

УДК 577.2

ДИСФУНКЦИЯ ЛАМИНА В И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СТАРЕНИЕ ПРИВОДЯТ К ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ТЕЛОМЕР В ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *Drosophila*

© 2022 В.В. Моргунова^{1#}, О.А. Соколова^{1#}, Т.В. Сизова¹, Л.Г. Малаев^{1,2},
Д.С. Бабаев^{1,2}, Д.А. Квон³, А.И. Калмыкова^{1*}

¹ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия; электронная почта: allakalm@img.ras.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биотехнологии, 119991 Москва, Россия

³ Центр геномных исследований Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.09.2022

После доработки 31.10.2022

Принята к публикации 14.11.2022

Пространственная организация хроматина в ядре имеет важное значение в функционировании генома и регуляции активности генов. Ядерная ламина и белки ламин, ассоциированные с ней, играют ключевую роль в этом процессе, а нарушение функций ламин приводит к декомпактизации и транскрипционной активации гетерохроматина, что связывают с синдромом преждевременного старения. Теломеры в норме расположены на периферии ядра во многих типах клеток, а ядерная ламина обеспечивает репликацию и стабильность теломер. Более того, заболевания, связанные с дефектами ламин и теломер, имеют похожие проявления и напоминают физиологические признаки старения. Особенно важно понимание динамики молекулярных изменений, связанных со старением, на организменном уровне. Целью работы было сравнить эффекты, вызванные мутацией ламина В и процессом физиологического старения в герминальных тканях модельного организма *Drosophila melanogaster*. Мы показали, что нарушение локализации ламина В приводит к декомпактизации гетерохроматина и активации транскрипции некоторых мобильных элементов и теломерных повторов. Кроме того, в клетках зародышевого пути у мутантов по ламину В наблюдались повреждения ДНК и появление признаков гомологичной рекомбинации в теломерах. Нарушение стабильности гетерохроматина, богатого повторами, может быть напрямую связано с дестабилизацией генома, гибелью герминальных клеток и стерильностью, наблюдаемых у исследуемых мутантов ламина В. В процессе физиологического старения дрозофилы наблюдаются сходные явления в герминальных клетках, что указывает на тесную связь механизмов поддержания целостности гетерохроматина на периферии ядра с механизмами старения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ламин В, теломеры, старение, герминальные клетки, гетерохроматин, ретротранспозоны, транскрипция, рекомбинация, Rad51, γH2Av, *Drosophila*.

DOI: 10.31857/S0320972522120144, EDN: NHJKN1

ВВЕДЕНИЕ

Процесс старения клеток на молекулярном уровне ассоциирован с декомпактизацией гетерохроматина, активацией транскрипции в норме молчащих геномных повторов и нарушением гомеостаза теломер [1]. Аналогичные

признаки характерны для клеток с нарушениями функций белков ламин, ассоциированных с ядерной оболочкой. Такое наблюдение привело к появлению концепции о ламинопатии как ключевом процессе старения клетки [2]. На периферии ядра происходят важные процессы, обеспечивающие стабильность генома.

Принятые сокращения: ChIP – иммунопреципитация хроматина; RT – обратная транскрипция; qPCR – количественная ПЦР; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; TUNEL – внесение концевой метки dUTP с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы; H3K9me3 – триметилированная форма лизина 9 гистона 3.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

В первую очередь это поддержание гомеостаза гетерохроматина, насыщенного повторами различной природы и потому склонного к эктопической рекомбинации. Ассоциация гетерохроматина с ядерной ламиной поддерживает его компактную структуру и обеспечивает рекомбинационную стабильность [3]. Экспериментальные факты, полученные в основном на клеточных моделях, подкрепляют важную роль белков ламин в процессе старения и онкогенеза [4]. В процессе клеточного старения в сенесцентных клетках наблюдаются изменения структуры хроматина, перераспределение ламина-ассоциированных доменов (ЛАД), активация транскрипции гетерохроматиновых повторов и дисфункция теломер [5, 6]. Нарушения функций ламин приводят к сходным явлениям [7, 8]. Однако причинно-следственные связи таких сложных процессов, как старение и ламинопатия, пока остаются далёкими от понимания.

Ламины являются структурными белками, ассоциированными с ядерной оболочкой, и участвуют в таких важных процессах, как поддержание ядерной архитектуры, репликация и репарация ДНК, регуляция транскрипции [9]. Существует два основных типа ламин: ламин А/С и ламин В. Ламин А локализуется как на ядерной оболочке, так и в нуклеоплазме, а ламин В-типа находится исключительно на периферии ядра. Оба типа ламин участвуют в прикреплении к ядерной оболочке ЛАД, что лежит в основе организации ядерной архитектуры [10]. Нокдаун обоих типов ламин в клетках дрозофилы вызывал глобальные изменения в укладке хроматина – компактизацию эухроматина и разрыхление гетерохроматина [11]. Дисфункция ламин ведёт не только к структурным перестройкам генома, но и к нарушениям процессов репликации и репарации на периферии ядра [5, 12-14]. Мутация гена *LMNA* человека, кодирующего ламин А, и приводящая к образованию усечённой формы ламина, вызывает ускоренное старение – прогерия Хатчинсона – Гилфорда. Это заболевание сопровождается нарушениями экспрессии генов [15] и укорочением теломер [16]. Ламин В играет ключевую роль в обеспечении гомеостаза гетерохроматина, а нарушение взаимодействия ламина В с гетерохроматиновыми участками тесно связано с переходом клеток в состояние сенесценции или клеточного старения [17]. Теломеры также представляют собой гетерохроматиновые домены с преимущественным расположением вблизи ядерной оболочки в клетках дрожжей и млекопитающих [18]. Теломерные белки млекопитающих

физически взаимодействуют с ламинами, которые обеспечивают локализацию теломер на периферии ядра и влияют на репарацию, репликацию и транскрипцию теломер [2, 18]. Более того, заболевания, вызванные дефектами ламин или теломер, имеют похожие проявления и напоминают признаки преждевременного старения [19].

Можно ли рассматривать мутантов по ламинам у модельных объектов как модель старения на организменном уровне? Для ответа на этот вопрос необходимо выявить ключевые молекулярные процессы, ассоциированные с мутациями ламин, и сравнить их с процессами, происходящими при физиологическом старении на уровне организма. Такой подход позволит найти новые диагностические маркеры старения и, возможно, метаболические пути, воздействие на которые позволит предотвратить преждевременное старение. Исследования на модельном объекте *Drosophila melanogaster* показали, что как при старении, так и при мутациях ламина В происходит декомпактизация гетерохроматина и активация мобильных элементов в соматических тканях [20, 21]. Различные воздействия, которые подавляют активность транспозонов и поддерживают гетерохроматин, приводят к увеличению продолжительности жизни, что служит аргументом в пользу ретротранспозонной теории старения [22]. Повреждения ДНК также наблюдаются как при старении, так и у ламиновых мутантов дрозофилы [20]. Несмотря на отсутствие полного понимания механизмов старения, очевидно, что дестабилизация гетерохроматиновой части генома, связанной с ядерной периферией, является одним из важных признаков старения.

Исследования на *D. melanogaster* выявили интересный факт: ноль-мутанты ламина В жизнеспособны, но стерильны [23], что указывает на его важную роль в процессе гаметогенеза. В данной работе мы охарактеризовали влияние мутации ламина В на структуру хроматина клеток зародышевой линии *D. melanogaster*. Мы показали, что нарушение локализации ламина В в ядре приводит к активации экспрессии некоторых ретротранспозонов и теломерных повторов в герминальных клетках, а также к повышенному уровню гомологичной рекомбинации в теломерах. Сходные явления наблюдаются при физиологическом старении в зародышевой линии дрозофилы, что указывает на тесную связь процессов, происходящих в гетерохроматине на периферии ядра, с механизмами старения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *D. melanogaster*. В работе использована линия с мутацией ламина В *Lam^{A25}pr¹/CyO* (коллекция линий дрозофилы Bloomington Drosophila Stock Center, BDSC, США, № 25092). Мутация вызвана сдвигом рамки считывания на С-конце и удалением СaaX-мотива. Линия *iso-1 (y¹; cn¹ bw¹ sp¹)* — это изогенизированная линия, использованная для секвенирования генома дрозофилы (коллекция BDSC, № 2057).

