

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

СТРІЛЬБИЦЬКА ОЛЬГА МИХАЙЛІВНА

УДК 577.24, 57.021, 57.022, 57.023

**РЕГУЛЯЦІЯ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTER* ШЛЯХОМ МОДУЛЯЦІЇ СИГНАЛЬНОЇ СИСТЕМИ  
TOR/IS/MYC У СТОВБУРОВИХ КЛІТИНАХ КИШКІВНИКА**

03.00.04 – біохімія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Львів – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Прикарпатському національному університеті імені Василя Стефаника Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник:** кандидат біологічних наук  
**Луцак Олег Володимирович**  
Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника

**Офіційні опоненти:** доцент кафедри біохімії та біотехнології  
доктор біологічних наук  
**Гавриляк Вікторія Василівна**  
Національний університет «Львівська політехніка»  
професор кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології.

кандидат біологічних наук  
**Матійців Наталія Петрівна**  
Львівський національний університет імені Івана Франка  
доцент кафедри генетики і біотехнології.

Захист відбудеться 6 листопада р. о 11:30 год на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 у Львівському національному університеті імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, біологічний факультет, ауд. № 333.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розіслано 2 жовтня 2020 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14  
кандидат біологічних наук, доцент

М. В. Бура

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Протягом багатьох десятиліть плодова мушка *Drosophila melanogaster* використовується як модельний об'єкт для встановлення генетичних механізмів старіння завдяки відносній простоті геному, короткому життєвому циклу, чисельності нащадків та високій консервативності генів та сигнальних шляхів (Piper and Partridge, 2018). Окрім того, дрозофіла характеризується зручністю у вивченні біології та легкістю у застосуванні різних методів генетики. Багато досліджень вказують на консервативність механізмів контролю експресії генів, функціонування сигнальних шляхів та регуляції тривалості життя. Це є початковим етапом в можливій екстраполяції даних, отримані на дрозофілі для дослідження інших організмів, в тому числі й для детального вивчення функціонування людського організму.

Травний тракт плодової мушки забезпечує травлення та всмоктування поживних речовин. Окрім того, він функціонує як перша лінія захисту від патогенів, бере участь у збереженні енергетичного гомеостазу за участю ендокринних сигналів (Lemaitre and Miguel-Aliaga, 2013). Регенеративні процеси у кишківнику *Drosophila* критично важливі для збереження проліферативного гомеостазу (Wen et al., 2017). Тому проліферація та диференціація стовбурових клітин кишківника (СКК) знаходяться під контролем сигнальних шляхів Notch, JAK/STAT, EGFR, TOR та інсулінового сигнального шляху (Beebe et al., 2010; Jiang et al., 2009; Lin et al., 2008). На сьогодні, встановлено як ці сигнальні шляхи у стовбурових клітинах кишківника впливають на функціонування клітин ніші, на збереження проліферативного гомеостазу і функціонування кишківника (Kapuria et al., 2012), тобто на локальні процеси, які відбуваються у кишківнику. Механізми підтримання функціонування даних сигнальних шляхів відіграють ключову роль у регуляції тривалості життя еукаріотів. Контроль активності даних сигнальних шляхів як метод запобігання виникнення гіперпроліферативних захворювань детально вивчається науковцями останнім часом. Однак, як функціонування сигнальних шляхів у невеликій популяції стовбурових клітин кишківника впливає на фізіологічні процеси на рівні організму вивчено недостатньо. Тому доцільним виглядає дослідження ролі сигнальних шляхів TOR, IS, транскрипційного фактору Мус та їх взаємодія у регуляції функціонування одних з найвпливовіших структурних елементів організму плодової мушки – стовбурових клітин та їх недиференційованих похідних ентеробластів, що проявляється у змінах фізіологічного стану, біохімічних показників та експресії багатьох генів.

**Зв'язок даної роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота проводилась з 2013 по 2019 рік на кафедрі біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника та є частиною наукової тематики кафедри "Вивчення механізмів пристосування організмів до несприятливих умов середовища з метою розробки методів підвищення їх адаптаційного потенціалу" (№ держреєстрації – 0107U001367).

