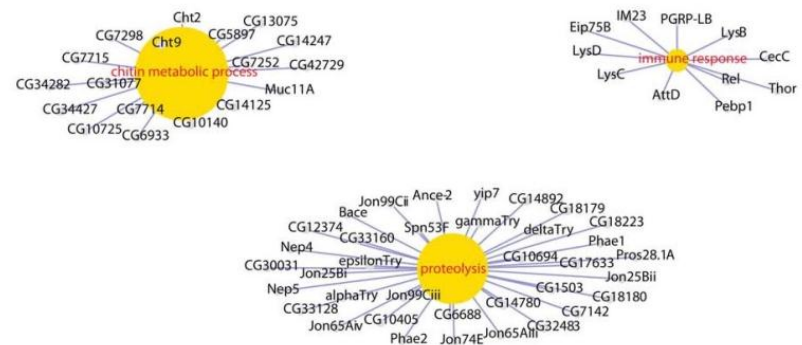


## Самцы

## Увеличение экспрессии



## Снижение экспрессии



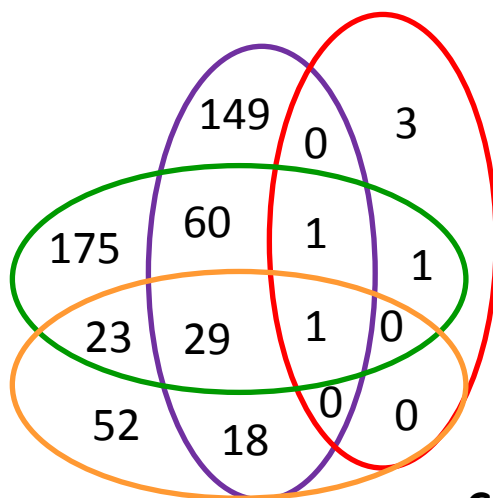
## Самки



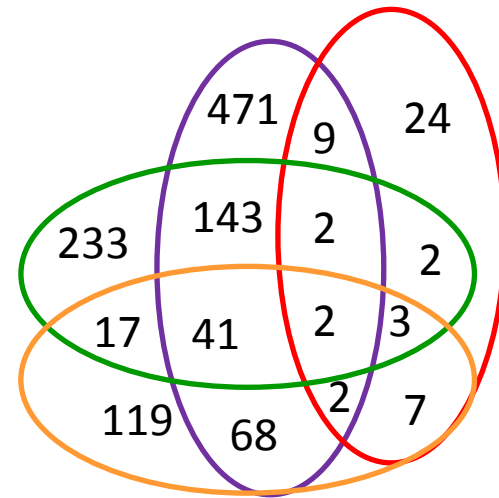
**Выявление генов,  
специфично  
изменяющих  
активность, и генов,  
реагирующих на  
несколько  
воздействий.**

