

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Транскрипционный фактор dFOXO регулирует экспрессию генов инсулинового сигнального каскада и содержание липидов при тепловом стрессе у *Drosophila melanogaster*

М.А. Еремина¹✉, П.Н. Меньшанов^{1, 2}, О.Д. Шишкина¹, Н.Е. Грунтенко¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

✉ eremina@bionet.nsc.ru

Аннотация. Одним из основных элементов ответа организма на неблагоприятные условия является сигнальный каскад инсулина/инсулиноподобных факторов роста (И/ИФР). Благодаря глубокой гомологии этого каскада и эволюционной консервативности его роли в регуляции углеводно-жирового метаболизма, возможно использование модельного объекта *Drosophila melanogaster* для изучения механизмов его функционирования. Для определения особенностей взаимодействия двух ключевых компонентов каскада И/ИФР у *D. melanogaster* – транскрипционного фактора dFOXO и инсулиноподобного пептида DILP6, «посредника» в передаче сигнала от dFOXO в жировом теле к инсулин-продуцирующим клеткам мозга (месту синтеза DILPs1–5), – в условиях теплового стресса мы провели анализ экспрессии генов *dilp6*, *dfoxo* и гена инсулиноподобного рецептора (*dlnR*) у самок линий, несущих гипоморфную мутацию *dilp6*⁴¹ и гипофункциональную мутацию *foxo*^{BG01018}. Обнаружено, что обе мутации не оказывали влияния на экспрессию *dfoxo* и ее повышение при кратковременном тепловом стрессе, однако нарушали ответ на стресс генов *dilp6* и *dlnR*. Для выявления роли обнаруженных нарушений в контроле метаболизма и метаболического поведения мы проанализировали влияние мутаций *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018} на содержание общих липидов и интенсивность капиллярного питания имаго в нормальных условиях и при кратковременном тепловом стрессе. Обе мутации приводили к усилению данных признаков в нормальных условиях и препятствовали снижению содержания общих липидов после стресса, наблюдаемому у контрольной линии. Интенсивность питания была повышена у мутантов в нормальных условиях и снижалась после кратковременного теплового стресса у всех изученных линий в течение первых суток наблюдения, а у линии *dilp6*⁴¹ – в течение двух суток. Таким образом, можно заключить, что dFOXO принимает участие в регуляции как ответа сигнального каскада И/ИФР на тепловой стресс, так и вызываемых тепловым стрессом изменений в содержании липидов, причем эта регуляция опосредуется DILP6. В то же время метаболическое поведение имаго, по-видимому, регулируется dFOXO и DILP6 в нормальных условиях, но не при тепловом стрессе.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; сигнальный каскад инсулина/инсулиноподобных факторов роста; *dlnR*; *dilp6*; *dfoxo*; экспрессия генов; пищевое поведение; общие липиды.

Для цитирования: Еремина М.А., Меньшанов П.Н., Шишкина О.Д., Грунтенко Н.Е. Транскрипционный фактор dFOXO регулирует экспрессию генов инсулинового сигнального каскада и содержание липидов при тепловом стрессе у *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(5):465-471. DOI 10.18699/VJ21.053

The transcription factor dFOXO controls the expression of insulin pathway genes and lipids content under heat stress in *Drosophila melanogaster*

М.А. Eremina¹✉, P.N. Menshanov^{1, 2}, O.D. Shishkina¹, N.E. Gruntenko¹

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia

✉ eremina@bionet.nsc.ru

Abstract. The insulin/insulin-like growth factor signaling (IIS) pathway is one of the key elements in an organism's response to unfavourable conditions. The deep homology of this pathway and its evolutionary conservative role in controlling the carbohydrate and lipid metabolism make it possible to use *Drosophila melanogaster* for studying its functioning. To identify the properties of interaction of two key IIS pathway components under heat stress in *D. melanogaster* (the forkhead box O transcription factor (dFOXO) and insulin-like peptide 6 (DILP6), which intermediates the dFOXO signal sent from the fat body to the insulin-producing cells of the brain where DILPs1–5 are synthesized), we analysed the expression of the genes *dilp6*, *dfoxo* and insulin-like receptor gene (*dlnR*) in females of strains carrying the hypomorphic mutation *dilp6*⁴¹ and hypofunctional mutation *foxo*^{BG01018}. We found that neither mutation influenced *dfoxo* expression and its uprise under short-term heat stress, but both of them disrupted the stress response of the *dilp6*

and *dInR* genes. To reveal the role of identified disruptions in metabolism control and feeding behaviour, we analysed the effect of the *dilp6*⁴¹ and *foxo*^{BG01018} mutations on total lipids content and capillary feeding intensity in imago under normal conditions and under short-term heat stress. Both mutations caused an increase in these parameters under normal conditions and prevented decrease in total lipids content following heat stress observed in the control strain. In mutants, feeding intensity was increased under normal conditions; and decreased following short-term heat stress in all studied strains for the first 24 h of observation, and in *dilp6*⁴¹ strain, for 48 h. Thus, we may conclude that dFOXO takes part in regulating the IIS pathway response to heat stress as well as the changes in lipids content caused by heat stress, and this regulation is mediated by DILP6. At the same time, the feeding behaviour of imago might be controlled by dFOXO and DILP6 under normal conditions, but not under heat stress.