Вестерн-блот анализ и иммуоокрашивание.

Для вестерн-блот анализа тотальные экстракты яичников разделяли в 8%-ном ПААГ и переносили на мембрану Immobilon-P («Merck Millipore», США). Визуализация сигнала проводилась с помощью системы Immun-Star AP detection system («Bio-Rad», США). Иммуоокрашивание тканей проводилось, как описано ранее [24]. В работе использовали следующие первичные антитела: анти- γ -тубулин («Sigma», США), анти-Lamin C (LC28.26, «Developmental Studies Hybridoma Bank», DSHB, США), анти-Lamin B (ADL84.12, DSHB), анти-НОАР [25], анти- γ H2Av («Rockland», США), анти-Rad51 («GeneTex», США). Использовали вторичные антитела с минимальной перекрёстной реактивностью к IgG других видов, конъюгированные с Alexa Fluor («Jackson ImmunoResearch», США, разведение 1 : 500). ДНК окрашена DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндо́л). Окраску яичников методом внесения концевой метки dUTP с помощью терминальной дезокси-синуклеотидилтрансферазы (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) проводили согласно протоколу производителя (Click-iT™ TUNEL Alexa Fluor Imaging, «Invitrogen», США). Иммуофлуоресцентные изображения были получены на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 900 («ZEISS», Германия). Z-Стеки были сделаны с шагом 0,5 мкм. Обработка снимков проводилась с использованием программы ImageJ. Для оценки колокализации сигналов γ H2Av и Rad51 с теломерным белком НОАР было проанализировано 30–40 ядер из двух независимых образцов. Программная деконволюция была выполнена для оптических срезов на разных уровнях по оси z. Колокализация была оценена программным обеспечением ImageJ с использованием плагина Colocalization. Порог перекрытия был установлен в размере 3 пикселя. Для статистической обработки и построения графиков использовалась программа GraphPad Prism 5.0 («GraphPad Software», США, <https://www.graphpad.com>); попарное сравнение проводилось согласно U-тесту Манна – Уитни.

Обратная транскрипция (RT) и количественная ПЦР (qPCR). Тотальную РНК выделяли из яичников дрозофилы с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). RT проводилась с 6-нуклеотидным праймером случайной последовательности и ревертазой М-MuLV («Биолабмикс», Россия). qPCR проводилась на приборе LightCycler 96 («Roche», Швейцария), цифровая ПЦР (dPCR) — на приборе QIAcuity Digital PCR System («Qiagen», США). Ген-специфичные праймеры, использованные для qPCR:

- *rp49*
5'-ATGACCATCCGCCCAGCATAC-3',
5'-GCTTAGCATATCGATCCGACTGG-3';
- *Pgd*
5'-CCAGAAGGGCACGGGCAA-3',
5'-CAGGGCAGACAGGCATCGC-3';
- *HeT-A ORF*
5'-GGAGTGATGAGCGGCGGAAA-3',
5'-CCAGGCAAGCGGACAAACGA-3';
- *HeT-A promoter*
5'-ACCACGCCCAACCCCAA-3',
5'-GCTGGTGGAGGTACGGAGACAG-3';
- *TART-B*
5'-CACACCCACACAATATAACGACA-3',
5'-CTGATTCGCTTGTGAATTGC-3';
- *GATE*
5'-CATCACACGTTGTTGCACCGA-3',
5'-GCACTGCCAAGAAGGATAGCTCT-3';
- *light*
5'-GAAAGATCAAAATGGGACAGA-3',
5'-TGAGCATAGTTGTTCTCGTAGGA-3';
- *copia*
5'-CGACAGTGTGGAGGTTGTGCC-3',
5'-CTTGAGACGCTTTACGGACAT-3';
- *1731*
5'-ATGTTTGTGGAAGGTGGTTTCAGG-3',
5'-GCTTTTTCATCTTGGGATTGCC-3';
- *60D*
5'-CCAGCCGAGACGAGCACCATAT-3',
5'-TTCCCATCCTCGAGCCCTG-3';
- *42AB*
5'-CGTCCCAGCCTACCTAGTCA-3',
5'-ACTTCCCGGTGAAGACTCCT-3';
- *38C1*
5'-GATACTGGTTCTACGGTGCGAAAAAC-3',
5'-GTGCTTGTGTGCTGTGTGAG-3'.

Рассчитывали стандартную ошибку среднего (SEM) для трёх биологических реплик. Статистическая достоверность проверялась с помощью *t*-критерия Стьюдента (* $p < 0,05$ —0,01, ** $p < 0,01$ —0,001, *** $p < 0,001$).

Иммунопреципитация хроматина (ChIP).

ChIP проводили в соответствии с ранее опубликованным протоколом [26]. Хроматин, полученный из яичников дрозофилы, преци-

питировали с антителами против гистона H3, триметилированного по Lys9 (07-523, «Merck», Германия). Праймеры, использованные в ChIP-qPCR, перечислены в предыдущем разделе. qPCR проводили с помощью прибора LightCycler 96 («Roche»). Обогащения при иммунопреципитации хроматина рассчитаны как проценты от исходного образца. Рассчитывали SEM для трёх биологических реплик. Статистическая достоверность проверялась с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В мутантах *Lam*^{A25} происходят гибель герминальных клеток и нарушения оогенеза. В геноме дрозофилы присутствуют два гена ламина

нов, *LamC*, кодирующий ламин типа А/С, и *Lam* или *Dm0*, кодирующий ламин В. Для ламинов характерно наличие С-концевого мотива СааХ, который необходим для локализации белков на внутренней поверхности ядерной мембраны [27]. Мутация *Lam*^{A25} вызвана сдвигом рамки трансляции на С-конце; это не влияет заметно на размер белка, но нарушает СааХ-бокс, что приводит к делокализации мутантного ламина В в соматических клетках [28]. В нейрональных тканях мутантов *Lam*^{A25} наблюдали повреждение ДНК и гибель нейронов [29]. Жизнеспособные мутанты ламина В, в том числе *Lam*^{A25}, развиваются до стадии имаго, но стерильны [23, 28]. Мы показали, что яичники *Lam*^{A25} значительно редуцированы по сравнению с нормой, а процесс оогенеза останавливается на средних стадиях (рис. 1, а).

