

УДК 577.24

ОСОБЕННОСТИ КРИВОЙ ВЫЖИВАНИЯ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА *D-GADD45*

© 2013 г. Е.Н. Плюснина^{1,2}, М.В. Шапошников^{1,2}, Е.Н. Андреева³,
А.А. Москалев^{1,2,4}, Л.В. Омелянчук³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии
Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук,
Сыктывкар, Россия,

e-mail: ome@mcb.nsc.ru;

² ФГБОУ ВПО Сыктывкарский государственный университет, Сыктывкар, Россия;

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия;

⁴ Московский физико-технический институт (государственный университет),
Москва, Россия

Поступила в редакцию 29 июля 2013 г. Принята к публикации 17 августа 2013 г.

Известно, что сверхэкспрессия гена *Gadd45* в нервной системе дрозофилы увеличивает продолжительность жизни. В работе проведена аппроксимация кривых выживания дрозофил в такого рода экспериментах с помощью распределения Гомпертца и показано, что продление жизни достигается за счет изменения параметра R , отражающего интенсивность гибели в начальный момент времени, а не за счет другого параметра распределения Гомпертца, α , отражающего экспоненциально растущую интенсивность гибели. Дополнительно провели анализ кривых выживания для случая радиационного гормезиса (когда облучение малыми дозами радиации вызывает продление жизни особей) и также подтвердили найденную в первом случае закономерность. На этой основе заключили, что поиск геропротекторов перспективно проводить среди веществ, уменьшающих параметр R , который более легко измерим, чем полная кривая выживания.

Ключевые слова: продолжительность жизни, репарация ДНК, *GADD45*, сверхэкспрессия, малые дозы ионизирующей радиации, гормезис, *Drosophila melanogaster*.

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства *GADD45* (growth-arrest and DNA-damage inducible 45) принимают участие в регуляции экспрессии генов, остановке клеточного цикла, репарации ДНК и апоптозе (Moskalev *et al.*, 2012b). У млекопитающих их экспрессия индуцируется в условиях стресса, в том числе окислительного и генотоксического стрессов (Duan *et al.*, 2005). *GADD45* взаимодействует с белками, участвующими в эксцизионной репарации ДНК (Smith *et al.*, 1994), а также с белками, которые участвуют в репарации двухцепочечных разрывов ДНК (Lee *et al.*, 2012). У дрозофилы известен только один гомолог гена

GADD45 – D-GADD45 и его функции менее изучены (Peretz *et al.*, 2007). Тем не менее, ранее мы показали увеличение продолжительности жизни у *Drosophila melanogaster* в результате сверхэкспрессии *D-GADD45* (Plyusnina *et al.*, 2011).

Один из возможных механизмов, объясняющих увеличение продолжительности жизни в связи со сверхэкспрессией *GADD45*, состоит в том, что она увеличивает устойчивость к стрессам. Ранее нами было показано, что мухи со сверхэкспрессией *D-GADD45* более устойчивы к окислительному и генотоксическому стрессам, тепловому шоку и голоданию, чем мухи без сверхэкспрессии (Moskalev *et al.*, 2012a). В то же время большинство изученных стресс-факторов

индуцируют увеличение уровня экспрессии *D-GADD45* у линии дикого типа (Moskalev *et al.*, 2012a).