Key words: *Drosophila melanogaster*; insulin/insulin-like growth factors signaling pathway; *dInR*; *dilp6*; *dfoxo*; gene expression; feeding behaviour; total lipids.

For citation: Eremina M.A., Menshanov P.N., Shishkina O.D., Gruntenko N.E. The transcription factor dFOXO controls the expression of insulin pathway genes and lipids content under heat stress in *Drosophila melanogaster*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(5):465-471. DOI 10.18699/VJ21.053

Введение

В современных условиях частых столкновений живых организмов с неблагоприятными воздействиями внешней среды, такими как загрязнение окружающей среды или глобальное изменение климата, приобретает особую актуальность изучение глубоко консервативных механизмов, способствующих адаптации животных к подобным условиям. Известно, что воздействия такого рода инициируют развитие неспецифических защитно-приспособительных реакций на молекулярном (Гарбуз, Евгеньев, 2017), поведенческом (Калуев, 1999), биохимическом и физиологическом (нейроэндокринная стресс-реакция) (Груntenko, 2008; Even et al., 2012; Miyashita, Adamo, 2020) уровнях. Эта способность животных, в том числе насекомых, реагировать на стресс комплексным образом, включающим поведенческие, метаболические и молекулярные реакции, имеет решающее значение для выживания и адаптации (Koyma et al., 2020). Получено достаточно доказательств того, что у насекомых сигнальный каскад И/ИФР, помимо своей роли критического регулятора роста и метаболизма, является важной составляющей нейроэндокринной стресс-реакции (Gruntenko, Rauschenbach, 2018; Lubawy et al., 2020). Благодаря глубокой гомологии этого каскада у животных различных таксонов, включая человека и дрозофилу, представляется возможным использование последней в качестве объекта для изучения эволюционно-консервативных механизмов, лежащих в основе молекулярно-генетической регуляции сигнального каскада И/ИФР и контролируемого им углеводно-жирового метаболизма. Как и для большинства других животных, у насекомых углеводы и жиры служат основными запасами энергии для жизнедеятельности (Arrese, Soulages, 2010). Процессы производства и хранения энергии сложно модулируются множеством внутренних факторов (наследственность, образ жизни, гормоны, метаболиты и др.) и различными внешними воздействиями (Mattila, Nietakangas, 2017).

Актуальность использования *Drosophila* в исследовании регуляции метаболизма определяется присущей этому модельному объекту более простой регуляцией каскада И/ИФР (рис. 1), включающего гомологи инсулина (DILPs1–5) и инсулиноподобных факторов роста млекопитающих (DILP6), которые связываются с единственным инсулиноподобным рецептором (dInR), активирующим

каскад (Gruntenko, Rauschenbach, 2018), и два гомолога релаксина (DILPs7,8) (Gontijo, Garelli, 2018). Передача сигнала dInR, осуществляемая напрямую или через его субстрат CHICO (гомолог субстратов инсулинового рецептора млекопитающих, IRS1–4), приводит к активации dAkt/PKB (гомолога протеинкиназы B), которая, в свою очередь, модулирует активность ряда белков, в частности фосфорилирует транскрипционный фактор семейства Forkhead box class O, dFOXO (гомолог FOXO млекопитающих), синтезируемый в жировом теле и регулирующий транскрипцию более чем тысячи генов (Bai et al., 2012), и ингибирует его перемещение в ядро клетки (Puig et al., 2003; Slack et al., 2011; Álvarez-Rendón et al., 2018). Под действием стресса dFOXO транслируется в ядро (Jünger et al., 2003; Hwangbo et al., 2004; Gruntenko et al., 2016), активируя экспрессию ряда генов, в том числе *dInR*, по механизму обратной связи (Gruntenko, Rauschenbach, 2018). Также ранее было показано, что экспрессия *dilp6* в жировом теле подавляет экспрессию *dilp2* and *dilp5* в мозге имаго и секрецию DILP2 в гемолимфу и что влияние dFOXO на экспрессию DILPs, продуцируемых в нейросекреторных клетках мозга, опосредуется синтезируемым в жировом теле DILP6 (Slaidina et al., 2009; Bai et al., 2012). Таким образом, DILP6, по-видимому, связывает dFOXO, жировую ткань и эндокринную функцию мозга, образуя петлю обратной связи к dInR.

Реакция на стресс мобилизует запасы энергии организма и сопровождается разнообразными метаболическими изменениями. В изменяющихся условиях пищевое поведение тоже играет важную роль в приспособлении и адаптации (Rabasa, Dickson, 2016). Известно, что у млекопитающих острый интенсивный стресс обычно связан с подавлением питания и снижением набора массы тела; также хронический стресс может привести к чрезмерному потреблению пищи, увеличению веса и ожирению (Rabasa, Dickson, 2016).