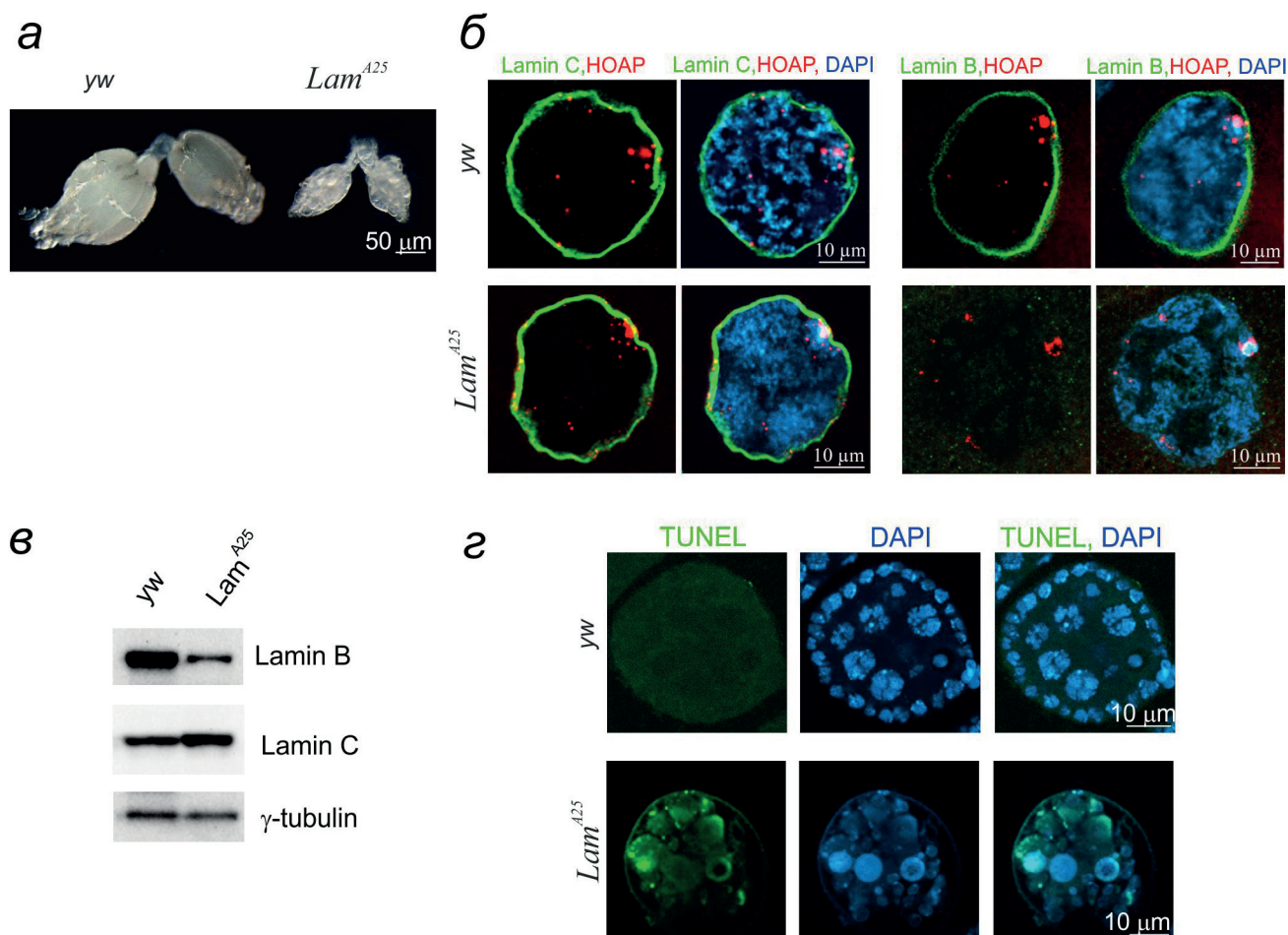


Рис. 1. Мутация ламина В *Lam*^{A25} приводит к нарушениям оогенеза у *Drosophila*. а – Общий вид яичников контрольной линии *yw* и мутантной *Lam*^{A25}. б – В линии *Lam*^{A25} наблюдается отсутствие ламина В на ядерной оболочке питающих клеток. Иммуноокрашивание яичников с использованием антител к теломерному белку HOAP (красный цвет), ламинам С и В (зелёный цвет). ДНК окрашена DAPI (синий цвет). в – Вестерн-блот анализ экстрактов яичников линии *yw* и *Lam*^{A25} с использованием антител к ламину В, ламину С и γ -тубулину в качестве контроля нанесения. г – Детекция фрагментированной ДНК с помощью TUNEL (зелёный цвет) выявляет гибель герминальных клеток и дегенерацию яйцевых камер в яичниках у мутантов *Lam*^{A25} по сравнению с контрольной линией *yw*. Показаны яйцевые камеры на 4 стадии оогенеза

Иммуноокрашивание яичников с помощью антител к N-концу ламина В выявляет очень слабые сигналы мутантного белка в нуклеоплазме питающих клеток, в то время как ламин С остаётся на ядерной мембране (рис. 1, б). Вестерн-блот анализ показал снижение количества ламина В в яичниках мутантов *Lam^{A25}*, что указывает не только на его делокализацию, но и дестабилизацию, и совпадает с наблюдениями по иммуноокрашиванию белков (рис. 1, б, в). Иммуноокрашивание теломер-специфичного белка НОАР показывает, что преимущественная локализация теломер на периферии ядра не изменилась в мутантах *Lam^{A25}* по сравнению с нормой (рис. 1, б). Здесь необходимо отметить, что исследуемые в работе герминальные питающие клетки яичника имеют полиплоидный геном, но низкий уровень политении, в результате чего теломерных сигналов детектируется гораздо больше, чем число хромосомных плеч. При этом на периферии ядра чётко выделяется крупный кластер теломер, скорее всего, принадлежащих гетерохроматиновым плечам хромосом. Окраска яичников методом TUNEL, который детектирует фрагментацию ДНК, выявила TUNEL-положительные клетки в мутантах *Lam^{A25}*; при этом наблюдалась дегенерация целых яйцевых камер – морфологических структур, где проходит оогенез (рис. 1, г). Таким образом, делокализация и дестабилизация ламина В вызывает ускоренную гибель герминальных клеток и нарушения оогенеза.

В яичниках мутантов *Lam^{A25}* снижается компактизация геномных повторов и увеличивается экспрессия ретротранспозонов и теломерных повторов. Чтобы выяснить, происходит ли изменение структуры хроматина в яичниках мутантов *Lam^{A25}*, был проведён анализ хроматина методом ChIP-qPCR с использованием антител к модификации гистона H3K9me3, ассоциированной с неактивным хроматином. Наблюдается достоверное снижение гетерохроматиновой метки H3K9me3 на некоторых ретротранспозонах и в гетерохроматиновых локусах *light*, *42AB*, *38C1*, что указывает на декомпактизацию гетерохроматина (рис. 2, а).

Теломеры дрозофилы поддерживаются за счёт ретротранспозиций на концы хромосом специализированных теломерных ретротранспозонов, основными из которых являются *HeT-A* и *TART* [30]. Несмотря на отсутствие теломеразы, многие компоненты и молекулярные механизмы регуляции биогенеза теломер дрозофилы сходны с таковыми у видов, использующих теломеразу [31]. В том числе,

для теломер характерна локализация на периферии ядра и гетерохроматиновая структура [32]. У мутантов *Lam^{A25}* наблюдается снижение H3K9me3 на теломерных повторах *HeT-A* и *TART* (рис. 2, а). Таким образом, делокализация ламина В приводит к нарушению структуры гетерохроматина, в том числе и теломерного гетерохроматина, в яичниках дрозофилы.

Затем мы проверили, меняется ли уровень транскрипции в тех районах, в которых наблюдается изменение состояния хроматина. Сравнение гомо- и гетерозиготных особей, несущих мутацию *Lam^{A25}*, позволяет максимально уменьшить влияние генетического фона и связанных с ним различий в числе копий мобильных элементов и теломерных повторов. С помощью RT-qPCR было показано, что происходит умеренное, но достоверное увеличение количества РНК некоторых ретротранспозонов и теломерных повторов в яичниках мутантов *Lam^{A25}* (рис. 2, б). Для подтверждения дерепрессии теломерных повторов был проведён более чувствительный анализ экспрессии с помощью обратной транскрипции, совмещённой с цифровой ПЦР, RT-dPCR, при этом использовался другой контроль для нормировки образцов. Такая дополнительная проверка подтвердила, что, действительно, происходит увеличение количества РНК теломерных повторов *HeT-A* и *TART* в яичниках мутантов *Lam^{A25}* (рис. 2, в).

В мутантах *Lam^{A25}* наблюдается повреждение ДНК и появление маркеров гомологичной рекомбинации на периферии ядер герминальных клеток яичника. В норме теломеры дрозофилы преимущественно расположены на периферии ядер полиплоидных питающих клеток яичников [32]. Особенно крупное скопление теломер наблюдается вблизи ядерной ламины питающих клеток в большом кластере гетерохроматина, для которого характерна более яркая окраска DAPI (рис. 1, 2). С помощью иммуноокрашивания фосфорилированной формы гистона H2Av (γ H2Av) – маркера двунитевых разрывов ДНК и репликативного стресса – мы оценили, как влияет мутация *Lam^{A25}* на стабильность теломер и генома в целом в ядрах питающих клеток яичников. В мутантных яичниках *Lam^{A25}* наблюдается появление фокусов γ H2Av, особенно хорошо заметных на периферии ядра. Часть сигналов НОАР – белка теломерного защитного комплекса – пересекается с сигналами γ H2Av, что говорит о повреждении теломерной ДНК или нарушении теломерного защитного комплекса (рис. 2, г).

