ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 26–38

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 575.162+577.24

ВЛИЯНИЕ ГЕНА *aPKC*, КОДИРУЮЩЕГО АТИПИЧНУЮ ПРОТЕИНКИНАЗУ С, НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *D. melanogaster* ЗАВИСИТ ОТ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ GSK3

© 2023 г.
М. В. Тростников[1, *], Е. Р. Веселкина[1], Ю. А. Андреев[1], А. Ю. Хрячкова[1], Н. В. Рощина[1, 2], Е. Г. Пасюкова[1]

[1]*Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Москва, 123182 Россия*

[2]*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*

**e-mail: mikhail.trostnikov@gmail.com*

Поступила в редакцию 21.02.2022 г.
После доработки 14.04.2022 г.
Принята к публикации 26.05.2022 г.

Гены *shaggy* и *aPKC Drosophila melanogaster* кодируют высококонсервативные протеинкиназы GSK3 (Glycogen Syntase Kinase 3) и aPKC (Protein Kinase C), играющие ключевую роль во многих клеточных процессах. Ранее мы продемонстрировали, что изменение экспрессии гена *shaggy* в нейронах влияет на продолжительность жизни. В настоящей статье показано, что изменение экспрессии гена *aPKC* в нейронах также влияет на продолжительность жизни. Изменение экспрессии двух протеинкиназ во всех нейронах самцов и самок и в мотонейронах самцов приводило к изменению продолжительности жизни, свидетельствующему об отсутствии влияния aPKC на GSK3 и возможном ингибирующем действии GSK3 на aPKC. В то же время изменение экспрессии двух протеинкиназ в мотонейронах самок приводило к изменению продолжительности жизни, свидетельствующему о существовании пока неясного механизма взаимодействия между этими белками. Выяснение механизмов взаимодействия между aPKC, GSK3 и другими их партнерами позволит углубить и расширить наши представления о причинах долголетия и способах продления жизни.

Ключевые слова: продолжительность жизни, нервная система, протеинкиназа aPKC, протеинкиназа GSK3, *Drosophila melanogaster.*

DOI: 10.31857/S0016675823010125, **EDN:** CNOZBD

В современной биологии старения одним из наиболее активно развивающихся направлений является поиск ключевых факторов, приводящих к сокращению продолжительности жизни и сопутствующих возрастным изменениям. Выявление наиболее эволюционно консервативных триггеров старения создает базу для поиска потенциальных способов влияния на этот процесс и для выяснения общебиологических закономерностей, лежащих в основе ограниченной продолжительности жизни. В широко цитируемой работе [1] были сформулированы основные фундаментальные механизмы старения: увеличение уровня геномной нестабильности, уменьшение протеостаза, сокращение длины теломер, нарушение эпигенетической регуляции, появление сенесцентных и истощение стволовых клеток, нарушение работы митохондрий, усиление окислительного стресса, ослабление пищевого баланса и ряд других факторов. Существуют ли среди многообразных механизмов старения такие, которые инициируют развитие остальных? В ряде работ в качестве такого базового механизма рассматривается нарушение протеостаза, приводящее к накоплению агрегированных белков, неспособных корректно выполнять свою изначальную функцию, и ассоциированное с возрастными изменениями, средней продолжительностью жизни и широким спектром патологий [2].

Одним из наиболее устойчивых к протеолитическому стрессу типов клеток являются стволовые клетки, в которых выявлен повышенный уровень деградации белков с нарушенной структурой [3, 4]. Предполагается, что контроль протеостаза связан сзависимым от возраста распределением нарушенных белков между материнскими и дочерними клетками в процессе асимметричного деления стволовых клеток. Так, в старых стволовых клетках нервной ткани млекопитающих асимметрия в распределении поврежденных бел-

ков нарушается, в результате чего в дочерней клетке количество поврежденных белков увеличивается, нарушая ее функциональность [5].

Белки, контролирующие асимметричность клеточного деления, высоко консервативны, поэтому разумным является исследование взаимосвязи между молекулярными механизмами, регулирующими асимметричное деление клеток нервной системы и процесс старения, на модельных организмах с достаточно короткой продолжительностью жизни. К настоящему моменту одной из наиболее изученных моделей асимметричного деления является деление нейробластов плодовой мушки *Drosophila melanogaster* [6]. В процессе этого деления ось полярности определяется формированием и активностью комплекса, состоящего из атипичной протеинкиназы С (aPKC), а также белков Partitioning – defective 6 (Par-6) и Bazooka (Baz, гомолог Par-3 млекопитающих) [7]. В связи с изучением старения особый интерес представляет aPKC, поскольку у человека продемонстрировано изменение уровня ее экспрессии, ассоциированное с возрастом и развитием болезни Альцгеймера [8]. Такая ассоциация может быть обусловлена взаимодействием aPKC с протеинкиназой GSK3 [9]. Известно, что GSK3 участвует в работе различных метаболических путей, связанных с контролем продолжительности жизни и целого спектра патологий, среди которых особенно выделяются нарушения работы нервной системы [10, 11].

Ранее мы выяснили, что сильное или умеренное увеличение либо уменьшение экспрессии гена *shaggy* (*sgg*), кодирующего протеинкиназу GSK3, во всех нейронах уменьшает продолжительность жизни дрозофилы. В то же время нарушение экспрессии *sgg* в различных нейронах может приводить как к уменьшению, так и к увеличению продолжительности жизни в зависимости от направления и степени изменения экспрессии, типа нейронов и пола особей [12–14]. В настоящей статье мы показали, что уменьшение экспрессии гена *aPKC*, кодирующего протеинкиназу aPKC, в нервной системе также повлияло на продолжительность жизни дрозофилы. Изменение экспрессии двух протеинкиназ во всех нейронах самцов и самок и в мотонейронах самцов приводило к изменению продолжительности жизни, свидетельствующему об отсутствии влияния aPKC на GSK3 и возможном ингибирующем действии GSK3 на aPKC. В то же время изменение экспрессии двух протеинкиназ в мотонейронах самок приводило к изменению продолжительности жизни, свидетельствующему о существовании сложного и пока неясного механизма взаимодействия между исследуемыми протеинкиназами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии дрозофилы

Линии *y[1]sc[*]v[1]*; *P{y[+t7.7]v[+t1.8]==TRiP.HMC06305}attP40* (трансген aPKC_НД1) и *y[1]sc[*]v[1]*; *P{y[+t7.7]v[+t1.8]=TRiP.HMS01689}attP40* (трансген aPKC_НД2) с трансгенами, локализованными во второй хромосоме, использовали для нокдауна гена *aPKC*, приводящего к уменьшению уровня экспрессии aPKC. Исходную линию без трансгенов *y[1]v[1]*; *P{y[+t7.7]=CaryP}attP40* (контроль_aPKC) использовали в качестве контрольной в отношении нокдауна гена *aPKC* (http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/TRiPtb.htm).