Целью настоящей работы было проанализировать экспрессию генов dInR, DILP6 и dFOXO, трех ключевых компонентов инсулинового сигнального каскада, вовлеченного в нейроэндокринную стресс-реакцию, у линий *D. melanogaster*, несущих мутации *dilp6*⁴¹ и *foxo*^{BG01018}, в условиях теплового стресса, и оценить влияние последнего на метаболическое поведение и содержание общих липидов у этих линий.

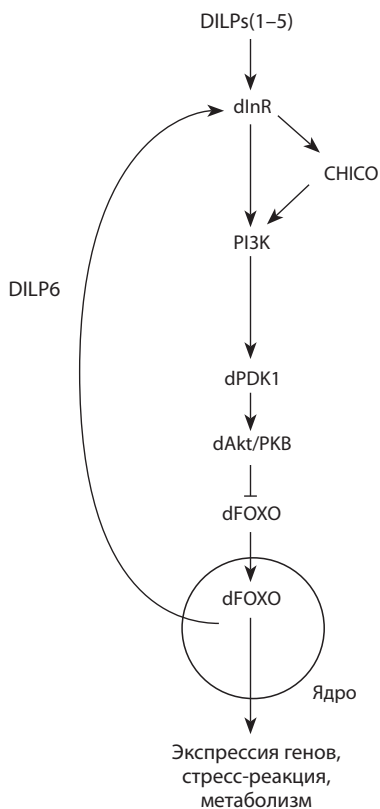


Рис. 1. Схема сигнального каскада И/ИФР у дрозофилы.

DILPs – инсулиноподобные белки дрозофилы; dInR – инсулиноподобный рецептор дрозофилы; CHICO – гомолог субстрата инсулинового рецептора млекопитающих; PI3K – фосфатидилинозитол 3-киназа; dPDK1 – фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа 1 дрозофилы; dAkt/PKB – гомолог протеинкиназы В млекопитающих; dFOXO – транскрипционный фактор семейства Forkhead class box О дрозофилы.

Материалы и методы

Линии дрозофилы и условия стрессирования. В работе были использованы три линии *D. melanogaster*: линия *dilp6⁴¹* с делецией 3'-области гена *phl*, 5'-области гена *dilp6*, захватывающей первый экзон и часть первого интрона (Rauschenbach et al., 2017), линия *foxo^{BG01018}*, несущая вставку Р-элемента [GT1] в 5'-области гена *dfoxo* (Dionne et al., 2006), и линия-предшественник этих мутантов *w¹¹¹⁸* в качестве контроля. Линии получены из Bloomington Drosophila Stock Center.

Мушкы содержались на стандартной питательной среде (агар-агар, 7 г/л; кукурузная мука, 50 г/л; сухие дрожжи, 18 г/л; сахар, 40 г/л) в инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 25 °С, относительной влажности 50 %, 12-часовом световом дне. Для экспериментов насекомых синхронизировали по вылету (мушкы собирались через 3–4 ч). Мушкы подвергали тепловому стрессу, помещая стаканы с ними в сузовоздушный термостат (38 °С) на 60 или 90 мин. После 60-минутного стрессирования стаканы возвращали к температуре 25 °С, после 90-минутного – замораживали в жидком азоте.

ПЦР в реальном времени. Количество мРНК генов *dilp6*, *dfoxo* и *dlnR* оценивали относительно *Act5C* у 15 мушкы каждой группы в нормальных условиях или после 90 мин при 38 °С с использованием TRI reagent Lot # BCVT8883 (Sigma, США) для выделения суммарной РНК, набора Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit # K1621 (Thermo Scientific, США) с праймером oligo (dT)18 для получения кДНК, набора M-427 с SYBR-Green I («Синтол», Россия) для проведения ПЦР-РВ и амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США). Каждую реакцию проводили в трех технических и трех биологических повторах. Последовательности праймеров представлены в таблице. Высокая стабильность экспрессии *Act5C* при тепловом стрессе показана в работе (Ponton et al., 2011).

Определение содержания общих липидов. Измерение концентрации общих липидов проводили с использованием модифицированного метода, описанного Ван Генделем (Van Handel, 1985; Еремина, Грунтенко, 2020), в нормальных условиях или спустя 24 ч после 60 мин при 38 °С. Декапитированные (во избежание влияния глазного пигмента на результаты измерений) тела мушкы (1 мушка на образец, по 10–20 образцов в каждой исследованной группе) гомогенизировали на льду в 100 мкл раствора хлороформ-метанола (1:1), после чего образцы интенсивно встряхивали 10 мин. Далее 50 мкл супернатанта пипеткой переносили в чистые пробирки и нагревали на микротермостате М-208 («Бис-Н», Россия) при 90 °С до испарения растворителя, затем добавляли 10 мкл 95 % H₂SO₄ и нагревали образцы при той же температуре в течение 2 мин. Далее образцы охлаждали на льду и добавляли фосфованилиновый реагент: 85 % H₃PO₄ + 6 % раствор ванилина (4:1) до отметки 1 мл. Инкубировали 15 мин при комнатной температуре до проявления розового окрашивания, стабильного в течение 1 ч. Считали образцы в