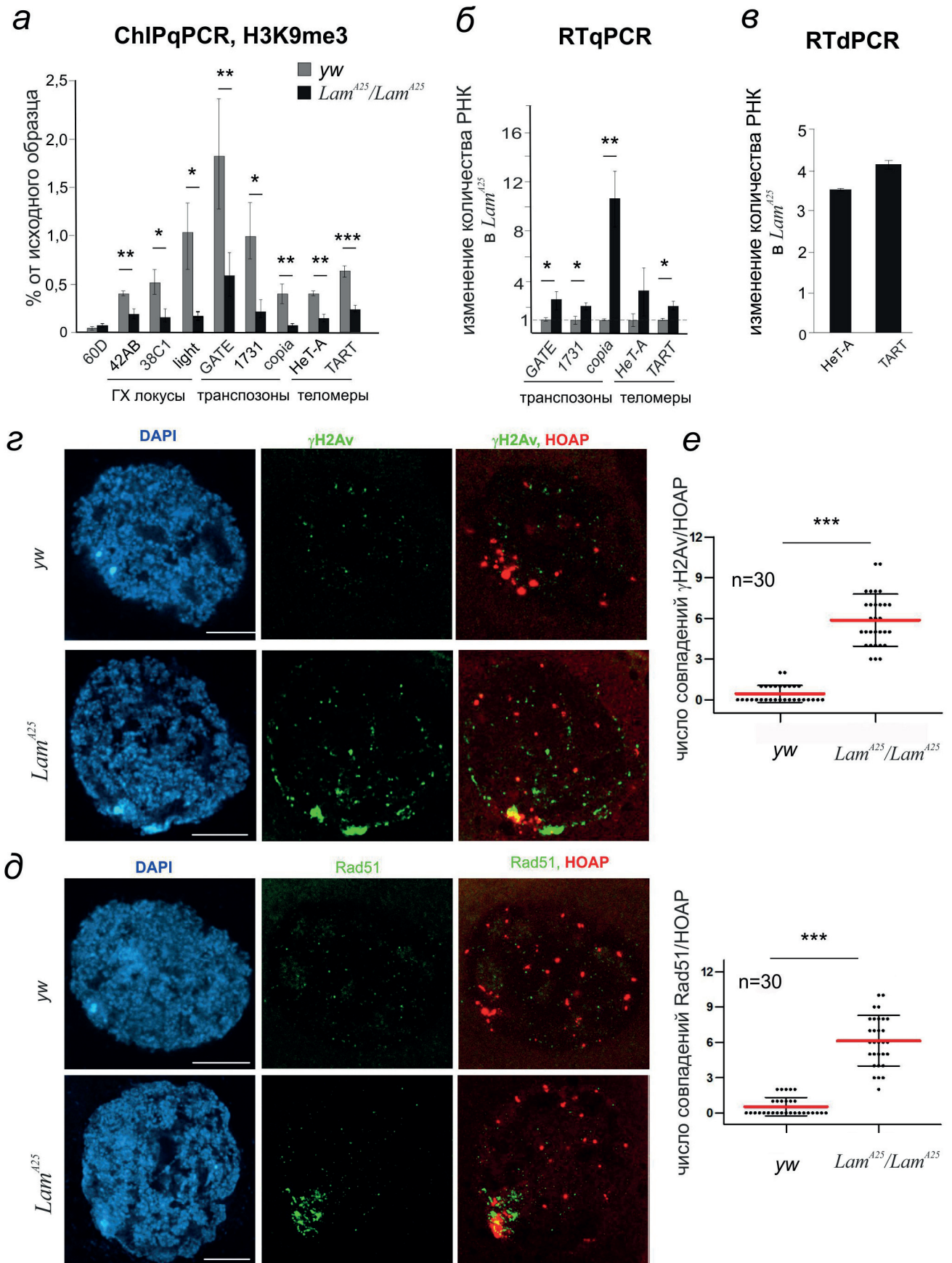


Рис. 2. См. подпись на стр. 1978

Рис. 2. Мутация ламина В оказывает влияние на гетерохроматиновые локусы, ретротранспозоны и теломеры. *a* – ChIP на яичниках контрольной (*uw*) и мутантной (*Lam^{A25}*) линий *D. melanogaster* с антителами к H3K9me3 выявляет изменения состояния хроматина теломерных повторов, ретротранспозонов и гетерохроматиновых (ГХ) локусов. Эухроматиновый локус *60D* использован как отрицательный контроль. Обогащения после ChIP рассчитаны как проценты от исходного образца. *б* – Сравнение количества транскриптов ретротранспозонов и теломерных повторов *HeT-A* и *TART* с помощью RT-qPCR в тотальной РНК, выделенной из яичников *Lam^{A25}* и содержащей мутацию в гетерозиготном (*Lam^{A25}/+*) или гомозиготном (*Lam^{A25}/Lam^{A25}*) состоянии. Нормировка образцов была проведена на количество транскриптов гена домашнего хозяйства *rp49*. SEM посчитана для трёх независимых опытов. Звёздочки обозначают статистическую достоверность (* $p < 0,05$ – $0,01$, ** $p < 0,01$ – $0,001$, *** $p < 0,001$). *в* – Изменение количества транскриптов (число раз) теломерных повторов *HeT-A* и *TART* измерено с помощью RT-dPCR в яичниках гомозигот *Lam^{A25}/Lam^{A25}* относительно гетерозигот *Lam^{A25}/+*. Нормировка образцов была проведена на количество транскриптов гена домашнего хозяйства *Pgd*. Стандартное отклонение посчитано для 3 технических реплик. *г* – Иммуноокрашивание яичников с использованием антител к теломерному белку НОАР (красный цвет) и маркеру повреждения ДНК – γ H2Av (зелёный цвет). В ядрах питающих клеток яичника линии *Lam^{A25}* наблюдается появление фокусов γ H2Av в гетерохроматине и в теломерах. Шкала 10 мкм. *д* – Иммуноокрашивание яичников с использованием антител к теломерному белку НОАР (красный цвет) и рекомбиназе Rad51 (зелёный цвет). В ядрах питающих клеток яичника линии *Lam^{A25}* наблюдается активация рекомбинации в гетерохроматиновом блоке и в теломерах. ДНК окрашена DAPI (синий цвет). Шкала 10 мкм. *е* – Статистический анализ колокализации белков γ H2Av или Rad51 с теломерным белком НОАР. *** $p < 0,0001$

Белок Rad51 является маркером рекомбинации и взаимодействует с однонитевой ДНК на стадии инвазии нити в процессе гомологичной рекомбинации. В клетках *Drosophila* активность Rad51 блокирована в гетерохроматиновых доменах, насыщенных повторами, для предотвращения эктопической рекомбинации [3]. В норме иммуноокрашивание Rad51 практически не выявляет сигналов, в то время как в мутантах *Lam^{A25}* появляются крупные скопления Rad51 на периферии ядер питающих клеток. Особенно сильное окрашивание наблюдается в области кластера гетерохроматина, отличающегося яркой окраской по DAPI (рис. 2, *д*). Сигналы теломерного белка НОАР в этой области перекрываются с сигналами Rad51. Статистический анализ колокализации белков γ H2Av или Rad51 с теломерным белком НОАР выявил достоверное увеличение числа таких пересечений у мутантов *Lam^{A25}* по сравнению с контролем (рис. 2, *е*). В совокупности наши данные показывают, что мутация *Lam^{A25}* нарушает гомеостаз на периферии ядра, что приводит к декомпактизации гетерохроматина, активации транскрипции и процесса гомологичной рекомбинации, что угрожает целостности генома и приводит к гибели герминальных клеток.

В результате старения дрозофилы увеличивается экспрессия мобильных элементов и теломерных повторов, и появляются признаки гомологичной рекомбинации в гетерохроматине герминальных клеток яичника. Ранее было показано, что потеря репрессивных меток хроматина, ведущих к активации транскрипции ретротранспозонов, наблюдалась во время старения у дрожжей и мух [33, 34]. Мы решили проверить, как меняется состояние хроматина и транскрипция теломерных повторов и ретротранспозонов в герминальных тканях дрозофилы в результате старения. Средняя продол-

жительность жизни *D. melanogaster* в природных популяциях составляет 55 дней [35]. Мы проводили исследование на изогенизированной линии *iso-1*, геном которой был секвенирован и аннотирован. Анализ хроматина методом ChIP-qPCR с использованием антител к модификации гистона H3K9me3 выявляет достоверное снижение этой гетерохроматиновой метки на теломерных повторах в яичниках 50-дневных мух (рис. 3, *а*). Количество транскриптов теломерных повторов *HeT-A* и *TART*, а также некоторых ретротранспозонов достоверно увеличивается в яичниках 50-дневных мух по сравнению с 3-дневными (рис. 3, *б*). Эти результаты показывают, что при старении происходит декомпактизация хроматина и активация транскрипции ретротранспозонов и теломерных повторов в яичниках *D. melanogaster*. Стоит отметить, что количественный уровень изменений сопоставим с теми, которые наблюдаются в мутантах *Lam^{A25}*.