Существует достаточно доказательств взаимосвязи между стрессоустойчивостью и долголетием. По мере старения организма наблюдается снижение стрессоустойчивости (Setnenchenko *et al.*, 2004). Сверхэкспрессия генов, которые повышают устойчивость к стрессу, ведет к увеличению продолжительности жизни (Orr, Sohal, 1994; Giannakou *et al.*, 2004). Кроме того, животные с мутациями, которые приводят к долгожительству, характеризуются повышенной устойчивостью к окислительному стрессу и тепловому шоку (Johnson *et al.*, 2001; Вайсман и др., 2012). Однако короткоживущие мутанты модельных организмов характеризуются пониженной устойчивостью к стрессовым факторам (Vermeulen *et al.*, 2005). Активность генов, способствующих ускорению процесса старения, приводит к эндогенным стрессам (например, P66) (Migliaccio *et al.*, 1999). Селекция животных на устойчивость к одному стрессовому фактору повышает устойчивость к другим стресс-факторам и приводит к увеличению продолжительности жизни (Harshman *et al.*, 1999). Виды, которые имеют различную продолжительность жизни, различаются по устойчивости к стрессу, особенно к окислительному стрессу (например, грызуны, летучие мыши, птицы) (Salmon *et al.*, 2009). Долгоживущий голый землекоп (*Heterocephalus glaber*) имеет повышенную устойчивость к широкому спектру цитотоксинов, в том числе и к тепловому шоку, тяжелым металлам, генотоксикантам и ксенобиотикам (Lewis *et al.*, 2012). У человека мы видим те же самые закономерности, например, долгожители не отличаются приверженностью к здоровому образу жизни (Rajpathak *et al.*, 2011). Их исключительную продолжительность жизни можно объяснить повышенной устойчивостью к стрессам. Умеренный стресс приводит к увеличению продолжительности жизни (Rattan, 2005). Например, ионизирующее излучение в малых дозах приводит к увеличению продолжительности жизни дрозофил (эффект гормезиса) (Moskalev, 2007; Moskalev *et al.*, 2011). Механизмы, участвующие в увеличении продолжительности жизни, включают в себя индукцию защитных систем, таких, как

антиоксидантная защита (Arking *et al.*, 2000), репарацию ДНК (Moskalev *et al.*, 2013), синтез белков теплового шока (Zhao *et al.*, 2005; Вайсман и др., 2012), активацию иммунной системы (Amrit *et al.*, 2010) и гибель ослабленных клеток (Moskalev, 2007).

Увеличение продолжительности жизни сопровождается изменением начальной (в нашей терминологии – фоновой, R) и экспоненциальной (в нашей терминологии – возрастной, α) компонент смертности уравнения Гомпертца. Хотя точный биологический смысл R и α не выявлен (Гаврилов, Гаврилова, 1991), параметр R соответствует возрасту, предшествующему моменту начала экспоненциального роста смертности, и его можно рассматривать как генетически предопределенный, в то время как α – скорость экспоненциальной гибели – как следствие лавинообразного накопления молекулярных и клеточных повреждений в стареющем организме после достижения этого порога (Kirkwood, 2005). Таким образом, математический анализ данных параметров может выявить механизмы, лежащие в основе увеличения продолжительности жизни. Целью данной работы является анализ R и α параметров уравнения Гомпертца у мух с увеличенной продолжительностью жизни в результате сверхэкспрессии гена *D-GADD45* и эффектов радиационного гормезиса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *Drosophila melanogaster*. В работе использована лабораторная линия *Canton-S*. Линия *UAS-D-GADD45*, содержащая дополнительную копию гена *D-GADD45* под контролем промотора *UAS*, предоставлена Uri Abdu, Университет Бен Гуриона, Израиль. Линия *1407-GAL4*, несущая драйвер *GAL4*, конститутивно индуцирующийся в клетках нервной системы (из Bloomington *Drosophila* Stock Center, США). Линия *ELAV-GS-GAL4*, содержащая мифепристон-индуцибельный нейроспецифический драйвер *GAL4*, предоставлена Dr. Haig Keshishian, Йельский Университет, США.

Активация сверхэкспрессии. Для конститутивной сверхактивации *D-GADD45* в нервной системе проводили скрещивание самок *UAS-D-GADD45* с самцами *1407-GAL4*. Для кондиционной сверхэкспрессии *D-GADD45*

в нейронах проводили скрещивание самок *UAS-D-GADD45* с самцами *ELAV-GS-GAL4* с последующим внесением в корм мифепристона RU486 (Mifepristone, Sigma).

Условия облучения. Экспериментальные линии *Drosophila melanogaster* подвергали хроническому воздействию γ -излучения от источника ^{226}Ra на протяжении предимагинальных стадий развития (эмбрион, личинка первого–третьего возраста, куколка) при мощности экспозиционной дозы 2,5 мГр/ч. Поглощенная доза составила 40 сГр. Имаго в возрасте не более 24 ч подвергали воздействию острого γ -излучения от источника ^{137}Cs в дозе 30 Гр при мощности экспозиционной дозы 75 сГр/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что модель Гомпертца хорошо подходит для описания смертности особей дрозофилы (Гаврилов, Гаврилова, 1991). Каждая теоретическая кривая характеризуется двумя параметрами: R – фоновая компонента смертности, и α – возрастная компонента смертности. Для решения вопроса о том, уменьшение какой из этих компонент смертности отвечает за увеличение общей продолжительности жизни у особей со сверхэкспрессией гена *D-GADD45* в нервной системе, использовали подход с тестированием альтернативных гипотез: 1) контроль и опыт не различаются по параметру α , но могут иметь разные значения параметра R (α -const); 2) контроль и опыт не различаются по параметру R , но могут иметь разные значения параметра

α (R -const). Технически анализ проводили с помощью программы WinModest, которая содержит такую возможность анализа данных по кривым выживания.