Последовательности праймеров, использованных в ПЦР-РВ

Ген	Ампликон, п. н.	Прямой/обратный	Последовательность (5'–3')	T, °С	Литературный источник
<i>dfoxo</i>	196	F	GCCTAGATCACTTCCCGAG	53	Gruntenko et al., 2016
		R	GTCAGCTCATCGCCATTGT	55	
<i>dilp6</i>	149	F	CACGGAATACGAACAGAGACG	55	Еремина и др., 2019
		R	TCGGTTACGTTCTGCAAGTC	55	
<i>dlnR</i>	123	F	TGAGCATGTGGAGCACATCAAGATG	59	Okamoto et al., 2013
		R	CGTAGGAGATTTTCTCGTTGGCTG	58	
<i>Act5C</i>	90	F	GCGCCCTACTCTTCCACCA	58	Guio et al., 2014
		R	ATGTCACGGACGATTTACAG	55	

спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 525 нм.

Анализ пищевого поведения (SAFE). Скорость потребления корма измеряли методом, предложенным в работе Джа с соавторами (Ja et al., 2007) и модифицированным Вильямсом с коллегами (Williams et al., 2014). Для обеспечения мухам влажной среды использовали стеклянные плоскодонные пробирки (20 × 100 мм), содержащие 1 % агарозу (5 см в высоту), которые были помещены в микроцентрифужные пробирки объемом 50 мл, заполненные 7 мл воды. Стеклокапиллярную трубку (10 × 90 мм, Narishige, Япония) заполняли 20 мкл жидкого корма, содержащего 5 % сахара и 5 % дрожжевого экстракта (Biospringer, Франция). Пять самок помещали в пробирку (4–9 пробирок для каждой группы) и отверстие закрывали губчатой пробкой. Капиллярную трубку вводили в пробирку сверху через усеченный пластиковый наконечник объемом до 10 мкл и пластиковый наконечник до 200 мкл в качестве фиксации. Пробирки с мухами содержали в инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 25 °С, относительной влажности 50 %, 12-часовом световом дне, в течение 24 или 48 ч. Экспериментальную группу перед этим подвергали кратковременному тепловому стрессу (38 °С, 60 мин). Начальный и конечный уровень корма в капиллярной трубке отмечали для определения общего потребления пищи в день. Чтобы снизить испарение корма, применяли «пробку» из 0.1 мкл растительного масла в верхней части капилляра. Для внесения поправки на испарение корма использовали пробирку, не содержащую мух.

Статистический анализ полученных данных по экспрессии генов проводили методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Межгрупповые сравнения выполняли дисперсионным анализом, различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Чтобы выяснить, влияет ли нарушение петли обратной связи в регуляции сигнального каскада И/ИФР на его стресс-ответ, мы изучили экспрессию трех ключевых генов каскада – *dilp6*, *dfoxo* и *dlnR* – у самок *D. melanogaster*, несущих гипоморфную мутацию *dilp6⁴¹* и гипофункциональную мутацию *foxo^{BG01018}*, в нормальных условиях и при тепловом стрессе (38 °С, 90 мин). Количественных изменений в уровне экспрессии мРНК генов *dilp6* и *dlnR* у линий *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* при тепловом стрессе выявлено не было, в отличие от линии-предшественника этих мутантов *w¹¹¹⁸*, у которой экспрессия *dilp6* снижалась, а экспрессия *dlnR* повышалась при тепловом стрессе (рис. 2, $p < 0.05$ для обоих генов). В то же время уровень экспрессии *dfoxo* при тепловом стрессе повышался или имел тенденцию к повышению у всех исследованных линий (см. рис. 2, ЛИНИЯ – $F_{(2, 12)} = 3.14$, $p < 0.081$; СТРЕСС – $F_{(1, 12)} = 12.80$, $p < 0.0038$). Следует отметить, что мутанты *dilp6⁴¹* характеризуются сниженным уровнем экспрессии гена *dilp6* ($p < 0.001$), тогда как уровень экспрессии *dfoxo* у мутантов *foxo^{BG01018}* не отличается от контрольной линии *w¹¹¹⁸* (см. рис. 2). Это позволяет предположить, что описанная ранее потеря функции dFOXO у линии *foxo^{BG01018}* (Dionne et al., 2006) связана не со снижением уровня экспрессии соответствующего гена, а с нарушением его структуры.