Иммуноокрашивание яичников 3-дневных самок практически не выявляет сигналов γ H2Av и Rad51, в то время как у 50-дневных самок появляются многочисленные сигналы γ H2Av, маркера повреждений ДНК, в ядрах питающих клеток, преимущественно на периферии ядер; некоторые сигналы γ H2Av пересекаются с теломерным белком НОАР (рис. 3, *в*, *д*). Яркое иммуноокрашивание рекомбиназы Rad51 наблюдается в области гетерохроматина и в теломерах у 50-дневных самок (рис. 3, *г*, *д*). Окрашивание яичников с помощью метода TUNEL выявляет гибель герминальных клеток у самок 50-дневного возраста (рис. 3, *е*).

Таким образом, при физиологическом старении в герминальных клетках происходят изменения гетерохроматина на периферии ядра, поразительно сходные с теми, которые мы наблюдаем у мутантов *Lam^{A25}* с нарушенной локализацией ламина В.

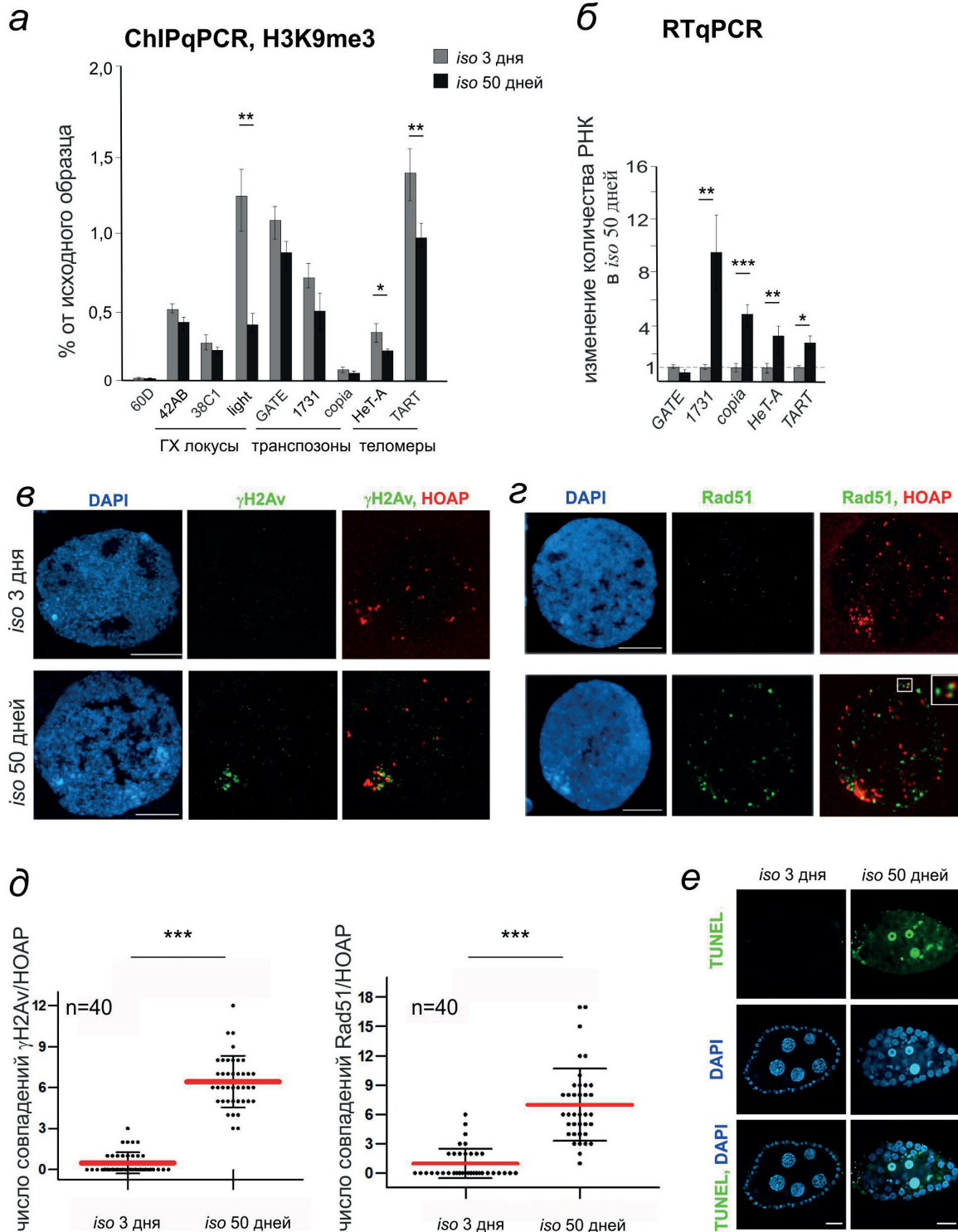


Рис. 3. В результате старения дрозофилы в герминальных клетках яичников активируется экспрессия ретротранспозонов и теломерных повторов, а также появляются повреждения ДНК и признаки гомологичной рекомбинации в гетерохроматине. *а* – ChIP на яичниках 3-дневных и 50-дневных самок *D. melanogaster* линии *iso-1* с антителами к H3K9me3 выявляет изменения состояния хроматина теломерных повторов, ретротранспозонов и гетерохроматиновых (ГХ) локусов. *б* – Сравнение количества транскриптов ретротранспозонов и теломерных повторов с помощью RT-qPCR в тотальной РНК, выделенной из яичников 3-дневных и 50-дневных самок *D. melanogaster* линии *iso-1*. *в, з* – Иммуноокрашивание яичников 3-дневных и 50-дневных самок дрозофилы с использованием антител к теломерному белку HOAP (красный цвет) и γ H2Av (зеленый цвет) (*в*) или рекомбиназе Rad51 (зеленый цвет) (*з*). В ядрах питающих клеток 50-дневных самок наблюдаются сигналы гомологичной рекомбинации в теломерах и повреждения ДНК на периферии ядра и в теломерах. ДНК окрашена с помощью DAPI (синий цвет). *д* – Статистический анализ колокализации белков γ H2Av или Rad51 с теломерным белком HOAP. *** $p < 0,0001$. *е* – Окрашивание яичников с помощью метода TUNEL (зеленый цвет) выявляет гибель герминальных клеток у самок 50-дневного возраста по сравнению с 3-дневными. Показаны яйцевые камеры на 6 стадии оогенеза. Шкала 10 мкм (*в, з, е*)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С понятием ламинопатии в основном связывают мутации ламина А, которые приводят к изменениям укладки хроматина, нарушению процессов репликации и репарации, а также к дисфункции теломер [5, 13, 18]. Во многих организмах ламин В выполняет сходные функции и играет особую роль в функционировании нейронов [8, 36]. Скорее всего, присутствие нескольких типов ламин со схожими свойствами может компенсировать дисфункцию одного из вариантов, но в то же время наблюдается клеточная и функциональная специализация разных ламин. Многочисленные данные указывают на важнейшую роль ламина В в процессе старения. С возрастом происходит постепенное снижение уровня ламина В за счёт его дестабилизации [37, 38], что является причиной нейродегенерации и нарушений иммунной системы у дрозофилы [38, 39]. Кроме того, на клетках млекопитающих было показано, что количество ламина В1 резко снижается в сенесцентных клетках [40-42], что делает его важным маркером клеточного старения. Тот факт, что мутации пролил-изомеразы PIN1 (белок Dodo у *Drosophila*), необходимой для поддержания структуры ламина В, дестабилизируют гетерохроматин, подчёркивает важность структурной целостности ламина В в поддержании структуры гетерохроматина [43]. В данной работе мы использовали мутацию ламина В, которая нарушает локализацию белка на ядерной оболочке. При этом происходит снижение уровня белка, что говорит о его дестабилизации, которая также наблюдается в процессе старения [38]. Мутанты *Lam*^{A25}, у которых изменена локализация и уровень ламина В, являются перспективной моделью для изучения механизмов старения на организменном уровне. Стоит отметить, что мутанты *Lam*^{A25}, как и другие жизнеспособные мутанты ламина В, развиваются до взрослого состояния, но стерильны [23, 28]. Это говорит о том, что контроль целостности генома в процессе гаметогенеза является наиболее жёстким, что обеспечивает стабильность генетической информации в ряду поколений.