Линию *w[1118]; P{w[+mC]=UAS-sgg.B}MB5* (трансген sggRB) с трансгеном, локализованным в третьей хромосоме и кодирующим основной транскрипт гена *sgg*, *RB* [15], использовали для сверхэкспрессии гена *sgg* и увеличения уровня экспрессии GSK3. Исходную линию *w[1118]* (контроль_sgg) без трансгена использовали в качестве контрольной в отношении сверхэкспрессии гена *sgg* [15].

Линии *P{w+mW.hs=GawB}elavC155w[1118]*; *P{w+mC=UAS-Dcr-2.D}2* (драйвер Д1) и *w**; *P{GawB}D42* (драйвер Д2) использовали для индукции экспрессии трансгенов во всех нейронах и в мотонейронах соответственно.

Измерение продолжительности жизни

Девственных самцов и самок каждого генотипа собирали в течение дня и помещали в пробирки с питательной средой (манная крупа, изюм, сахар, дрожжи, агар-агар, нипагин, пропионовая кислота), по пять мух каждого пола отдельно. Количество мертвых мух в пробирках регистрировали ежедневно; живых мух переносили на свежий корм раз в неделю; все культуры вели при 25°C. Выборка составила 50 особей на генотип/пол; опыты были повторены дважды. Для оценки полученных данных использовали стандартный статистический анализ продолжительности жизни [16, 17]. Для оценки статистической значимости различий между кривыми выживания использовали критерий Манна–Уитни.

Иммуногистохимический анализ

Личинок третьей стадии препарировали в натрий-фосфатном буфере (PBS) и фиксировали в 4%-ном параформальдегиде (Sigma-Aldrich) при комнатной температуре в течение 20 мин. Для иммуноокрашивания препараты помещали в блокирующий буфер (BlockPRO, Visual Protein Biotechnology Corporation) на один час при комнатной температуре, инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C, с вторичными антителами в течение двух часов и помещали в среду для иммунофлуоресценции (VectaShield, Vector

Labs). После каждой стадии обработки препараты промывали в фосфатном буфере (3 × 15 мин). Были использованы первичные антитела против Bruchpilot (DSHB), белка, специфического для зон активных синаптических контактов [18], и пероксидазы хрена (Jackson ImmunoResearch), белка, широко используемого в качестве маркера пресинаптических мембран [19]. Нейромышечные связки были проанализированы в четвертой мышце третьего и четвертого сегментов брюшной полости пяти–семи личинок на генотип/пол с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (Zeiss LSM 900) и программ ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html) и LSM Image Browser (Zeiss).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа взаимодействия между генами *aPKC* и *sgg*, используя стандартные скрещивания с хромосомами-балансерами, мы получили линии, в геноме которых присутствовали первая хромосома *w[1118]*; вторая хромосома с одним из трансгенов, уменьшающих уровень экспрессии протеинкиназы aPKC; и третья хромосома с трансгеном, увеличивающим уровень экспрессии протеинкиназы GSK3, а также соответствующие контрольные линии. Линии были названы контроль_aPKC+ +контроль_sgg, aPKC_НД1+контроль_sgg, aPKC_НД2+контроль_sgg; aPKC_НД1+sggRB, aPKC_НД2+sggRB в соответствии с обозначением трансгенов (см. раздел “Материалы и методы”). Во всех линиях подтвердили отсутствие *Wolbachia*, симбионта дрозофилы, способного повлиять на ее продолжительность жизни [20].

Для индукции экспрессии трансгенов во всех нейронах или в мотонейронах самцов каждой из полученных линий скрещивали с самками соответствующей линии-драйвера. У самцов и самок всех генотипов была охарактеризована продолжительность жизни. Результаты двух повторных опытов хорошо совпали между собой (табл. 1), несмотря на небольшой объем каждого опыта, что, видимо, объясняется сильно выраженным влиянием уровня экспрессии aPKC и GSK3 на исследуемый признак. Это позволило нам ограничиться двумя повторностями и объединить их для представления результатов.

Уменьшение количества aPKC во всех нейронах снизило продолжительность жизни как самцов, так и самок (среднюю продолжительность жизни – на 68 и 35% в случае aPKC_НД1 и на 54 и 13% в случае aPKC_НД2; табл. 1, рис. 1). Этот эффект существенно усилился в том случае, когда уменьшение количества aPKC во всех нейронах происходило на фоне увеличении количества GSK3. Среди самцов с одним из вариантов нокдауна гена *aPKC* и сверхэкспрессией гена *sgg* выжило всего несколько особей, продолжительность их жизни не превышала двух дней; кривая выживания для этого случая не представлена (табл. 1, рис. 1,*а*). Самцы с другим вариантом нокдауна гена *aPKC* и сверхэкспрессией гена *sgg* выживали лучше, но средняя продолжительность их жизни не превышала трех дней (табл. 1, рис. 1,*б*). Средняя продолжительность жизни самок в обоих случаях также была крайне низкой (4 ± 0.2 дня; табл. 1, рис. 1,*б*, 1,*г*). Было показано, что GSK3 способна фосфорилировать aPKC и таким образом ингибировать ее [9]. Если это так, то у мух с нокдауном гена *aPKC* на фоне увеличения экспрессии GSK3 должно было наблюдаться дальнейшее уменьшение экспрессии aPKC и дальнейшее снижение продолжительности жизни. Именно такой эффект мы наблюдали в наших экспериментах, что позволяет говорить о возможном ингибирующем действии GSK3 на aPKC в нейронах в ходе контроля продолжительности жизни. В то же время дальнейшее снижение продолжительности жизни могло быть и следствием независимого, аддитивного влияния уменьшения активности aPKC и увеличения активности GSK3 в нейронах.

Действительно, в ранее проведенном исследовании мы показали, что само по себе увеличение экспрессии гена *sgg*, кодирующего GSK3, во всех нейронах также приводило к очень существенному снижению средней продолжительности жизни самцов и самок, до 3 ± 0.1 и 7 ± 0.4 дней соответственно [13]. Средняя продолжительность жизни самцов и самок с увеличенной экспрессией GSK3 во всех нейронах составила 4 и 9% от средней продолжительности жизни соответствующего контроля [13]. Результаты же, представленные в настоящей статье, показали, что средняя продолжительность жизни самцов и самок с увеличенной экспрессией GSK3 на фоне уменьшенной экспрессии aPKC во всех нейронах составила в среднем 12 и 8% от средней продолжительности жизни соответствующего контроля. Известно, что aPKC может фосфорилировать и тем самым ингибировать GSK3 [21]. В таком случае в наших опытах у мух с увеличенной экспрессией GSK3 на фоне нокдауна гена *aPKC* должно было наблюдаться еще большее увеличение экспрессии GSK3, а следовательно еще большее снижение продолжительности жизни. Однако ни у самцов, ни у самок такого не наблюдалось, влияние увеличения экспрессии GSK3 на продолжительности жизни было сходным в отсутствие и в присутствии нокдауна гена *aPKC*. Тем не менее, поскольку продолжительность жизни была очень низкой у мух всех генотипов с увеличенной экспрессией GSK3, сделать надежное заключение о взаимодействии генов aPKC и GSK3 на основании полученных данных было трудно.