Как можно видеть из табл., для кривых выживания как самок, так и самцов *1407-GAL4/UAS-D-GADD45* и *UAS-D-GADD45* наибольшую статистическую поддержку имеет гипотеза о постоянном α и различающихся параметрах R . В случае особей *ELAV-GS-GAL4/UAS-D-GADD45*, у которых сверхэкспрессия проводилась у вылупившихся мух, по самцам наблюдается предпочтительность гипотезы о постоянном α , в то время как у самок нет разницы между гипотезами. Действительно, в работе, демонстрирующей увеличение продолжительности жизни дрозофилы в результате сверхэкспрессии *D-GADD45*, можно было наблюдать, что величина эффекта у особей *ELAV-GS-GAL4/UAS-D-GADD45* ниже, чем в эксперименте *1407-GAL4/UAS-D-GADD45*. Поэтому логично полагать, что отсутствие дифференциации между гипотезами для самок связано именно с низким уровнем эффекта.

Помимо увеличения продолжительности жизни под действием некоторых мутаций и сверхэкспрессии некоторых генов, известен также случай радиационного гормезиса. Этот эффект заключается в увеличении продолжительности жизни после действия малых доз облучения. Для того чтобы понять, влияет ли радиационный гормезис сходным образом в случае сверхэкспрессии гена *D-GADD45*, мы рассмотрели результаты эксперимента, в котором контрольная линия *Canton-S*

Таблица

Результаты тестирования альтернативных гипотез в различных экспериментах

Сравниваемые варианты	Вероятность ошибочности гипотезы α -const
<i>1407-GAL4/UAS-D-GADD45</i> в сравнении с <i>UAS-D-GADD45</i>	Самки 6,99E-05 (0,00123; 0,00018)
	Самцы 1,85E-19 (0,0003; 0,0001)
<i>ELAV-GS-GAL4/UAS-D-GADD45 (RU486-)</i> в сравнении с <i>ELAV-GS-GAL4/UAS-D-GADD45 (RU486+)</i>	Самки, нет разницы между гипотезами
	Самцы 3,26E-04 (0,00267; 0,00125)
<i>Canton-S</i> в сравнении с <i>Canton-S</i> , облучение 40сГр	Самки 3,98E-03 (0,00006; 0,00003)
	Самцы 0 (0,0005; 0,00034)
<i>Canton-S</i> в сравнении с <i>Canton-S</i> , облучение 30 Гр	Самки 6,70E-13 (0,00028; 0,00358)
	Самцы 1,86E-21 (0,00051; 0,00974)

Примечание. Для каждой сравниваемой пары линий в скобках приведены значения параметра R , полученные в рамках тестирования гипотез для первого и второго генотипов соответственно.

сравнивалась по кривой выживания в условиях малодозового рентгеновского облучения (40 сГр). Облучение этой же линии в большой дозе (30 Гр) рассматривалось как отрицательный контроль к этому эксперименту. Из табл. можно видеть, что облучение как в дозе 40 сГр, так и в дозе 30 Гр приводит к тому, что гипотеза о постоянном α и разных R получает статистическое подтверждение. В то же время в случае дозы 30 Гр выявляется заметное увеличение R для облученной линии как для самок, так и для самцов. При облучении в дозе 40 сГр виден обратный эффект – малодозовое облучение приводит к уменьшению параметра R в сравнении с необлученным контролем и для самок, и для самцов. Таким образом, радиационный гормезис – это явление, родственное эффекту сверхэкспрессии *D-GADD45* – облучение вызывает увеличение продолжительности жизни через уменьшение значения параметра R.