На данной модели мы исследовали изменения, происходящие в ядрах питающих клеток зародышевого пути. Несмотря на присутствие в клетках ламина С, локализованного на ядерной мембране, в мутантах ламина В *Lam*^{A25} наблюдается декомпактизация гетерохроматиновых локусов, ретротранспозонов и теломер, что сопровождается умеренным повышением

уровня транскриптов некоторых мобильных элементов и теломерных повторов. Иммуноокрашивание теломерных маркеров не выявляет заметного смещения теломер от периферии ядра в мутантах *Lam*^{A25}. По-видимому, эффект мутации ламина В проявляется в нарушении формирования функционального компартмента вблизи ядерной ламины, в то время как ламин С, присутствующий в герминальных клетках, может выполнять топологические функции. Кроме декомпактизации гетерохроматина и активации транспозонов, мы наблюдаем мощное накопление рекомбиназы Rad51 в гетерохроматине при нарушении локализации ламина В, что указывает на активацию процесса рекомбинации. Белок Rad51, участвующий в гомологичной рекомбинации, незаменим при повреждениях ДНК в эухроматине, однако его активность в районах, богатых повторами, может привести к эктопической рекомбинации и хромосомным перестройкам [44]. Существуют особые механизмы, до конца не изученные, которые разобщают процессы репарации повреждений ДНК и гомологичной рекомбина-

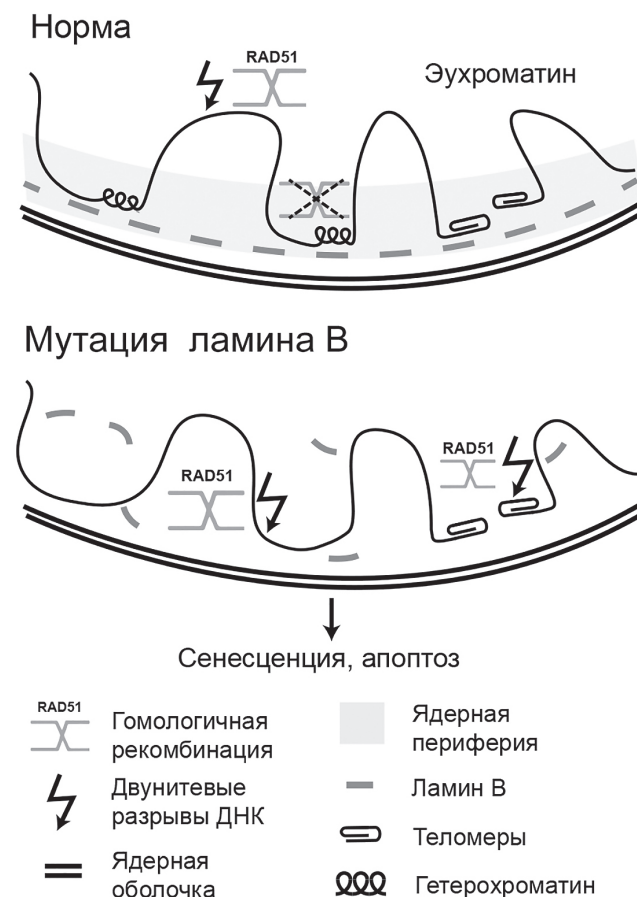


Рис. 4. Мутация ламина В приводит к активации рекомбинации в теломерах и гетерохроматине на периферии ядра (модель)

ции в гетерохроматине [45, 46]. Показано, что на периферии ядра может идти безопасная репарация ДНК в районах, обогащённых белком HP1 (heterochromatin protein 1), за счёт вытеснения Rad51 из этих участков [47, 48]. Такой механизм направлен на предупреждение незаконной рекомбинации между повторами, которыми богат гетерохроматин. То, что мы наблюдаем декомпактизацию гетерохроматина и появление признаков гомологичной рекомбинации и повреждений ДНК в теломерах и на периферии ядра, говорит о разрушении такой инфраструктуры у мутантов ламина В (рис. 4). Интересно, что такие же признаки активации гомологичной рекомбинации в теломерах и в гетерохроматине наблюдаются в процессе физиологического старения в герминальных клетках дрозофилы. Накопление формы гистона γ H2Av в мозгах у мутантов PIN1, фактора стабильности ламина В, Napolitano et al. объясняли появлением разрывов ДНК, вызванных мобилизацией транспозонов [43]. У мутантов по ламинам также наблюдались признаки повреждения ДНК, причина которых неизвестна [29]. Наши данные указывают, что дестабилизация ламина В в герминальных клетках активирует механизм, связанный, вероятно, с незаконной рекомбинацией между повторами, затрагивающей в первую очередь теломеры.

Какова связь между ламином В и рекомбинацией? Ламины играют важную роль в регуляции репарации ДНК [5, 49]. На клетках человека показано, что рекомбиназа Rad51 контактирует с ламином В1, что способствует залечиванию двунитевых разрывов ДНК и выживанию клеток, подвергнутых облучению [50]. По-видимому, в определённом геномном контексте ламин В также может препятствовать взаимодействию Rad51 с гетерохроматином, чтобы избежать мутагенной рекомбинации повторов во время репарации или репликации. Предполагается, что активация транскрипции ретротранспозонов может быть причиной клеточного старения, однако существование такой связи пока не доказано. Наши данные позволяют предположить, что эктопическая рекомбинация в гетерохроматине у мутантов по ламину В с нарушенной локализацией белка может провоцировать гибель клеток, которую мы наблюдали с использованием метода TUNEL. Возможно, что при старении и физиологической дестабилизации ламина В происходят подобные процессы, приводящие к апоптозу или митотическому аресту с участием

механизмов ответа на повреждение ДНК (DNA damage response). Интересно, что обычно проводят параллель между ламинопатией, которая вызывает глобальное изменение гетерохроматина, и теломеропатией, которая затрагивает лишь теломеры. Можно предположить, что теломеры являются особо чувствительным районом, реагирующим на изменения функций ламин. Повышенный уровень рекомбинации, сопровождаемый повреждением ДНК, наблюдается в теломерах как у мутантов *Lam^{A25}*, так и в процессе старения, что может привести к хромосомным сшивкам. Разрывы теломерной ДНК, репликативный стресс и эктопическая рекомбинация теломерных повторов могут быть пусковым механизмом клеточной гибели при ламинопатии и старении. Подобное явление, которое может быть определено как «теломерный чекпойнт», мы наблюдали ранее при исследовании генетических нарушений, вызывающих, кроме прочих клеточных эффектов, дисфункцию теломер у *Drosophila* [25]. В последнем случае наблюдалась митотическая катастрофа и остановка развития за счёт взаимодействия теломерных рибонуклеопротеиновых комплексов с белками клеточного цикла. Дальнейшие исследования помогут прояснить сигнальную роль теломер в механизме клеточной гибели при ламинопатии и старении.

Вклад авторов. А.И. Калмыкова – концепция и руководство работой, написание текста статьи; В.В. Моргунова – проведение экспериментов, статистический анализ; Л.Г. Малаев – проведение экспериментов, подготовка рисунков, редактирование рукописи; О.А. Соколова – проведение экспериментов и редактирование текста статьи; Т.В. Сизова, Д.С. Бабаев, Д.А. Квон – проведение экспериментов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00006, рук. А.И. Калмыкова).