Чтобы преодолеть возникшее затруднение, мы использовали два подхода. Первый подход заключался в том, чтобы оценить влияние увеличенной экспрессии GSK3 на фоне нокдауна *aPKC*

Таблица 1. Параметры, характеризующие продолжительность жизни самцов и самок с нокдауном гена *aPKC*

Тип клеток (драйвер)	Линии с трансгенами	Пол	Вариант опыта	*N*	Средняя продолжительность жизни (ошибка средней), дни	Достоверность отличия от контрольного генотипа, тест Манна–Уитни*
Все нейроны (Д1)	Контроль_aPKC+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	50 (2.4)	
			Опыт 2	50	61 (2.6)	
			Сумма	100	56 (1.9)	
		♀	Опыт 1	50	79 (2.6)	
			Опыт 2	50	77 (2.2)	
			Сумма	100	78 (1.7)	
	aPKC_НД1+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	17 (1.9)	<0.0001
			Опыт 2	50	19 (1.3)	<0.0001
			Сумма	100	18 (1.1)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	53 (2.3)	<0.0001
			Опыт 2	50	50 (1.8)	<0.0001
			Сумма	100	51 (1.5)	<0.0001
	aPKC_НД1+sggRB	♂	Опыт 1	1	2	–
			Опыт 2	2	2	–
			Сумма	3	2	0.0032
		♀	Опыт 1	50	4 (2.4)	<0.0001
			Опыт 2	50	3 (1.4)	<0.0001
			Сумма	100	4 (1.2)	<0.0001
	aPKC_НД2+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	34 (2.6)	<0.0001
			Опыт 2	50	18 (1.8)	<0.0001
			Сумма	100	26 (1.8)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	70 (2.6)	0.0038
			Опыт 2	50	66 (3.0)	0.0165
			Сумма	100	68 (1.9)	0.0003
	aPKC_НД2+sggRB	♂	Опыт 1	50	3 (0.2)	<0.0001
			Опыт 2	50	2 (0.1)	<0.0001
			Сумма	100	3 (0.1)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	4 (0.4)	<0.0001
			Опыт 2	50	4 (0.4)	<0.0001
			Сумма	100	4 (0.3)	<0.0001

Таблица 1. Окончание

Тип клеток (драйвер)	Линии с трансгенами	Пол	Вариант опыта	*N*	Средняя продолжительность жизни (ошибка средней), дни	Достоверность отличия от контрольного генотипа, тест Манна–Уитни*
Мотонейроны (Д2)	Контроль_аРКС+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	73 (2.5)	
			Опыт 2	50	57 (2.6)	
			Сумма	100	65 (1.9)	
		♀	Опыт 1	50	76 (2.9)	
			Опыт 2	50	85 (1.9)	
			Сумма	100	81 (1.8)	
	аРКС_НД1+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	57 (1.7)	<0.0001
			Опыт 2	50	47 (2.4)	<0.0001
			Сумма	100	52 (1.6)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	70 (2.6)	0.0331
			Опыт 2	50	77 (2.5)	0.0059
			Сумма	100	74 (1.8)	0.0005
	аРКС_НД1+sggRB	♂	Опыт 1	50	25 (1.3)	<0.0001
			Опыт 2	50	27 (1.3)	<0.0001
			Сумма	100	26 (0.9)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	60 (1.6)	0.0004
			Опыт 2	50	66 (1.9)	0.0006
			Сумма	100	63 (1.3)	<0.0001
	аРКС_НД2+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	54 (3.4)	<0.0001
			Опыт 2	50	35 (2.4)	<0.0001
			Сумма	100	45 (2.3)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	68 (1.9)	0.0014
			Опыт 2	50	73 (2.6)	<0.0001
			Сумма	100	70 (1.6)	<0.0001
	аРКС_НД2+sggRB	♂	Опыт 1	50	32 (2.1)	<0.0001
			Опыт 2	50	22 (1.9)	0.0006
			Сумма	100	27 (1.5)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	63 (1.8)	0.0388
			Опыт 2	50	66 (2.8)	0.0827
			Сумма	100	64 (1.7)	0.0093

* Продолжительность жизни сравнивали у гибридов от скрещивания между линиями-драйверами Д1 или Д2 и следующими линиями с трансгенами: контроль_аРКС+контроль_sgg и аРКС_НД1+контроль_sgg; аРКС_НД1+контроль_sgg и аРКС_НД1+sggRB; контроль_аРКС+контроль_sgg и аРКС_НД2+контроль_sgg; аРКС_НД2+контроль_sgg и аРКС_НД2+sggRB. Описание генотипов см. разделы “Материалы и методы” и “Результаты”.