Окремі експерименти були проведені на кафедрі Молекулярної біології Гайдельберзького університету (м. Гайдельберг, Німеччина).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було дослідити роль активності сигнальних шляхів TOR, IS та надекспресії транскрипційного фактору Мус у стовбурових клітинах кишківника та ентеробластах на фізіолого-біохімічний стан плодової мушки *Drosophila melanogaster*. Для реалізації мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити тривалість життя експериментальних мух із інгібуванням/активацією сигнальних шляхів TOR, IS та надекспресією Мус за стандартних умов, а також за умов голодування та дії оксиданта.
2. Перевірити тривалість життя дослідних мух за умов нестачі поживних при споживанні харчових раціонів різного складу.
3. Визначити кількість спожитої їжі та плодючість самок із інгібуванням/активацією сигнальних шляхів TOR, IS та надекспресією Мус.
4. Дослідити як інгібування/активація сигнальних шляхів TOR, IS та надекспресія Мус впливає на вміст циркулюючих вуглеводів, а також запасних вуглеводів та триацилгліцеролів у тілі експериментальних мух.
5. Проаналізувати зміни рівня мРНК генів, які кодують білки залучені у регуляцію метаболізму, за умов активації чи інгібування TOR, IS та надекспресії Мус у стовбурових клітинах кишківника та ентеробластах.
6. Проаналізувати дані рівня мРНК генів, які кодують компоненти сигнальних шляхів JAK/STAT та EGFR, які беруть участь у збереженні гомеостазу кишківника.

*Об'єкт дослідження* – функціонування стовбурових клітин кишківника та ентеробластів за умов активації чи інгібування сигнальних шляхів TOR, IS та надекспресії транскрипційного фактору Мус.

*Предмет дослідження* – тривалість життя *D. melanogaster*, стійкість до нестачі поживних речовин, голодування та оксидативного стресу, вміст основних метаболітів в тілі та гемолімфі, рівень мРНК генів, які кодують білки залучені у регуляції метаболізму та підтриманні гомеостазу кишківника.

*Методи дослідження.* У роботі використовували фізіологічні методи – визначення тривалості життя, стійкості до стресів, плодючості, кількості спожитої їжі; біохімічні методи – визначення вмісту триацилгліцеролів, глюкози, глікогену; методи молекулярної біології – вимірювання відносного рівня мРНК; генетичні – метод схрещування; селекція особин за певними ознаками; методи математичної статистики.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Робота зосереджена на вивченні механізмів регуляції функціонування СКК та ЕБ *Drosophila* шляхом взаємодії сигнальних шляхів TOR та IS, які мають спільну мішень – протоонкоген Мус. Вперше встановлена роль компонентів сигнальних шляхів TOR, IS та транскрипційного фактору Мус для регуляції тривалості життя,

стійкості до стресів, плодючості, споживання їжі, метаболізму та гомеостазу кишківника *Drosophila*, що реалізується шляхом модуляції функціонування СКК та ЕБ. Вперше виявлено, що будь-яка модуляція активності сигнальних шляхів TOR та IS скорочує тривалість життя експериментальних особин, що вказує про важливість підтримання гомеостазу СКК. Про зміни гомеостазу кишківника можна робити висновки за рівнем мРНК генів *upd2*, *upd3*, *soc36*, *spi*, *krrn*, *vn*, *pus*, *dilp3*, які регулюють процеси диференціації та проліферації СКК та ЕБ, що може мати безпосередній вплив на скорочення тривалості життя експериментальних мух. Вперше встановлено склад низькокалорійних дієт, при яких спостерігається продовження тривалості життя експериментальних самок із активацією/інгібуванням TOR та IS. Виявлені зміни вмісту основних метаболітів у тілі експериментальних та дослідних мух, а також зміни рівнів мРНК метаболічних генів. Вперше встановлені можливі механізми, за участі яких сигнальна система TOR/IS/Мус у стовбурових клітин впливає на метаболізм та фізіологічні процеси на рівні організму. Тому, отримані дані відкривають нові перспективи у дослідженнях фізіологічних та метаболічних процесів плодової мушки.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані результати дисертаційного дослідження можуть бути використані при розробці нових підходів до продовження тривалості життя та покращення фізіологічного стану організму, що полягають у встановленні механізмів передачі сигналів, розробці нових підходів у лікуванні метаболічних та пов'язаних з віком захворювань. Окрім того, сигнальні шляхи TOR, IS та транскрипційний фактор Мус залучені в регуляції інтенсивності росту, а також процесів проліферації клітин, що дає змогу внести нові дані для встановлення детальних молекулярних механізмів та методів запобігання виникненню ракових захворювань. Встановлені особливості впливу сигнальних шляхів у невеликій кількості стовбурових клітин кишківника на фізіологічний стан цілого організму можуть бути враховані при використанні *D. melanogaster* як моделі для дослідження механізмів різних патологічних станів. Представлені результати поглиблюють знання про регуляторну роль сигнальних шляхів TOR, IS та транскрипційного фактору Мус у стовбурових клітинах та будуть використані при викладанні таких дисциплін як біохімія, молекулярна біологія, біохімія адаптацій, а деякі методичні підходи будуть запозичені для виконання курсових і дипломних робіт на кафедрі біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційне дослідження виконане під керівництвом кандидата біологічних наук, доцента кафедри біохімії та біотехнології Луцака О.В. Автором дисертаційної роботи самостійно проведений аналіз наукової літератури, виконана основна частина експериментальної роботи і статистична обробка даних. Визначення рівня мРНК генів виконано спільно з науковим керівником на кафедрі Молекулярної біології Гайдельберзького університету. Планування роботи, аналіз та обговорення отриманого матеріалу, приготування рукописів статей проводилося з науковим керівником Луцаком О.В. Допомогу при виконанні