Благодарности. В работе было использовано оборудование Центра коллективного пользования НИЦ «Курчатовский институт»-ИМГ и геномного центра НИЦ «Курчатовский институт».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wood, J. G., and Helfand, S. L. (2013) Chromatin structure and transposable elements in organismal aging, *Front. Genet.*, **4**, 274, doi: 10.3389/fgene.2013.00274.
2. Burla, R., La Torre, M., and Saggio, I. (2016) Mammalian telomeres and their partnership with lamins, *Nucleus*, **7**, 187-202, doi: 10.1080/19491034.2016.1179409.
3. Amaral, N., Ryu, T., Li, X., and Chiolo, I. (2017) Nuclear dynamics of heterochromatin repair, *Trends Genet.*, **33**, 86-100, doi: 10.1016/j.tig.2016.12.004.
4. Ovsianikova, N. L., Lavrushkina, S. V., Ivanova, A. V., Mazina, L. M., Zhironkina, O. A., and Kireev, I. I. (2021) Lamin A as a determinant of mechanical properties of the cell nucleus in health and disease, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1288-1300, doi: 10.1134/S0006297921100102.
5. Gonzalo, S. (2014) DNA damage and lamins, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **773**, 377-399, doi: 10.1007/978-1-4899-8032-8_17.
6. Bellanger, A., Madsen-Osterbye, J., Galigniana, N. M., and Collas, P. (2022) Restructuring of lamina-associated domains in senescence and cancer, *Cells*, **11**, 1846, doi: 10.3390/cells11111846.
7. Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A. B., and Gonzalo, S. (2009) Loss of A-type lamins and genomic instability, *Cell Cycle*, **8**, 3860-3865, doi: 10.4161/cc.8.23.10092.
8. Camps, J., Erdos, M. R., and Ried, T. (2015) The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function, *Nucleus*, **6**, 8-14, doi: 10.1080/19491034.2014.1003510.
9. Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., and Goldman, R. D. (2008) Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin, *Genes Dev.*, **22**, 832-853, doi: 10.1101/gad.1652708.
10. Forsberg, F., Brunet, A., Ali, T. M. L., and Collas, P. (2019) Interplay of lamin A and lamin B LADs on the radial positioning of chromatin, *Nucleus*, **10**, 7-20, doi: 10.1080/19491034.2019.1570810.
11. Ulianov, S. V., Doronin, S. A., Khrameeva, E. E., Kos, P. I., Luzhin, A. V., Starikov, S. S., Galitsyna, A. A., Nenasheva, V. V., Ilyin, A. A., Flyamer, I. M., Mikhailova, E. A., Logacheva, M. D., Gelfand, M. S., Chertovich, A. V., Gavrillov, A. A., Razin, S. V., and Shevelyov, Y. Y. (2019) Nuclear lamina integrity is required for proper spatial organization of chromatin in *Drosophila*, *Nat. Commun.*, **10**, 1176, doi: 10.1038/s41467-019-09185-y.
12. Singh, M., Hunt, C. R., Pandita, R. K., Kumar, R., Yang, C. R., Horikoshi, N., Bachoo, R., Serag, S., Story, M. D., Shay, J. W., Powell, S. N., Gupta, A., Jeffery, J., Pandita, S., Chen, B. P., Deckbar, D., Lobrich, M., Yang, Q., Khanna, K. K., Worman, H. J., et al. (2013) Lamin A/C depletion enhances DNA damage-induced stalled replication fork arrest, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 1210-1222, doi: 10.1128/MCB.01676-12.
13. Graziano, S., Coll-Bonfill, N., Teodoro-Castro, B., Kuppa, S., Jackson, J., Shashkova, E., Mahajan, U., Vindigni, A., Antony, E., and Gonzalo, S. (2021) Lamin A/C recruits ssDNA protective proteins RPA and RAD51 to stalled replication forks to maintain fork stability, *J. Biol. Chem.*, **297**, 101301, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101301.
14. Butin-Israeli, V., Adam, S. A., Jain, N., Otte, G. L., Neems, D., Wiesmuller, L., Berger, S. L., and Goldman, R. D. (2015) Role of lamin b1 in chromatin instability, *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 884-898, doi: 10.1128/MCB.01145-14.
15. Ikegami, K., Secchia, S., Almakki, O., Lieb, J. D., and Moskowicz, I. P. (2020) Phosphorylated Lamin A/C in the nuclear interior binds active enhancers associated with abnormal Transcription in progeria, *Dev. Cell*, **52**, 699-713, e611, doi: 10.1016/j.devcel.2020.02.011.
16. Huang, S., Risques, R. A., Martin, G. M., Rabinovitch, P. S., and Oshima, J. (2008) Accelerated telomere shortening and replicative senescence in human fibroblasts overexpressing mutant and wild-type lamin A, *Exp. Cell Res.*, **314**, 82-91, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.08.004.
17. Sadaie, M., Salama, R., Carroll, T., Tomimatsu, K., Chandra, T., Young, A. R., Narita, M., Perez-Mancera, P. A., Bennett, D. C., Chong, H., Kimura, H., and Narita, M. (2013) Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence, *Genes Dev.*, **27**, 1800-1808, doi: 10.1101/gad.217281.113.
18. Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A. B., Perkins, S. M., Vermolen, B., Lichtensztein, D., Grotzky, D. A., Morgado-Palacin, L., Gapud, E. J., Sleckman, B. P., Sullivan, T., Sage, J., Stewart, C. L., Mai, S., and Gonzalo, S. (2009) Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway, *EMBO J.*, **28**, 2414-2427, doi: 10.1038/emboj.2009.196.
19. Ghosh, S., and Zhou, Z. (2014) Genetics of aging, progeria and lamin disorders, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **26**, 41-46, doi: 10.1016/j.gde.2014.05.003.
20. Chen, H., Zheng, X., Xiao, D., and Zheng, Y. (2016) Age-associated de-repression of retrotransposons in the *Drosophila* fat body, its potential cause and consequence, *Aging Cell*, **15**, 542-552, doi: 10.1111/ace1.12465.
21. Li, W., Prazak, L., Chatterjee, N., Gruninger, S., Krug, L., Theodorou, D., and Dubnau, J. (2013) Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in *Drosophila*, *Nat. Neurosci.*, **16**, 529-531, doi: 10.1038/nn.3368.