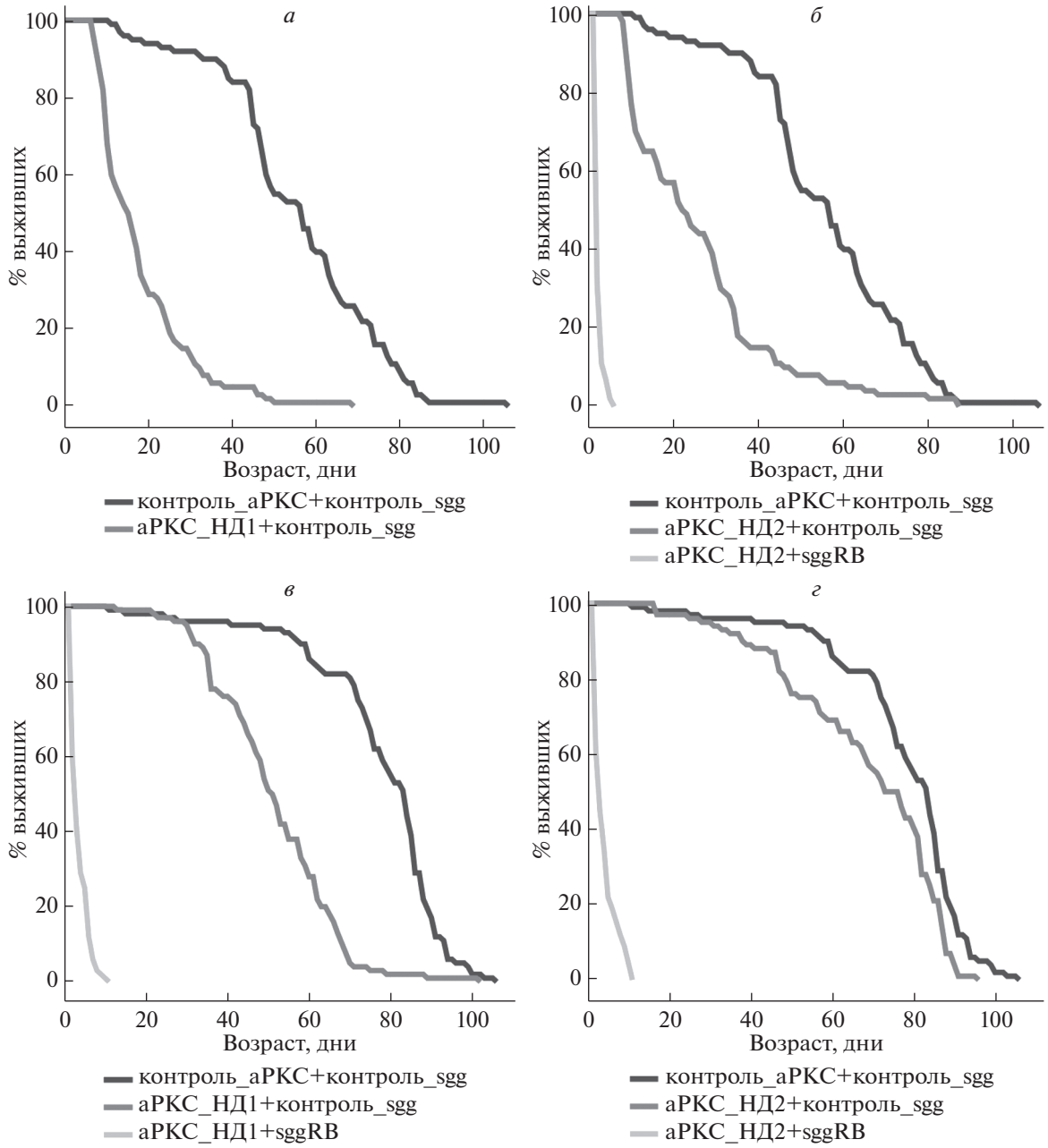

Рис. 1. Влияние нокдауна гена *аРКС*, вызванного трансгенами во всех нейронах, на продолжительность жизни самцов (*а*, *б*) и самок (*в*, *г*). Продолжительность жизни сравнивали у гибридов от скрещивания между линиями-драйверами Д1 или Д2 и линиями с трансгенами. Описание генотипов см. разделы “Материалы и методы” и “Результаты”.

во всех нейронах не на продолжительность жизни, а на свойства нервной системы, поскольку ранее мы показали, что при увеличении уровня экспрессии GSK3 во всех нейронах эти признаки меняются согласованно [13].

Известно, что GSK3 и аРКС влияют на различные свойства нейронов [19, 22–24]. В частности, ранее мы показали, что увеличение уровня экспрессии GSK3 во всех нейронах приводит к достоверному уменьшению количества зон активных синаптических контактов в нейромышечных связках самок [13]. Синаптическая активность является одним из интегральных показателей работы нервной системы, а нейромышечные связки личинок дрозофилы часто используются в качестве модельной системы для изучения функции синапсов [25]. Поэтому чтобы оценить, как взаимодействуют GSK3 и аРКС в процессе контроля свойств нервной системы, мы измерили количество зон активных синаптических контактов у самок,

полученных от скрещивания между самцами линий аРКС_НД1+контроль_sgg или аРКС_НД1+sggRB и самками линии-драйвера, индуцирующего экспрессию трансгенов во всех нейронах. Как и при изучении продолжительности жизни, полученные результаты о влиянии GSK3 на активность синапсов в присутствии нокдауна гена *aPKC* были сопоставлены с ранее полученными данными о таком влиянии в отсутствие нокдауна гена *aPKC* [13].

Увеличение экспрессии гена *sgg*, кодирующего GSK3, во всех нейронах приводило к достоверному снижению количества зон активных синаптических контактов у самок, со 158 ± 4.2 до 89 ± 3.0 [13]. Количество зон активных синаптических контактов у самок с увеличенной экспрессией GSK3 во всех нейронах составило, таким образом, 58% от контрольного. Количество зон активных синаптических контактов у самок с увеличенной экспрессией GSK3 на фоне уменьшенной экспрессии аРКС во всех нейронах также снижалось со 117 ± 9 до 66 ± 11 (рис. 2) и составило 55% от контрольного. Если аРКС является ингибитором GSK3 [21], то в наших опытах у особей с увеличенной экспрессией GSK3 на фоне нокдауна гена *aPKC* должно было наблюдаться еще большее увеличение активности GSK3, а следовательно еще большее снижение активности синапсов. Однако этого не произошло, и у самок с увеличенной экспрессией GSK3 во всех нейронах активность синапсов уменьшилась одинаково в отсутствие и в присутствии нокдауна гена *aPKC*. Этот результат хорошо соответствует описанному выше характеру влияния увеличенной экспрессии GSK3 в отсутствие и в присутствии нокдауна гена *aPKC* на продолжительность жизни. Таким образом, исследование взаимодействия аРКС и GSK3 в нейронах указывает на то, что аРКС не влияет на эффекты GSK3 в отношении активности синапсов и продолжительности жизни. Полученные результаты нельзя также объяснить аддитивным действием измененной экспрессии двух протеинкиназ.

Второй подход заключался в том, что мы индуцировали экспрессию трансгенов в мотонейронах, поскольку ранее было показано, что увеличение экспрессии гена *sgg* в этих клетках снижает продолжительность жизни, но не так сильно, как увеличение экспрессии гена *sgg* во всех нейронах [13]. Оказалось, что уменьшение количества аРКС в мотонейронах снизило продолжительность жизни как самцов, так и самок, но менее значительно, чем в случае уменьшения количества аРКС во всех нейронах (на 20 и 9% в случае аРКС_НД1 и на 31 и 14% в случае аРКС_НД2; табл. 1, рис. 3). Этот эффект усилился в том случае, когда уменьшение количества аРКС в мотонейронах происходило на фоне увеличения количества GSK3 (табл. 1, рис. 3). Увеличение экспрессии GSK3 в мотонейронах само по себе также приводило к снижению средней продолжительности жизни самцов и самок [13]. Учитывая эти факты, можно заключить, что закономерности влияния нокдауна *aPKC* на продолжительность жизни в отсутствие и в присутствии изменений в уровне экспрессии GSK3 в мотонейронах и во всех нейронах совпали.

Таким образом, изменение продолжительности жизни, вызванное нарушением экспрессии исследуемых протеинкиназ и во всех нейронах, и отдельно в мотонейронах, соответствовало как гипотезе обингибирующем действии GSK3 на аРКС, так и гипотезе об их независимом, аддитивном влиянии на исследуемый признак. Влияние GSK3 на аРКС и совместное действие двух протеинкиназ на продолжительность жизни было одинаковым у самцов и самок.