Результаты количественного измерения общих липидов у самок *D. melanogaster* с мутациями *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* в нормальных условиях и после теплового стресса (38 °С, 60 мин) свидетельствуют, что обе мутации вызывают повышение содержания липидов по сравнению с контрольной линией *w¹¹¹⁸*, причем содержание липидов у линий *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* не снижается через сутки после теплового стресса в отличие от линии-предшественника (рис. 3, а, ЛИНИЯ – $F_{(1, 96)} = 26.78$, $p \ll 0.0001$;

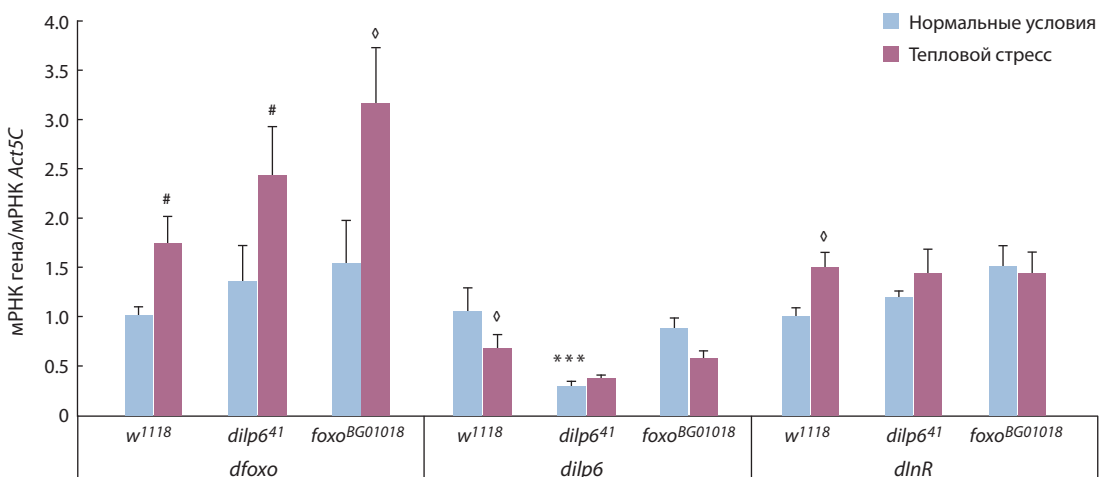


Рис. 2. Уровень мРНК генов *dilp6*, *dfoxo* и *dlnR* у самок *D. melanogaster* линий *w¹¹¹⁸*, *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* в нормальных условиях и после кратковременного теплового стресса (38 °С, 90 мин).

Каждое значение – среднее из трех биологических повторов. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. *** – достоверность отличий мутантных самок с мутацией гена инсулиноподобного пептида DILP6 (*dilp6⁴¹*) от самок контрольной линии *w¹¹¹⁸* ($p < 0.001$); ◊ – достоверность отличий стрессированной группы от контрольной того же генотипа ($p < 0.05$); # – тенденция к ее отличию ($p < 0.07$).

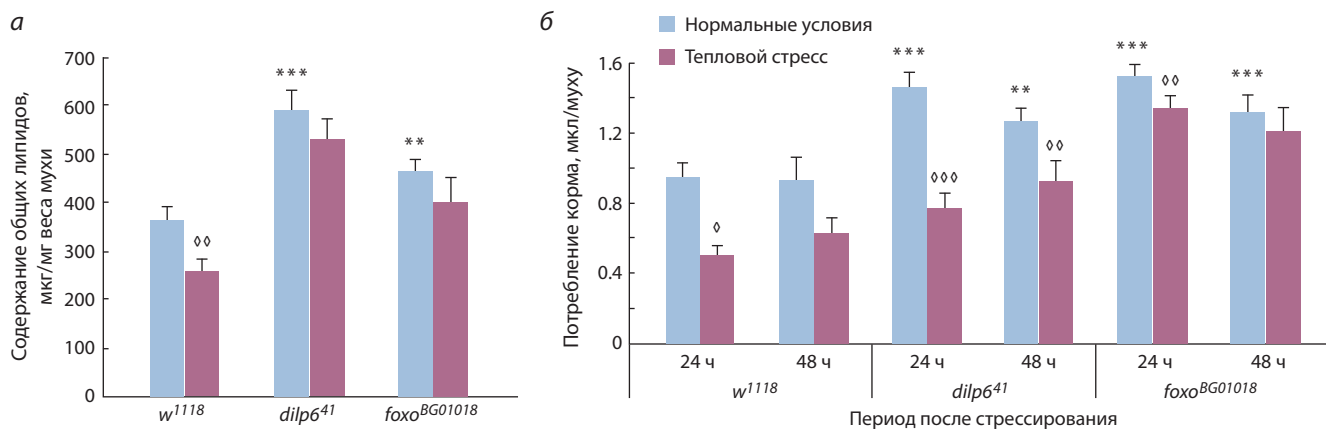


Рис. 3. Уровень общих липидов (а) и интенсивность капиллярного питания (б) у самок *D. melanogaster* линий *w¹¹¹⁸*, *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* в нормальных условиях и после кратковременного теплового стресса (38 °С, 60 мин).

Каждое значение – среднее из 10–20 (а) и 9–11 (б) измерений. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Звездочки – достоверность отличий самок с мутациями *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* от самок контрольной линии *w¹¹¹⁸* (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Ромб – достоверность отличий стрессированной группы от контрольной того же генотипа (◊ $p < 0.05$, ◊◊ $p < 0.01$, ◊◊◊ $p < 0.001$).

СТРЕСС – $F_{(1, 96)} = 141.56, p < 0.012$; ЛИНИЯ+СТРЕСС – $F_{(2, 96)} = 0.25, p = 0.777$.