22. Wood, J. G., Jones, B. C., Jiang, N., Chang, C., Hosier, S., Wickremesinghe, P., Garcia, M., Hartnett, D. A., Burhenn, L., Neretti, N., and Helfand, S. L. (2016) Chromatin-modifying genetic interventions suppress age-associated transposable element activation and extend life span in *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 11277-11282, doi: 10.1073/pnas.1604621113.
23. Osouda, S., Nakamura, Y., de Saint Phalle, B., McConnell, M., Horigome, T., Sugiyama, S., Fisher, P. A., and Furukawa, K. (2005) Null mutants of *Drosophila* B-type lamin Dm(0) show aberrant tissue differentiation rather than obvious nuclear shape distortion or specific defects during cell proliferation, *Dev. Biol.*, **284**, 219-232, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.05.022.
24. Morgunova, V., Sukhova, M. M., and Kalmykova, A. (2022) Whole-mount RNA FISH combined with immunofluorescence for the analysis of the telomeric ribonucleoproteins in the *Drosophila* germline, *Methods Mol. Biol.*, **2509**, 157-169, doi: 10.1007/978-1-0716-2380-0_10.
25. Morgunova, V., Kordyukova, M., Mikhaleva, E. A., Butenko, I., Pobeguts, O. V., and Kalmykova, A. (2021) Loss of telomere silencing is accompanied by dysfunction of Polo kinase and centrosomes during *Drosophila* oogenesis and early development, *PLoS One*, **16**, e0258156, doi: 10.1371/journal.pone.0258156.
26. Akulenko, N., Ryazansky, S., Morgunova, V., Komarov, P. A., Olovnikov, I., Vaury, C., Jensen, S., and Kalmykova, A. (2018) Transcriptional and chromatin changes accompanying de novo formation of transgenic piRNA clusters, *RNA*, **24**, 574-584, doi: 10.1261/rna.062851.117.
27. Rusinol, A. E., and Sinensky, M. S. (2006) Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors, *J. Cell Sci.*, **119**, 3265-3272, doi: 10.1242/jcs.03156.
28. Bondarenko, S. M., and Sharakhov, I. V. (2020) Reorganization of the nuclear architecture in the *Drosophila melanogaster* Lamin B mutant lacking the CaaX box, *Nucleus*, **11**, 283-298, doi: 10.1080/19491034.2020.1819704.
29. Frost, B., Bardai, F. H., and Feany, M. B. (2016) Lamin dysfunction mediates neurodegeneration in tauopathies, *Curr. Biol.*, **26**, 129-136, doi: 10.1016/j.cub.2015.11.039.
30. Pardue, M. L., and DeBaryshe, P. G. (2003) Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres, *Annu. Rev. Genet.*, **37**, 485-511, doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.093115.
31. Kordyukova, M., Olovnikov, I., and Kalmykova, A. (2018) Transposon control mechanisms in telomere biology, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **49**, 56-62, doi: 10.1016/j.gde.2018.03.002.
32. Radion, E., Morgunova, V., Ryazansky, S., Akulenko, N., Lavrov, S., Abramov, Y., Komarov, P. A., Glukhov, S. I., Olovnikov, I., and Kalmykova, A. (2018) Key role of piRNAs in telomeric chromatin maintenance and telomere nuclear positioning in *Drosophila* germline, *Epigenetics Chromatin*, **11**, 40, doi: 10.1186/s13072-018-0210-4.
33. Dang, W., Steffen, K. K., Perry, R., Dorsey, J. A., Johnson, F. B., Shilatifard, A., Kaeberlein, M., Kennedy, B. K., and Berger, S. L. (2009) Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan, *Nature*, **459**, 802-807, doi: 10.1038/nature08085.
34. Wood, J. G., Hillenmeyer, S., Lawrence, C., Chang, C., Hosier, S., Lightfoot, W., Mukherjee, E., Jiang, N., Schorl, C., Brodsky, A. S., Neretti, N., and Helfand, S. L. (2010) Chromatin remodeling in the aging genome of *Drosophila*, *Aging Cell*, **9**, 971-978, doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00624.x.
35. Ivanov, D. K., Escott-Price, V., Ziehm, M., Magwire, M. M., Mackay, T. F., Partridge, L., and Thornton, J. M. (2015) Longevity GWAS using the *Drosophila* genetic reference panel, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **70**, 1470-1478, doi: 10.1093/gerona/glv047.
36. Coffinier, C., Jung, H. J., Nobumori, C., Chang, S., Tu, Y., Barnes, R. H. 2nd, Yoshinaga, Y., de Jong, P. J., Vergnes, L., Reue, K., Fong, L. G., and Young, S. G. (2011) Deficiencies in lamin B1 and lamin B2 cause neurodevelopmental defects and distinct nuclear shape abnormalities in neurons, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4683-4693, doi: 10.1091/mbc.E11-06-0504.
37. Shah, P. P., Donahue, G., Otte, G. L., Capell, B. C., Nelson, D. M., Cao, K., Aggarwala, V., Cruickshanks, H. A., Rai, T. S., McBryan, T., Gregory, B. D., Adams, P. D., and Berger, S. L. (2013) Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape, *Genes Dev.*, **27**, 1787-1799, doi: 10.1101/gad.223834.113.
38. Lin, W. Q., Ngian, Z. K., Koh, T. W., and Ong, C. T. (2022) Altered stability of nuclear lamin-B marks the onset of aging in male *Drosophila*, *PLoS One*, **17**, e0265223, doi: 10.1371/journal.pone.0265223.
39. Chen, H., Zheng, X., and Zheng, Y. (2014) Age-associated loss of lamin-B leads to systemic inflammation and gut hyperplasia, *Cell*, **159**, 829-843, doi: 10.1016/j.cell.2014.10.028.
40. Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., and Campisi, J. (2012) Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker, *Mol. Biol. Cell*, **23**, 2066-2075, doi: 10.1091/mbc.E11-10-0884.
41. Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S. A., Hamanaka, R. B., Goldman, A. E., Lucas, C. A., Shumaker, D. K., Kosak, S. T., Chandel, N. S., and Goldman, R. D. (2011) The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence, *Genes Dev.*, **25**, 2579-2593, doi: 10.1101/gad.179515.111.
42. Dreesen, O., Chojnowski, A., Ong, P. F., Zhao, T. Y., Common, J. E., Lunny, D., Lane, E. B., Lee, S. J., Vardy, L. A., Stewart, C. L., and Colman, A. (2013) Lamin B1 fluctuations have differential effects on

- cellular proliferation and senescence, *J. Cell Biol.*, **200**, 605-617, doi: 10.1083/jcb.201206121.
43. Napolitano, F., Ferrari Bravo, G., Voto, I. A. P., Santin, A., Celora, L., Campaner, E., Dezi, C., Bertossi, A., Valentino, E., Santorsola, M., Rustighi, A., Fajner, V., Maspero, E., Ansaloni, F., Cancila, V., Valenti, C. F., Santo, M., Artimagnella, O. B., Finaurini, S., Gioia, U., et al. (2021) The prolyl-isomerase PIN1 is essential for nuclear Lamin-B structure and function and protects heterochromatin under mechanical stress, *Cell Rep.*, **36**, 109694, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109694.
 44. Kramara, J., Osia, B., and Malkova, A. (2018) Break-induced replication: the where, the why, and the how, *Trends Genet.*, **34**, 518-531, doi: 10.1016/j.tig.2018.04.002.
 45. Tsouroula, K., Furst, A., Rogier, M., Heyer, V., Maglott-Roth, A., Ferrand, A., Reina-San-Martin, B., and Soutoglou, E. (2016) Temporal and spatial uncoupling of DNA double strand break repair pathways within mammalian heterochromatin, *Mol. Cell*, **63**, 293-305, doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.002.
 46. Merigliano, C., and Chiolo, I. (2021) Multi-scale dynamics of heterochromatin repair, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **71**, 206-215, doi: 10.1016/j.gde.2021.09.007.
 47. Chiolo, I., Minoda, A., Colmenares, S. U., Polyzos, A., Costes, S. V., and Karpen, G. H. (2011) Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair, *Cell*, **144**, 732-744, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.012.
 48. Ryu, T., Spatola, B., Delabaere, L., Bowlin, K., Hopp, H., Kunitake, R., Karpen, G. H., and Chiolo, I. (2015) Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1401-1411, doi: 10.1038/ncb3258.
 49. Lambert, M. W. (2019) The functional importance of lamins, actin, myosin, spectrin and the LINC complex in DNA repair, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **244**, 1382-1406, doi: 10.1177/1535370219876651.
 50. Liu, N. A., Sun, J., Kono, K., Horikoshi, Y., Ikura, T., Tong, X., Haraguchi, T., and Tashiro, S. (2015) Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage, *FASEB J.*, **29**, 2514-2525, doi: 10.1096/fj.14-265546.

LAMIN B DYSFUNCTION AND PHYSIOLOGICAL AGING CAUSE TELOMERE INSTABILITY IN THE *DROSOPHILA* GERMLINE

V. V. Morgunova^{1#}, O. A. Sokolova^{1#}, T. V. Sizova¹, L. G. Malaev^{1,2},
D. S. Babaev^{1,2}, D. A. Kwon³, and A. I. Kalmykova^{1*}

¹ Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute",
123182 Moscow, Russia; e-mail: allakalm@img.ras.ru

² Faculty of biotechnology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Kurchatov Center for Genome Research of National Research Centre "Kurchatov Institute",
123182 Moscow, Russia

Chromatin spatial organization in the nucleus is essential for the genome functioning and regulation of gene activity. The nuclear lamina and lamina-associated proteins, lamins, play a key role in this process. Lamin dysfunction leads to the decompaction and transcriptional activation of heterochromatin, which is associated with the premature aging syndrome. In many cell types, telomeres are located at the nuclear periphery, where their replication and stability are ensured by the nuclear lamina. Moreover, diseases associated with defects in lamins and telomeres have similar manifestations and resemble physiological aging. Understanding molecular changes associated with aging at the organismal level is especially important. In this study, we compared the effects caused by the mutation in lamin B and physiological aging in the germline of the model organism *Drosophila melanogaster*. We have shown that the impaired localization of lamin B leads to the heterochromatin decompaction and transcriptional activation of some transposable elements and telomeric repeats. Both DNA damage and activation of homologous recombination in the telomeres were observed in the germ cells of lamin B mutants. The instability of repeat-enriched heterochromatin can be directly related to the genome destabilization, germ cell death, and sterility observed in lamin B mutants. Similar processes were observed in *Drosophila* germline in the course of physiological aging, which indicates a close link between the maintenance of the heterochromatin stability at the nuclear periphery and mechanisms of aging.

Keywords: lamin B, telomeres, aging, germline, heterochromatin, retrotransposons, transcription, recombination, Rad51, γH2Av, *Drosophila*