Средняя продолжительность жизни самцов и самок с увеличенной экспрессией GSK3 в мотонейронах составила 65 и 75% от средней продолжительности жизни соответствующего контроля [13]; средняя же продолжительность жизни самцов и самок с увеличенной экспрессией GSK3 на фоне уменьшенной экспрессии аРКС в мотонейронах составила 55 и 88% от средней продолжительности жизни соответствующего контроля. Таким образом, увеличение экспрессии GSK3 на фоне нокдауна гена *aPKC* в мотонейронах самцов привело к усилению отрицательного влияния на продолжительность жизни. Этот результат соответствует как гипотезе о том, что аРКС является ингибитором GSK3, так и гипотезе об аддитивности эффектов двух протеинкиназ. У самок со сниженной экспрессией аРКС в мотонейронах наблюдалось определенное смягчение отрицательного влияния увеличенной экспрессии GSK3 на продолжительность жизни. Такой результат невозможно объяснить независимым, аддитивным действием двух исследуемых протеинкиназ. Следовательно, можно говорить о том, что влияние уровня экспрессии GSK3 в мотонейронах на продолжительность жизни самок зависит от аРКС. Однако такой результат предполагает существование какого-то сложного, возможно непрямого взаимодействия между двумя белками.

Обобщая полученные результаты, можно сказать, что изменение продолжительности жизни, вызванное нарушением экспрессии исследуемых протеинкиназ во всех нейронах самцов и самок и отдельно в мотонейронах самцов, с наибольшей вероятностью соответствовало гипотезе об ингибирующем действии GSK3 на аРКС и отсутствии влияния аРКС на GSK3. В то же время характер изменения продолжительности жизни, возникающего в результате измененной экспрессии аРКС и GSK3 в мотонейронах самок, предполагает существование пока неизвестных механизмов взаимодействия между исследуемыми протеинкиназами.

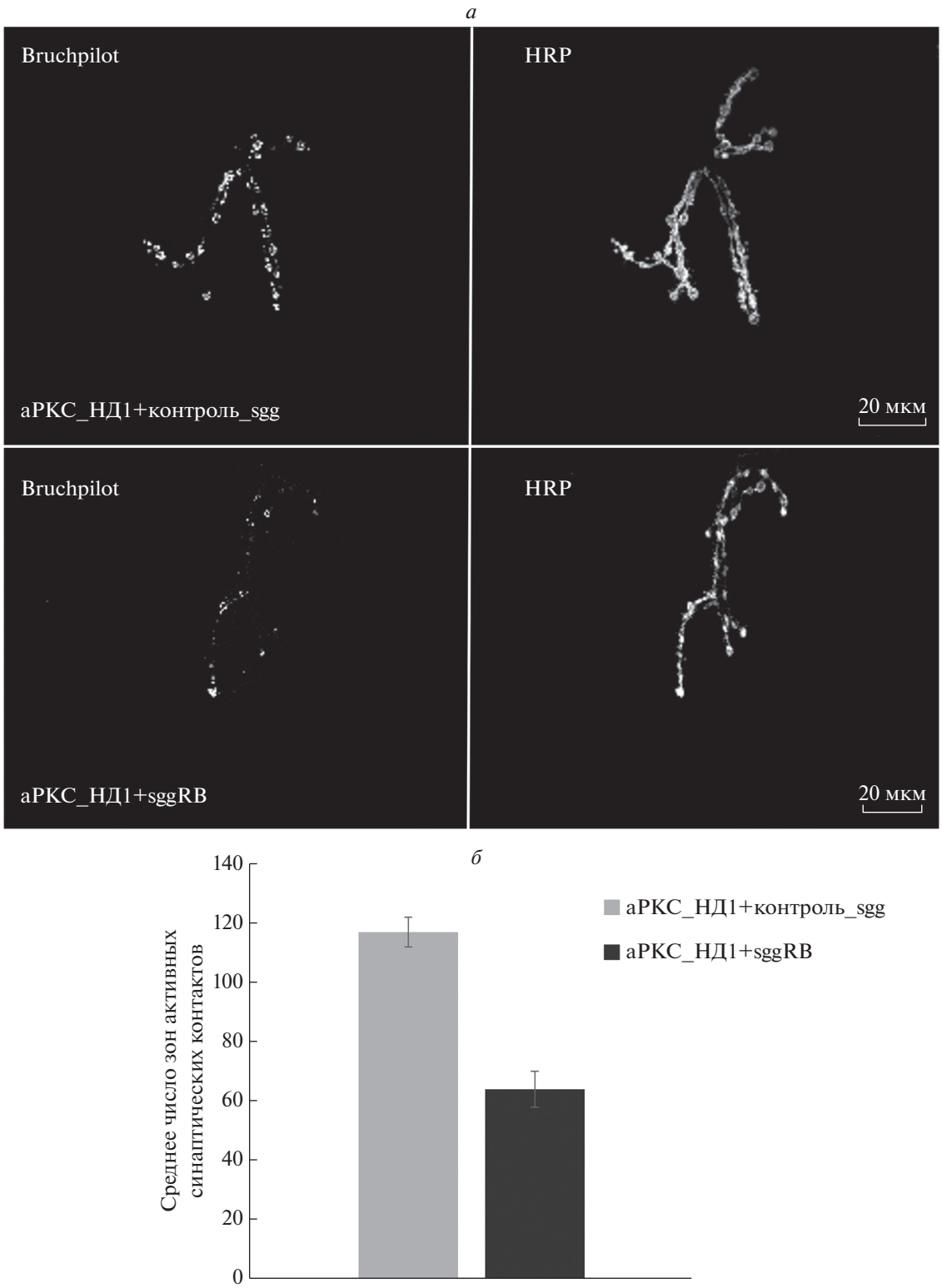

Рис. 2. Влияние нокдауна гена *aPKC* во всех нейронах на активность синапсов у самок. Число зон активных синаптических контактов сравнивали у гибридов от скрещивания между линией-драйвером Д1 и линиями с трансгенами. Описание генотипов см. разделы “Материалы и методы” и “Результаты”. Препарат нейромышечных связок личинок окрашивали антителами к пероксидазе хрена, маркеру пресинаптических мембран, и белку Bruchpilot, специфичному для зон активных синаптических контактов, белые точки (*а*). Достоверность отличия от контрольного генотипа, *t*-тест: $P < 0.001$ (*б*).