Повышенное содержание липидов у самок мутантных линий хорошо объясняется обнаруженным у них повышенным потреблением корма по сравнению с самками линии *w¹¹¹⁸* на протяжении всего времени эксперимента (см. рис. 3, б, ЛИНИЯ – $F_{(2, 59)} = 44.40, p \ll 0.0001$; ВРЕМЯ – $F_{(1, 59)} = 5.12, p < 0.028$; ЛИНИЯ+ВРЕМЯ – $F_{(2, 59)} = 1.41, p = 0.252$). Однако в первые сутки после теплового стресса интенсивность питания снижается по сравнению с нормальными условиями как у самок контрольной линии *w¹¹¹⁸*, так и у обоих мутантов; у линии *dilp6⁴¹* этот эффект сохраняется в течение двух суток (см. рис. 3, б, СТРЕСС – $F_{(1, 59)} = 36.09, p \ll 0.0001$; ЛИНИЯ+СТРЕСС – $F_{(2, 59)} = 6.28, p < 0.0034$; ЛИНИЯ+СТРЕСС+ВРЕМЯ – $F_{(2, 59)} = 1.26, p = 0.291$).

Сигнальный каскад И/ИФР, как было показано ранее, может взаимодействовать с гонадотропинами и биогенными аминами дрозофилы, модулируя их динамику при стрессе и принимая тем самым участие в контроле реакции организма на стресс (Gruntenko, Rauschenbach, 2018), но оставалось невыясненным, какие именно звенья каскада И/ИФР задействованы в стресс-ответе и как участие каскада И/ИФР в стресс-ответе сказывается на его способности контролировать углеводно-жировой обмен.

Ранее нами был продемонстрирован переход dFOXO в ядро при тепловом стрессе у самок дрозофилы (Gruntenko et al., 2016), а здесь мы показали, что этот переход сопровождается тенденцией к усилению экспрессии *dfoxo* (см. рис. 2). Наши данные также свидетельствуют о том, что активация dFOXO при стрессе приводит к ингибированию *dilp6*, поскольку у мутантов *foxo^{BG01018}* не наблюдается снижения экспрессии гена *dilp6*, обнаруживаемого у контрольной линии *w¹¹¹⁸* (см. рис. 2).

В работе (Bai et al., 2012) показано, что экспрессия *dilp6* в жировом теле подавляет экспрессию *dilp2* and *dilp5* в мозге имаго и секрецию DILP2 в гемолимфу, а влияние

dFOXO на экспрессию DILPs, продуцируемых в нейросекреторных клетках мозга, блокируется одновременной репрессией DILP6 с помощью РНК-интерференции в жировом теле. Это позволяет предположить, что снижение активности DILP6 при тепловом стрессе приводит к повышению уровня DILPs, продуцируемых в нейросекреторных клетках мозга. Действительно, ранее нам удалось продемонстрировать повышение синтеза DILP3 в этих клетках имаго дикого типа в ответ на тепловое воздействие (Андреенкова и др., 2018), а также – резкое повышение интенсивности синтеза DILP3 у личинок мутантной линии *dilp6⁴¹* в нормальных условиях (Андреенкова и др., 2017), что согласуется с нашим предположением о передаче сигнала от dFOXO на DILP3 через DILP6 при тепловом стрессе. Далее, по всей видимости, DILP3 активирует dInR, ингибируя каскад И/ИФР, что подтверждается нашими данными об отсутствии изменения уровня экспрессии *dInR* при тепловом стрессе у мух с мутациями генов *dilp6* и *dfoxo* в отличие лабораторной линии *w¹¹¹⁸*, которая демонстрирует снижение экспрессии *dilp6* и повышение – *dInR* в ответ на тепловое воздействие (см. рис. 2).

Системные дефекты в сигнальном каскаде И/ИФР вызывают у *D. melanogaster* сложный набор фенотипов, в том числе связанных с метаболизмом, обычно включающих увеличение запасов углеводов и липидов в организме (Mattila, Nietakangas, 2017). В исследовании (Murillo-Maldonado et al., 2011) показано, что практически все жизнеспособные комбинации мутаций с частичной потерей функции или гипоморфностью генов сигнального каскада И/ИФР имели изменения в уровнях липидов и углеводов. Слайдина с коллегами (Slaidina et al., 2009) продемонстрировали, что нокдаун *dilp6* вызывает повышение уровня триглицеридов и гликогена у личинок дрозофилы. С этими результатами хорошо согласуются наши данные о повышенном содержании общих липидов у самок линий *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* (см. рис. 3, а), а также обнаруженное нами ранее повышение содержания глюкозы и трегалозы у мутантов *dilp6⁴¹* и *foxo^{BG01018}* (Еремина и др., 2019).

Что же касается регуляции пищевого поведения под действием теплового стресса, то она, судя по всему, осуществляется без участия генов *dilp6* и *dfoxo*, так как их мутации не препятствуют снижению аппетита после стресса (см. рис. 3, б).