Хотя точный биологический смысл параметров R и уравнения Гомпертца еще до конца не понят (Olshansky, Carnes, 1997; Sas *et al.*, 2012), тем не менее, возраст начала экспоненциального роста смертности R можно интерпретировать как генетически предопределенный, в то время как возрастную компоненту смертности α – как результат лавинообразного накопления молекулярных и клеточных повреждений в стареющем организме (Гаврилов, Гаврилова, 1991). Если принять эту точку зрения, то полученные в настоящей работе результаты показывают, что найденный ранее эффект увеличения продолжительности жизни под действием сверхэкспрессии гена *D-GADD45* в нервной системе связан с генетически обусловленным увеличением возраста начала процесса старения и не связан с уменьшением лавинообразного накопления клеточных повреждений в стареющем организме (Plyusnina *et al.*, 2011). Исследованный ранее эффект радиационного гормезиса в старении (Moskalev, 2007; Moskalev *et al.*, 2011), как показали настоящие исследования, также связан с увеличением возраста экспоненциального роста смертности от генетически определенных причин. Полученные нами результаты показывают, что оба изученных феномена продления жизни дрозофилы оказались предопределены генетически. С одной стороны, это поднимает вопрос о том, не является ли эта закономерность универсальной для мутаций

дрозофилы, увеличивающих продолжительность жизни. С другой стороны, найденная закономерность позволяет более точно указать «мишень» действия потенциальных геропротекторов – геропротекторы нужно искать среди веществ, уменьшающих параметр R кривой выживания. Заметим, что для измерения этого параметра необходим только начальный участок кривой выживания, т. е. процедура оценки действия вещества на продолжительность жизни может быть технически существенно упрощена.

Исследования поддержаны совместным проектом УрО РАН №12-С-4-1007 «Структурно-функциональная организация хромосом в клеточном цикле» и проектами СО РАН № 81, 82.

ЛИТЕРАТУРА

- Вайсман Н.Я., Евгеньев М.Б., Голубовский М.Д. Параллелизм и парадоксальность действия на жизнеспособность и продолжительность жизни мутаций регулятора белков теплового шока *hsf1* и онкосупрессора *l(2)gl* у *Drosophila melanogaster* // Изв. РАН. Сер. биол. 2012. № 1. С. 27–34.
- Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Биология продолжительности жизни. М.: Наука, 1991. 280 с.
- Amrit F.R., Boehnisch C.M., May R.C. Phenotypic covariance of longevity, immunity and stress resistance in the *Caenorhabditis nematodes* // PLoS ONE. 2010. V. 5. No. 4. P. e9978.
- Arking R., Burde V., Graves K. *et al.* Forward and reverse selection for longevity in *Drosophila* is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns // Exp. Gerontol. 2000. V. 35. No. 2. P. 167–185.
- Duan J., Zhang Z., Tong T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2005. V. 37. No. 7. P. 1407–1420.
- Giannakou M.E., Goss M., Junger M.A. *et al.* Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body // Science. 2004. V. 305. No. 5682. P. 361.
- Harshman L.G., Moore K.M., Sty M.A. *et al.* Stress resistance and longevity in selected lines of *Drosophila melanogaster* // Neurobiol. Aging. 1999. V. 20. No. 5. P. 521–529.
- Johnson T.E., de Castro E., Hegi de Castro S. *et al.* Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans* // Exp. Gerontol. 2001. V. 36. No. 10. P. 1609–1617.
- Kirkwood T.B. Understanding the odd science of aging // Cell. 2005. V. 120. No. 4. P. 437–447.
- Lee B., Morano A., Porcellini A. *et al.* GADD45 α inhibition of DNMT1 dependent DNA methylation during homology directed DNA repair // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. No. 6. P. 2481–2493.
- Lewis K.N., Mele J., Hornsby P.J. *et al.* Stress resistance in