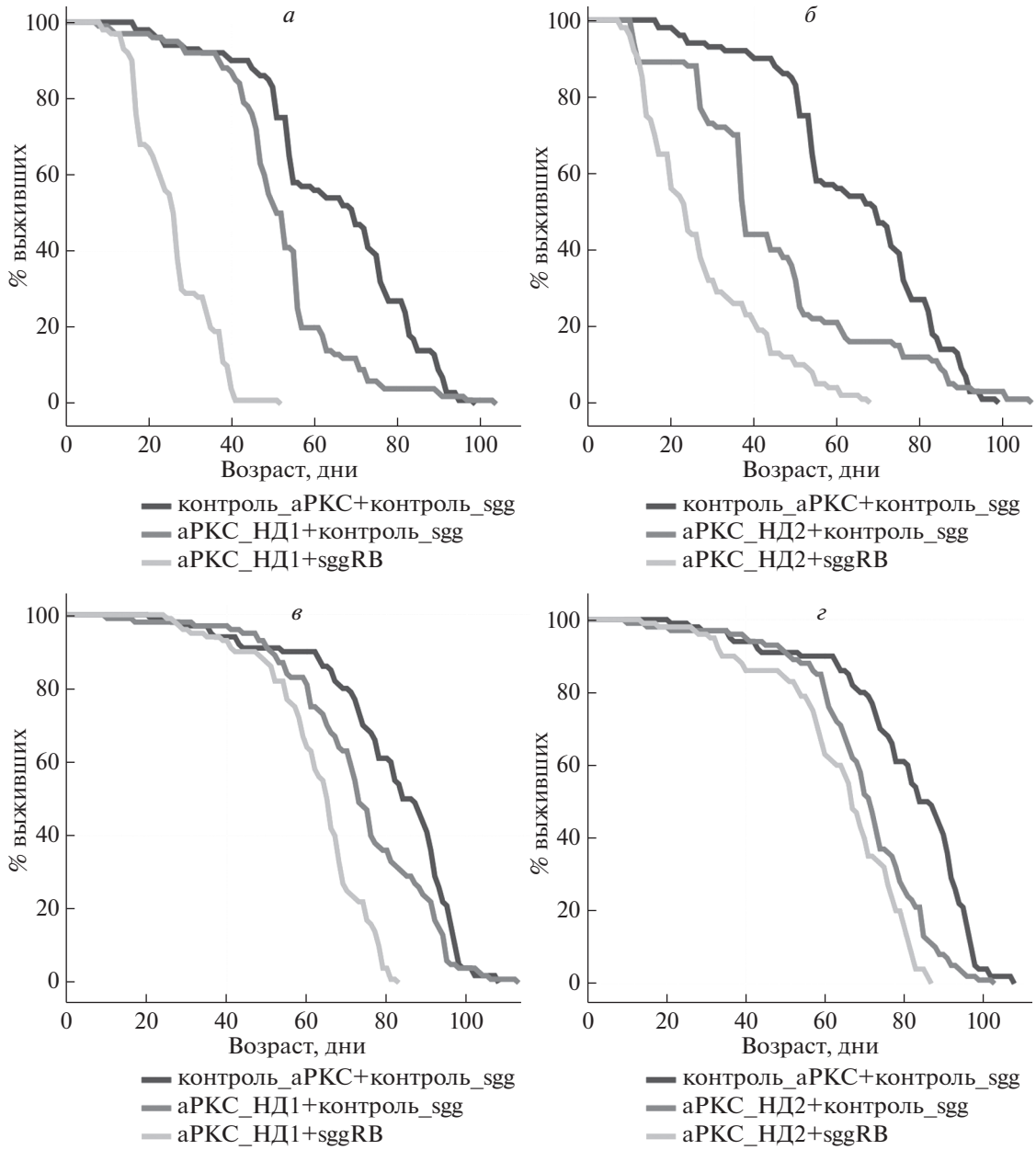

Рис. 3. Влияние нокдауна гена *аРКС* в мотонейронах на продолжительность жизни самцов (*а*, *б*) и самок (*в*, *г*). Продолжительность жизни сравнивали у гибридов от скрещивания между линиями-драйверами Д1 или Д2 и линиями с трансгенами. Описание генотипов см. разделы “Материалы и методы” и “Результаты”.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ранее проведенных пилотных экспериментах мы показали, что снижение уровня экспрессии гена *аРКС* в мотонейронах приводит к уменьшению продолжительности жизни самцов [14]. В настоящей статье представлены результаты более детального изучения роли нейрональной экспрессии *аРКС* в контроле продолжительности жизни, которые подтвердили и существенно расширили имевшиеся данные. Как и ожидалось, уменьшение экспрессии *аРКС* во всех нейронах оказало большее влияние на продолжительность жизни, чем уменьшение экспрессии протеинкиназы в мотонейронах. И в том, и в другом случае степень уменьшения продолжительности жизни зависела от пола – у самцов эффект был более сильным, чем у самок. Зависимость эффекта от пола не раз была отмечена в наших работах, в том числе при изменении уровня экспрессии GSK3 [13, 14], и в

работах других ученых [26], однако причины такого диморфизма пока остаются неясными.

В настоящей работе были использованы две разные линии дрозофилы, вызывающие нокдаун гена *aPKC* в результате РНК-интерференции. На качественном уровне влияние нокдауна *aPKC*, вызванного трансгенами, находящимися в разных линиях, на продолжительность жизни оказалось одинаковым. Это важно, поскольку сделанные в работе выводы основаны на двух независимых вариантах опытов. Однако на количественном уровне эффекты двух разных трансгенов различались. Такие отличия могут быть связаны с тем, что трансгены влияют на разные транскрипты гена *aPKC*: aPKC_НД1 – на все 12 аннотированных транскриптов (https://flybase.org/reports/FBal0323907.html), а aPKC_НД2 – только на транскрипты RG и RJ (https://flybase.org/reports/FBal0278807.html). Эта характеристика трансгенов хорошо соответствует тому факту, что индукция aPKC_НД1 во всех нейронах снизила продолжительность жизни сильнее, чем индукция aPKC_НД2. Однако индукция aPKC_НД1 в мотонейронах вызвала меньший эффект, чем индукция aPKC_НД2. Этот факт можно объяснить, если предположить, что в мотонейронах наиболее важна экспрессия именно RG и/или RJ, а aPKC_НД2 нарушает ее сильнее, чем aPKC_НД1, поскольку малые интерферирующие РНК в первом случае расходуются только на эти два транскрипта, а во втором – на все 12. Конечно, это объяснение является механистическим и нуждается в экспериментальной проверке. В целом о функциях разных транскриптов гена *aPKC* у дрозофилы практически ничего не известно, и для выяснения роли каждого из них нужны дальнейшие исследования.

Наиболее интересным нам представлялся вопрос о том, взаимодействуют ли между собой гены/белки *aPKC*/aPKC и *sgg*/GSK3 в ходе контроля продолжительности жизни. Роль *sgg*/GSK3 в контроле продолжительности жизни была подробно исследована нами ранее [12–14]. Взаимодействие между aPKC и GSK3 также было экспериментально продемонстрировано в ряде работ. Так, было убедительно показано, что у дрозофилы GSK3 способна фосфорилировать aPKC, что может приводить к ее протеасомной деградации и, таким образом, ингибированию в ходе асимметричного деления эмбриональных нейробластов [9] и клеток эмбрионального эпителия [27]. Мы предположили, что такое же взаимодействие между двумя протеинкиназами может играть роль и в контроле продолжительности жизни, участие в котором каждой из них мы уже показали. Действительно, генетические эксперименты, описанные в настоящей статье, указывают на ингибирующее действие GSK3 на aPKC и в этом случае. В ходе контроля асимметричного деления клеток и клеточной полярности GSK3 взаимодействует с aPKC, находящейся в комплексе Par6–Baz–aPKC. Связано ли совместное влияние GSK3 и aPKC на продолжительность жизни с этим комплексом остается пока неясным.