експериментів здійснювала аспірантка Семанюк У.В. кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету ім. В. Стефаника. Всі розділи дисертації написані автором самостійно.

**Апробація результатів дисертації.** Основні наукові положення, висновки дисертаційної роботи були представлені на таких наукових подіях як “Шевченківська весна 2015: біологічні науки” (Київ, 2015); IV регіональному симпозіумі “Єдине здоров’я” (Київ, 2019); звітно-наукових конференціях та засіданнях кафедри біохімії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника (Івано-Франківськ, 2013-2019).

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 7 статтях у міжнародних наукових виданнях, які належать до наукометричної бази Scopus, 3 тезах доповідей наукових конференцій.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 164 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел, додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 125 сторінок друкованого тексту. Робота включає 6 таблиць, 48 рисунків, 2 схеми та 3 додатки. Список використаних джерел містить 232 найменування.

Автор висловлює щире подяку своєму науковому керівнику кандидату біологічних наук О. В. Луцаку за постійну увагу, корисні поради та підтримку під час написання дисертації. Особливо вдячні кафедрі Молекулярної біології Гайдельберзького університету за можливість проведення ПЛР аналізу.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури.** Узагальнено дані про роль сигнальних шляхів, які чутливі до надходження поживних речовин, у регуляції функціонування СКК, та, як наслідок, старіння цілого організму. Проаналізовано сучасні уявлення про взаємозв’язок між активністю стовбурових клітин кишківника та тривалістю життя. Подано короткі відомості про участь сигнальних шляхів, чутливих до поживних речовин, а саме – IS та TOR, спільною мішенню для яких є транскрипційний фактор Мус, у регуляції функціонування стовбурових клітин.

**Матеріали і методи досліджень.** У роботі використовували плодову мушку *Drosophila melanogaster* наступних ліній:  $w^{1118}$ , *esc-Gal4Gal80<sup>ts</sup>* (*escargot-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80<sup>ts</sup>*), *suh-Gal4Gal80<sup>ts</sup>* (*Su(H)GBE-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80<sup>ts</sup>*), *UAS-tor-RNAi*, *UAS-rheb*, *UAS-inr-RNAi*, *UAS-pten-RNAi*, *UAS-myc-rheb*.

Для отримання експериментальних мух використовували чутливу до температури Gal4-UAS систему (Brand and Perrimon, 1993). Незайманих самок лінії *esc-Gal4Gal80<sup>ts</sup>* (для модуляції сигнальної системи у стовбурових клітинах та їх недиференційованих похідних ентеробластах) та *suh-Gal4Gal80<sup>ts</sup>* (для модуляції сигнальної системи тільки в ентеробластах) схрещували з самцями, які містили у геномі різні послідовності під UAS. Для інгібування сигнального шляху TOR використовували *UAS-tor-RNAi*, а для його активації – *UAS-rheb*. Інгібування інсулінового сигнального шляху відбувалось при використанні лінії *UAS-inr-RNAi*, а його активація – *UAS-pten-RNAi*. Окрім того,

для активації TOR/Мус проводили схрещування з самцями *UAS-myc-rheb*. Контрольних особин отримували шляхом схрещування самок *esc-Gal4Gal80<sup>ts</sup>* та *suh-Gal4Gal80<sup>ts</sup>* із самцями лінії *w<sup>1118</sup>*.