- the naked mole-rat: the bare essentials – a mini-review // *Gerontology*. 2012. V. 58. No. 5. P. 453–462.
- Migliaccio E., Giorgio M., Mele S. *et al.* The p66^{shc} adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals // *Nature*. 1999. V. 402. No. 6759. P. 309–313.
- Moskalev A. Radiation-induced life span alteration of *Drosophila* lines with genotype differences // *Biogerontol.* 2007. V. 8. No. 5. P. 499–504.
- Moskalev A.A., Plyusnina E.N., Shaposhnikov M.V. Radiation hormesis and radioadaptive response in *Drosophila melanogaster* flies with different genetic backgrounds: the role of cellular stress-resistance mechanisms // *Biogerontol.* 2011. V. 12. No. 3. P. 253–263.
- Moskalev A., Plyusnina E., Shaposhnikov M. *et al.* The role of *D-GADD45* in oxidative, thermal and genotoxic stress resistance // *Cell Cycle*. 2012a. V. 11. No. 22. P. 4222–4241.
- Moskalev A.A., Shaposhnikov M.V., Plyusnina E.N. *et al.* The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria // *Ageing Res. Rev.* 2013. V. 12. No. 2. P. 661–84.
- Moskalev A.A., Smit-McBride Z., Shaposhnikov M.V. *et al.* Gadd45 proteins: relevance to aging, longevity and age-related pathologies // *Ageing Res. Rev.* 2012b. V. 11. No. 1. P. 51–66.
- Olshansky S.J., Carnes B.A. Ever since Gompertz // *Demography*. 1997. V. 34. No. 1. P. 1–15.
- Orr W.C., Sohal R.S. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* // *Science*. 1994. V. 263. No. 5150. P. 1128–1130.
- Peretz G., Bakhrat A., Abdu U. Expression of the *Drosophila melanogaster* GADD45 homolog (CG11086) affects egg asymmetric development that is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway // *Genetics*. 2007. V. 177. No. 3. P. 1691–1702.
- Plyusnina E.N., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. Increase of *Drosophila melanogaster* lifespan due to *D-GADD45* overexpression in the nervous system // *Biogerontol.* 2011. V. 12. No. 3. P. 211–226.
- Rajpathak S.N., Liu Y., Ben-David O. *et al.* Lifestyle factors of people with exceptional longevity // *J. Am. Geriatr. Soc.* 2011. V. 59. No. 8. P. 1509–1512.
- Rattan S.I. Hormetic modulation of aging and longevity by mild heat stress // *Dose Response*. 2005. V. 3. No. 4. P. 533–546.
- Salmon A.B., Leonard S., Masamsetti V. *et al.* The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis // *FASEB J.* 2009. V. 23. No. 7. P. 2317–2326.
- Sas A.A., Snieder H., Korf J. Gompertz' survivorship law as an intrinsic principle of aging // *Med. Hypotheses*. 2012. V. 78. No. 5. P. 659–663.
- Semenchenko G.V., Khazaeli A.A., Curtsinger J.W. *et al.* Stress resistance declines with age: analysis of data from a survival experiment with *Drosophila melanogaster* // *Biogerontol.* 2004. V. 5. No. 1. P. 17–30.
- Smith M.L., Chen I.T., Zhan Q. *et al.* Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen // *Science*. 1994. V. 266. No. 5189. P. 1376–1380.
- Vermeulen C.J., Van De Zande L., Bijlsma R. Resistance to oxidative stress induced by paraquat correlates well with both decreased and increased lifespan in *Drosophila melanogaster* // *Biogerontol.* 2005. V. 6. No. 6. P. 387–395.
- Zhao Y., Sun H., Lu J. *et al.* Lifespan extension and elevated *hsp* gene expression in *Drosophila* caused by histone deacetylase inhibitors // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. No. Pt 4. P. 697–705.

SURVIVAL CURVE ANALYSIS FOR *DROSOPHILA MELANOGASTER* WITH *D-GADD45* OVEREXPRESSION IN THE NERVOUS SYSTEM

E.N. Plyusnina^{1,2}, M.V. Shaposhnikov^{1,2}, E.N. Andreeva³,
A.A. Moskalev^{1,2,4}, L.V. Omelyanchuk³

¹ Institute of Biology, Komi Center of UB RAS, Syktivkar, Russia, e-mail: ome@mcb.nsc.ru;

² Syktivkar State University, Russia;

³ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia;

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology, Russia

Summary

Overexpression of the *Gadd45* gene in the nervous system of *Drosophila melanogaster* increases the life span. We have performed the Gompertz approximation of the survival curve and revealed a life span increase as a result of decrease of the R parameter, reflecting the death level at the beginning of adult life, whereas the other Gompertz parameter, α , responsible for final stage of the life, does not change essentially. In addition, we have analyzed the case of radiation hormesis (low doses of radiation increase life span) and found a similar effect. We conclude that it is promising to perform geroprotector screen by testing substances for the ability to decrease R. Its measurement is less labor-consuming than the construction of the complete survival curve.

Key words: longevity, DNA repair, *GADD45*, overexpression, low radiation doses, hormesis, *Drosophila melanogaster*.