Заключение

Таким образом, нарушение функций генов *dilp6* и *dfoxo* у *Drosophila melanogaster* приводит к (1) нарушениям в петле обратной связи сигнального каскада ИИФР в условиях теплового стресса, (2) повышению содержания общих липидов в нормальных условиях, препятствуя их снижению после теплового стресса, (3) повышению интенсивности питания в нормальных условиях, не препятствуя ее снижению после теплового стресса.

Список литературы / References

Андреевкова О.В., Еремина М.А., Груntenко Н.Е., Раушенбах И.Ю. Влияние теплового стресса на экспрессию генов инсулиноподобных белков DILP2 и DILP3 у имаго *Drosophila melanogaster*. *Генетика*. 2018;54(3):366-368.
[Andreenkova O.V., Eremina M.A., Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Y. Effect of heat stress on expression of DILP2 and DILP3 insulin-like peptide genes in *Drosophila melanogaster* adults. *Russ. J. Genet.* 2018;54(3):363-365. DOI 10.1134/S102279541803002X.]
Андреевкова О.В., Раушенбах И.Ю., Груntenко Н.Е. Гипоморфная мутация гена *dilp6* повышает экспрессию DILP3 в инсулинпродуцирующих клетках *Drosophila melanogaster*. *Генетика*. 2017;53(10):1232-1234.
[Andreenkova O.V., Rauschenbach I.Y., Gruntenko N.E. Hypomorphic mutation of the *dilp6* gene increases DILP3 expression in insulin-producing cells of *Drosophila melanogaster*. *Russ. J. Genet.* 2017;53(10):1159-1161. DOI 10.1134/S1022795417080026.]
Гарбуз Д.Г., Евгенев М.Б. Эволюция генов теплового шока и характер экспрессии кодируемых ими белков у видов, обитающих в контрастных температурных условиях. *Генетика*. 2017;53(1):12-30.
[Garbuz D.G., Evgen'ev M.B. The evolution of heat shock genes and expression patterns of heat shock proteins in the species from temperature contrasting habitats. *Russ. J. Genet.* 2017;53(1):21-38. DOI 10.1134/S1022795417010069.]
Груntenко Н.Е. Стресс и размножение насекомых: гормональный контроль. Новосибирск; Москва: Т-во науч. изданий КМК, 2008. [Gruntenko N.E. Stress and Reproduction of Insects: Hormonal Control. Novosibirsk; Moscow: KMK Publ., 2008. (in Russian)]
Еремина М.А., Груntenко Н.Е. Адаптация сульфопосфованилинового метода анализа общих липидов для различных биологических объектов на примере *Drosophila melanogaster*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4):441-445. DOI 10.18699/VJ20.636.
[Eremina M.A., Gruntenko N.E. Adaptation of the sulfophosphovanillin method of analysis of total lipids for various biological objects as exemplified by *Drosophila melanogaster*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(4):441-445. DOI 10.18699/VJ20.636. (in Russian)]
Еремина М.А., Карпова Е.К., Раушенбах И.Ю., Пирожкова Д.С., Андреевкова О.В., Груntenко Н.Е. Влияние мутаций генов инсулинового сигнального каскада на изменение уровня углеводов у самок *Drosophila melanogaster* при тепловом стрессе. *Генетика*. 2019;55(4):485-488.
[Eremina M.A., Karpova E.K., Rauschenbach I.Yu., Pirozhkova D.S., Andreenkova O.V., Gruntenko N.E. Mutations in the insulin signaling pathway genes affect carbohydrate level under heat stress in *Drosophila melanogaster* females. *Russ. J. Genet.* 2019; 55(4):519-521. DOI 10.1134/S1022795419030050.]