- Формальдегид
- Диоксин
- Тoluол
- Облучение

Увеличение экспрессии

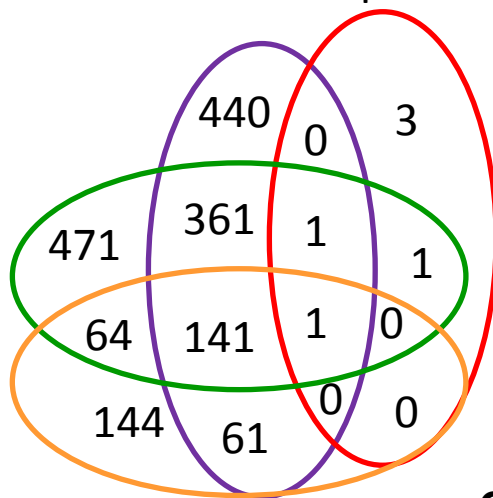


Снижение экспрессии

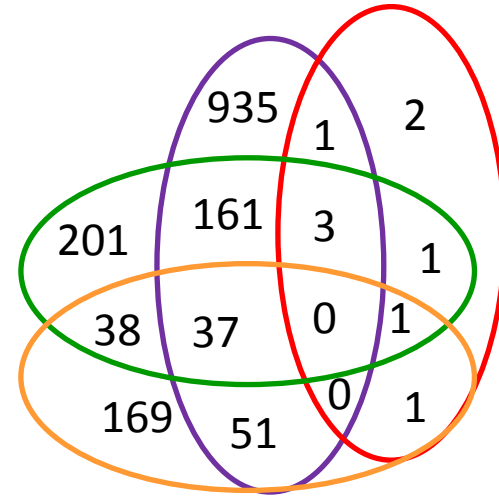


**Самцы**

Увеличение экспрессии



Снижение экспрессии



**Самки**



## Уникальные гены, активирующиеся в ответ на действие $\gamma$ -излучения

Ген	Функция	Относительная экспрессия (ОТ-ПЦР)	
		Самцы	Самки
<b><i>Sugarbabe</i></b>	Кодирует белок, который подавляет транскрипцию ряда генов липаз и участвует в катаболизме липидов	<b>2.4</b> (1.9-3.1)	<b>1.9</b> (1.7-2.1)
<b><i>Tramtrack</i></b>	Кодирует белок, который подавляет сигнальный путь Notch	<b>1.2</b> (1.0-1.4)	<b>2.0</b> (1.9-2.1)

*Moskalev A., Shaposhnikov M., Plyusnina E., Plyusnin S., Shostal O., Aliper A., Zhavoronkov A. Exhaustive data mining comparison of the effects of low doses of ionizing radiation, formaldehyde and dioxins // BMC Genomics. 2014. Vol. 15. Suppl. 12. P. S5.*

*Moskalev A., Shaposhnikov M., Snezhkina A., Kogan V., Plyusnina E., Peregudova D., Melnikova N., Uroshlev L., Mylnikov S., Dmitriev A., Plusnin S., Fedichev P., Kudryavtseva A. Mining gene expression data for pollutants (dioxin, toluene, formaldehyde) and low dose of gamma-irradiation // PLoS One. 2014. Vol. 9. № 1. P. e86051.*

*Moskalev A., Zhikrivetskaya S., Krasnov G., Shaposhnikov M., Proshkina E., Borisoglebsky D., Danilov A., Peregudova D., Sharapova I., Dobrovolskaya E., Solovev I., Zemskaya N., Shilova L., Snezhkina A., Kudryavtseva A. A comparison of the transcriptome of *Drosophila melanogaster* in response to entomopathogenic fungus, ionizing radiation, starvation and cold shock // BMC Genomics. 2015. Vol. 16. Suppl 13. P. S8.*

# Заключение

- Изучена роль репарации ДНК в регуляции продолжительности жизни организма. Выявлен геропротекторный эффект повышенной активности генов, которые участвуют в различных механизмах обеспечения целостности ДНК.
- Определено ингибирующее действие различных фармакологических препаратов и биологически активных веществ растительного происхождения на связанные со старением сигнальные пути. Показано, что благоприятное влияние данные вещества оказывают, в первую очередь, через стимуляцию механизмов антиоксидантной защиты, обнаружения и репарации повреждений ДНК и белков.
- Изучены изменения генной активности при действии различных повреждающих факторов, оценен вклад генов ответа на повреждение ДНК в формирование реакций организма на малые дозы ионизирующих излучений.

## Заключение

Всестороннее изучение эффектов активации генов стресс-ответа на продолжительность жизни и устойчивость к повреждающим воздействиям различной природы позволит выявить ряд дополнительных потенциальных мишеней для воздействия на скорость старения. Дальнейшая работа в данном направлении открывает перспективы для разработки препаратов, направленных на профилактику и лечение социально значимых возрастных патологий.

Кроме того, данные о молекулярно-генетических механизмах ответа на действие факторов среды могут послужить основой для оценки рисков воздействия повреждающих агентов и создания чувствительных биосенсоров, предназначенных для эффективного и быстрого выявления загрязнения окружающей среды.

# **СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**



**Лаборатория молекулярной радиобиологии и геронтологии  
отдела радиоэкологии  
Института биологии Коми НЦ УрО РАН  
(руководитель – д.б.н., профессор РАН, А.А. Москалев)**