В ряде опубликованных работ можно найти указания на то, что aPKC, в свою очередь, также способна фосфорилировать аминокислотные остатки, определяющие уровень активности GSK3, и таким образом ингибировать ее [21]. Кроме того, оказалось, что комплекс Par6–aPKC регулирует гибель и/или пролиферацию клеток: нарушение экспрессии Par6 подавляет aPKC и повышает активность ее мишени, GSK3, приводя к усилению апоптоза [28]. Наши генетические эксперименты, однако, не выявили ингибирующего действия aPKC на GSK3 в ходе контроля продолжительности жизни. Возможно, участие aPKC и GSK3 в контроле продолжительности жизни не связано с их взаимодействием с Par6–aPKC-комплексом. Стоит отметить также, что наши эксперименты позволяют оценить взаимодействие aPKC и GSK3 не в норме, а в условиях подавления/усиления экспрессии кодирующих их генов. Нельзя исключить, что в этом случае характер взаимодействия двух белков может отличаться от нормального. Правда, и в упомянутых выше работах других авторов взаимодействие белков было проанализировано у особей с измененным уровнем их экспрессии.

Мы показали, что уменьшение уровня экспрессии aPKC в нервной системе приводит к уменьшению продолжительности жизни, но пока неясно, каким может быть эффект увеличения уровня экспрессии aPKC. Известны гены (например, кодирующие белки, участвующие в детоксификации активных форм кислорода), увеличение экспрессии которых приводит к увеличению продолжительности жизни (https://genomics.senescence.info/genes/index.html). Кажется наиболее вероятным, однако, что любое сильное нарушение экспрессии генов, кодирующих такие многофункциональные белки как aPKC и GSK3, должно приводить к многочисленным сбоям в работе клеток и уменьшению продолжительности жизни. В то же время можно ожидать, что небольшие изменения экспрессии этих генов могут быть связаны с тонкой перенастройкой работы клеток и увеличением продолжительности жизни, Так, ранее мы показали, что небольшое снижение активности GSK3 в дофаминэргических нейронах связано с увеличением продолжительности жизни самок [14]. Можно предположить, что увеличение уровня экспрессии aPKC в дофаминэргических

нейронах самок приведет к частичному ингибированию активности GSK3 и вследствие этого к увеличению продолжительности жизни. Экспериментальная проверка этого предположения позволит лучше понять, влияет ли aPKC на GSK3 в процессе контроля продолжительности жизни.

Регуляция механизмов клеточной полярности является одним из наиболее охарактеризованных процессов, в которых взаимодействуют GSK3 и aPKC, в том числе фосфорилируя общие мишени, такие как белок Par-1. На локализацию белка Par-1, вовлеченного в определение полярности клеточных компонентов Baz и Par-6 в эпителиальных клетках и ооцитах плодовой мушки, влияет фосфорилирование протеинкиназой aPKC [29]; одновременно с этим Par-1 является непосредственной мишенью фосфорилирования GSK3 [30]. Par-1 претендует на роль связующего звена между GSK3 и aPKC и в других молекулярных процессах, таких как Wnt-каскад [31]. В процессе регуляции работы ассоциированных с микротрубочками белков (MAP) одной из мишеней фосфорилирования киназами Par-1 и GSK3 является белок Tau [32, 33]. Стоит отметить, что белок Tau является одной из перспективных мишеней в изучении молекулярных основ ассоциированных со старением заболеваний нервной системы.

В настоящее время сведения о взаимодействии aPKC и GSK3 носят достаточно ограниченный характер и касаются их совместной работы лишь в ходе регуляции отдельных процессов. Тем не менее даже имеющиеся факты свидетельствуют о том, что взаимодействие между aPKC и GSK3 может быть достаточно сложным и неоднозначным. Наши генетические эксперименты также свидетельствуют о том, что в мотонейронах самок, например, взаимодействие между aPKC и GSK3 может быть достаточно сложным. Исследование влияния уровня экспрессии aPKC и GSK3 в мотонейронах самок на продолжительность жизни представляется особенно интересным, поскольку ранее мы показали, что небольшое увеличение активности GSK3 в них приводит к увеличению продолжительности жизни [14]. Выяснение механизмов взаимодействия между aPKC, GSK3 и другими их партнерами позволит углубить и расширить наши представления о причинах долголетия и способах продления жизни.

Мы выражаем глубокую признательность Центру культур *Drosophila* (Блюмингтон, США, https://bdsc.indiana.edu/index.html) за многолетнее содействие нашим исследованиям. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием НИЦ “Курчатовский институт” – ИМГ.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 19-34-80042-мол_эв_а и Государственным заданием НИЦ “Курчатовский институт” – ИМГ, регистрационный № 121030200227.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L. et al.* The hallmarks of aging // Cell. 2013. V. 153. № 6. P. 1194–1217. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039
2. *Hipp M.S., Kasturi P., Hartl F.U.* The proteostasis network and its decline in ageing // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. V. 20. № 7. P. 421–435. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y
3. *Vilchez D., Boyer L., Morantte I. et al.* Increased proteasome activity determines human embryonic stem cell identity // Nature. 2012. V. 489. № 7415. P. 304–308. https://doi.org/10.1038/nature11468
4. *Schröter F., Adjaye J.* The proteasome complex and the maintenance of pluripotency: Sustain the fate by mopping up? // Stem Cell Research & Therapy. 2014. V. 5. № 1. P. 24. https://doi.org/10.1186/scrt413
5. *Moore D., Pilz G., Araúzo-Bravo M. et al.* A mechanism for the segregation of age in mammalian neural stem cells // Science. 2015. V. 349. № 6254. P. 1334–1338. https://doi.org/10.1126/science.aac9868
6. *Loyer N., Januschke J.* Where does asymmetry come from? Illustrating principles of polarity and asymmetry establishment in *Drosophila* neuroblasts // Curr. Opinion in Cell Biology. 2020. V. 62. P. 70–77. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.018
7. *Gallaud E., Pham T., Cabernard C. Drosophila melanogaster* neuroblasts: A model for asymmetric stem cell divisions // Results Probl. Cell Differ. 2017. V. 61. P. 183–210. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53150-2_8
8. *Shao C.Y., Crary J.F., Rhao C. et al.* Atypical protein kinase C in neurodegenerative disease II: PKCiota/lambda in tauopathies and alpha-synucleinopathies // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2006. V. 65. № 4. P. 327–335. https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000218441.00040.82
9. *Colosimo P.F., Liu X., Kaplan N.A., Tolwinski N.S.* GSK3beta affects apical-basal polarity and cell-cell adhesion by regulating aPKC levels // Dev. Dyn. 2010. V. 239. № 1. P. 115–125. https://doi.org/10.1002/dvdy.21963
10. *Beurel E., Grieco S.F., Jope R.S.* Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases // Pharmacol. Ther. 2015. V. 148. P. 114–131. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016