Калуев А.В. Проблемы изучения стрессорного поведения. Киев: КСФ, 1999.
[Kaluev A.V. Problems of Studying Stressful Behavior. Kiev: KSF Publ., 1999. (in Russian)]
Álvarez-Rendón J.P., Salceda R., Riesgo-Escovar J.R. *Drosophila melanogaster* as a model for diabetes type 2 progression. *Biomed. Res. Int.* 2018;2018:1417528. DOI 10.1155/2018/1417528.
Arrese E.L., Soulages J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 2010;55:207-225. DOI 10.1146/annurev-ento-112408-085356.
Bai H., Kang P., Tatar M. *Drosophila* insulin-like peptide-6 (*dilp6*) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell.* 2012;11(6):978-985. DOI 10.1111/acel.12000.
Dionne M.S., Pham L.N., Shirasu-Hiza M., Schneider D.S. *Akt* and *foxo* dysregulation contribute to infection-induced wasting in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 2006;16(20):1977-1985. DOI 10.1016/j.cub.2006.08.052.
Even N., Devaud J.M., Barron A.B. General stress responses in the honey bee insects. *Insects.* 2012;3(4):1271-1298. DOI 10.3390/insects3041271.
Gontijo A.M., Garelli A. The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: a relaxin-like pathway coupling tissue growth and developmental timing control. *Mech. Dev.* 2018;154:44-50. DOI 10.1016/j.mod.2018.04.005.
Gruntenko N.E., Adonyeva N.V., Burdina E.V., Karpova E.K., Andreenkova O.V., Gladkikh D.V., Ilinsky Y.Y., Rauschenbach I.Yu. The impact of FOXO on dopamine and octopamine metabolism in *Drosophila* under normal and heat stress conditions. *Biol. Open.* 2016; 5(11):1706-1711. DOI 10.1242/bio.022038.
Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. The role of insulin signalling in the endocrine stress response in *Drosophila melanogaster*: a mini-review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2018;258:134-139. DOI 10.1016/j.ygcen.2017.05.019.
Guio L., Barron M.G., Gonzalez J. The transposable element *Bari-Jheh* mediates oxidative stress response in *Drosophila*. *Mol. Ecol.* 2014;23:2020-2030.
Hwangbo D.S., Gershman B., Tu M.P., Palmer M., Tatar M. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature.* 2004;429(6991):562-566. DOI 10.1038/nature02549.
Ja W.W., Carvalho G.B., Mak E.M., de la Rosa N.N., Fang A.Y., Liang J.C., Brummel T., Benzer S. Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104(20):8253-8256. DOI 10.1073/pnas.0702726104.
Jünger M.A., Rintelen F., Stocker H., Wasserman J.D., Végh M., Radimerski T., Greenberg M.E., Hafen E. The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 2003;278(3):20. DOI 10.1074/jbc.M211475-02.0.
Koyama T., Texada M.J., Halberg K.A., Rewitz K. Metabolism and growth adaptation to environmental conditions in *Drosophila*. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020;77:4523-4551.
Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. DOI 10.1006/meth.2001.1262.
Lubawy J., Urbanski A., Colinet H., Pflüger H.-J., Marciniak P. Role of the insect neuroendocrine system in the response to cold stress. *Front. Physiol.* 2020;11:376. DOI 10.3389/fphys.2020.00376.
Mattila J., Hietakangas V. Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 2017;207(4):1231-1253. DOI 10.1534/genetics.117.199885.
Miyashita A., Adamo S.A. Stayin' alive: Endocrinological stress responses in insects. In: Saleuddin S., Lange A., Orchard I. (Eds.). *Advances in Invertebrate Endocrinology*. Toronto: Apple Acad. Press, 2020;283-325.
Murillo-Maldonado J.M., Sánchez-Chávez G., Salgado L.M., Salceda R., Riesgo-Escovar J.R. *Drosophila* insulin pathway mutants af-

- fect visual physiology and brain function besides growth, lipid, and carbohydrate metabolism. *Diabetes*. 2011;60(5):1632-1636. DOI 10.2337/db10-1288.
- Okamoto N., Nakamori R., Murai T., Yamauchi Y., Masuda A., Nishimura T. A secreted decoy of InR antagonizes insulin/IGF signaling to restrict body growth in *Drosophila*. *Genes Dev*. 2013;27(1):87-97. DOI 10.1101/gad.204479.112.
- Ponton F., Chapuis M.-P., Pernice M., Sword G.A., Simpson S.J. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol*. 2011;57:840-850. DOI 10.1016/j.jinsphys.2011.03.014.
- Puig O., Marr M.T., Ruhf M.L., Tjian R. Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev*. 2003;17(16):2006-2020. DOI 10.1101/gad.1098703.
- Rabasa C., Dickson S.L. Impact of stress on metabolism and energy balance. *Curr. Opin. Behav. Sci*. 2016;9:71-77. DOI 10.1016/j.cobeha.2016.01.011.
- Rauschenbach I.Y., Karpova E.K., Burdina E.V., Adonyeva N.V., Bykov R.A., Ilinsky Y.Y., Menshanov P.N., Gruntenko N.E. Insulin-like peptide DILP6 regulates juvenile hormone and dopamine metabolism in *Drosophila* females. *Gen. Comp. Endocrinol*. 2017; 243:1-9. DOI 10.1016/j.ygcen.2016.11.004.
- Slack C., Giannakou M.E., Foley A., Goss M., Partridge L. dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in *Drosophila*. *Aging Cell*. 2011;10(5):735-748. DOI 10.1111/j.1474-9726.2011.00707.x.
- Slaidina M., Delanoue R., Grönke S., Partridge L., Leopold P. A *Drosophila* insulin-like peptide promotes growth during nonfeeding states. *Dev. Cell*. 2009;17(6):874-884. DOI 10.1016/j.devcel.2009.10.009.
- Van Handel E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc*. 1985;1:302-304.
- Williams M.J., Wang Yi., Klockars A., Lind P.M., Fredriksson R., Schiöth H.B. Exposure to bisphenol A affects lipid metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 2014; 114(5):414-420. DOI 10.1111/bcpt.12170.

ORCID ID

M.A. Eremina orcid.org/0000-0001-6136-6928
N.E. Gruntenko orcid.org/0000-0003-3272-1518

Благодарности. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта № 0259-2021-0016.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 22.06.2021. После доработки 28.06.2021. Принята к публикации 11.07.2021.