11. *Souder D.C., Anderson R.M.* An expanding GSK3 network: Implications for aging research // Geroscience. 2019. V. 41. № 4. P. 369–382. https://doi.org/10.1007/s11357-019-00085-z

12. *Тростников М.В., Веселкина Е.Р., Кременцова А.В. и др.* Инсерционные мутации гена shaggy, кодирующего протеинкиназу GSK3, увеличивают продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2019. Т. 55. № 9. С. 1099–1104. https://doi.org/10/1134/S0016675819090170

13. *Trostnikov M.V., Roshina N.V., Boldyrev S.V. et al.* Disordered expression of shaggy, the *Drosophila* gene encoding a serine-threonine protein kinase GSK3, affects the lifespan in a transcript-, stage-, and tissue-specific manner // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 9. https://doi.org/10.3390/ijms20092200

14. *Trostnikov M.V., Veselkina E.R., Krementsova A.V. et al.* Modulated expression of the protein kinase GSK3 in motor and dopaminergic neurons increases female lifespan in *Drosophila melanogaster* // Front. Genet. 2020. V. 11. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00668

15. *Bourouis M.* Targeted increase in shaggy activity levels blocks wingless signaling // Genesis. 2002. V. 34. № 1–2. P. 99–102. https://doi.org/10.1002/gene.10114

16. *Wilmoth J.R., Horiuchi S.* Rectangularization revisited: Variability of age at death within human populations // Demography. 1999. V. 36. № 4. P. 475–495.

17. *Carey J.R.* Longevity: The Biology and Demography of Lifespan. Princeton, NT: Princeton Univ. Press, 2003.

18. *Wagh D.A., Rasse T., Asan E. et al.* Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila* // Neuron. 2006. V. 49. № 6. P. 833–844. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.008

19. *Franco B., Bogdanik L., Bobinnec Y. et al.* Shaggy, the homolog of glycogen synthase kinase 3, controls neuromuscular junction growth in *Drosophila* // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 29. P. 6573–6577. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1580-04.2004

20. *McGraw E.A., O'Neill S.L.* Wolbachia pipientis: Intracellular infection and pathogenesis in *Drosophila* // Curr. Opin. Microbiol. 2004. V. 7. № 1. P. 67–70. https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.12.003

21. *Moore S.F., van den Bosch M.T.J., Hunter R.W. et al.* Dual regulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3)α/β by protein kinase C (PKC)α and Akt promotes thrombin-mediated Integrin αIIbβ3 activation and granule secretion in platelets // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 6. P. 3918–3928. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.429936

22. *Hapak S.M., Rothlin C.V., Ghosh S.* aPKC in neuronal differentiation, maturation and function // Neuronal Signal. 2019. V. 3. № 3. P. NS20190019. https://doi.org/10.1042/NS20190019

23. *Cuesto G., Jordán-Álvarez S., Enriquez-Barreto L. et al.* GSK3β inhibition promotes synaptogenesis in *Drosophila* and mammalian neurons // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. P. e0118475. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118475

24. *Chiang A., Priya R., Ramaswami M. et al.* Neuronal activity and Wnt signaling act through Gsk3-beta to regulate axonal integrity in mature *Drosophila* olfactory sensory neurons // Development. 2009. V. 136. № 8. P. 1273–1282. https://doi.org/10.1242/dev.031377

25. *Ruiz-Cañada C., Budnik V.* Introduction on the use of the *Drosophila* embryonic/larval neuromuscular junction as a model system to study synapse development and function, and a brief summary of pathfinding and target recognition // Int. Rev. Neurobiol. 2006. V. 75. P. 1–31. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)75001-2

26. *Tower J.* Sex-specific gene expression and lifespan regulation // Trends Endocrinol. Metab. 2017. V. 28. № 10. P. 735–747. https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.07.002

27. *Kaplan N.A., Colosimo P.F., Liu X., Tolwinski N.S.* Complex interactions between GSK3 and aPKC in *Drosophila* embryonic epithelial morphogenesis // PLoS One. 2011. V. 6. № 4. P. e18616. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018616

28. *Kim M., Datta A., Brakeman P. et al.* Polarity proteins PAR6 and aPKC regulate cell death through GSK-3β in 3D epithelial morphogenesis // J. Cell Sci. 2007. V. 120. № 14. P. 2309–2317. https://doi.org/10.1242/jcs.007443

29. *Jiang H., McKinley R.F.A., McGill M.A. et al.* Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: Critical roles of GSK-3β and its upstream regulators // Cell. 2005. V. 120. № 1. P. 123–135. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.033

30. *Kosuga S., Tashiro E., Kajioka T. et al.* GSK-3beta directly phosphorylates and activates MARK2/PAR-1 // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 52. P. 42715–42722. https://doi.org/10.1074/jbc.M507941200

31. *Sun T.Q., Lu B., Feng J.J. et al.* PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling // Nat. Cell Biol. 2001. V. 3. № 7. P. 628–636. https://doi.org/10.1038/35083016

32. *Nance J., Zallen J.A.* Elaborating polarity: PAR proteins and the cytoskeleton // Development. 2011. V. 138. № 5. P. 799–809. https://doi.org/10.1242/dev.053538

33. *Nishimura I., Yang Y., Lu B.* PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila* // Cell. Elsevier. 2004. V. 116. № 5. P. 671–682. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00170-9

The Effect of the *aPKC* Gene Encoding Atypical Protein Kinase C on the Lifespan of *Drosophila melanogaster* Depends on the Expression Level of Protein Kinase GSK3

M. V. Trostnikov[a, *], E. R. Veselkina[a], Y. A. Andreev[a], A. Y. Khryachkova[a], N. V. Roshina[a, b], and E. G. Pasyukova[a]

[a] *Institute of Molecular Genetics of the National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia*
[b] *Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
**e-mail: mikhail.trostnikov@gmail.com*

Drosophila melanogaster *shaggy* and *aPKC* genes encode highly conserved GSK3 (Glycogen Syntase Kinase 3) and aPKC (Protein Kinase C) proteinkinases that play key roles in many cellular processes. We previously demonstrated that changes in *shaggy* expression in neurons affect lifespan. In this article we show that changing the expression of the *aPKC* gene in neurons also affects lifespan. Changing the expression of the two protein kinases in all male or female neurons and in male motoneurons led to changes in lifespan, indicating that aPKC has no effect on GSK3 and GSK3 has a possible inhibitory effect on aPKC. At the same time, changes in the expression of two protein kinases in female motoneurons led to changes in lifespan, indicating the existence of a still unclear mechanism of interaction between these proteins. The elucidation of the mechanisms of interaction between aPKC, GSK3 and their other partners will deepen and expand our understanding of the causes of longevity and the ways to extend life.

Keywords: lifespan, nervous system, protein kinase aPKC, protein kinase GSK3, *Drosophila melanogaster.*