Для визначення тривалості життя мух поміщали у демографічні клітки, до яких прикріплювали пластикову пробірку з 5 мл середовища наступного складу у % (маса/об'єм): 5% сухих дріжджів, 5% сахарози, 1,2% агару та 0,18% ніпагіну (5%С+5%Д). Через кожні два дні середовище заміняли на свіже і підраховували кількість мертвих мух. Для оцінки тривалості життя мух за стресових умов їх поміщали у пластикові пробірки, які містили середовища наступного складу: недоїдання – 1% сахароза; 1% дріжджі; 0,5% сахароза та 0,5% дріжджі; повного голодування – 0,5% агароза; оксидативного стресу – 20 мМ менадїон у 5% сахарозі.

Кількість спожитої їжі експериментальними мухами реєстрували за допомогою капілярного методу SAFE (capillary feeding assay) (Ja et al., 2007).

Концентрацію глюкози визначали колориметричним, ензиматичним глюкозооксидазним методом з використанням діагностичного набору Liquick Cor-GLUCOSE, P.Z. Cormay S.A. (Польща). Білки гемолімфи та надосадових рідин осаджували після теплової денатурації. Для визначення вмісту глікогену у досліджуваних пробах проводили його ферментативне розщеплення до залишків глюкози за допомогою амілоглюкозидази. Визначення вмісту триацилгліцеролів проводили з використанням колориметричного, ензиматичного методу, принцип якого полягає в ферментативному розщепленні з наступним фосфорилуванням гліцеролу та його окисненням. В результаті окислення глюкози та гліцеролу утворюються забарвлені продукти, інтенсивність забарвлення яких реєстрували на спектрофотометрі Specoll-211.

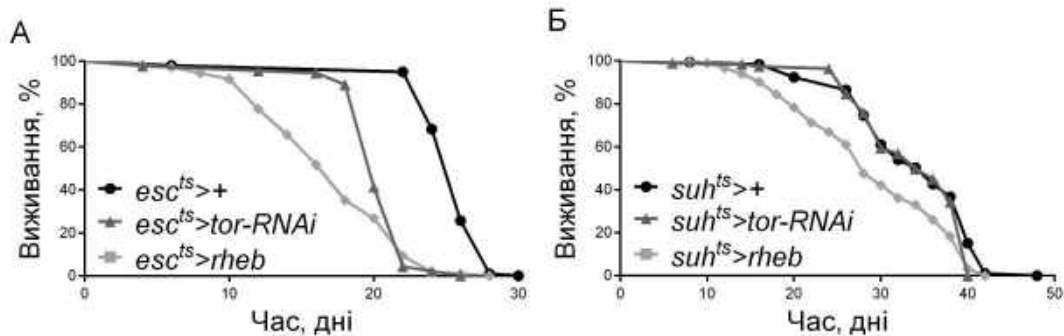
Для виявлення порушення цілісності кишківника проводили аналіз «Смурф». До експериментального середовища додавали синій харчовий барвник E133 (Rera et al., 2012). Мухи фенотипу «Смурф» характеризувались поширенням синього барвника по цілому тілу, що свідчить про порушення цілісності кишківника.

Загальну кількість мРНК визначали для певних генів у головах мух (*dilp2*, *dilp3*, *dilp5*), кишківниках (*upd2*, *upd3*, *soc36*, *spi*, *krn*, *vn*, *dilp3*, *perck*, *puc*) та тілах (*dilp6*, *akh*, *tobi*, *perck*, *bmm*, *4ebp*) методом ланцюгової полімеразної реакції в реальному часі. мРНК виділяли та стабілізували за допомогою набору RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). Після виділення мРНК, проводили синтез кодуєчого ДНК фрагменту (кДНК). Ген *rp49* (*ribosomal protein 49*) використовували як референтний для досліджуваних генів у головах та цілих мухах, а також *crq* (*croquemort*) – як референтний ген для аналізу у кишківнику.

Статистичне порівняння кривих виживання виконували за допомогою комп'ютерної програми R-project (R Foundation for Statistical Computing), при цьому використовували Log-rank тест. Статистичну обробку параметричних даних виконували з використанням програми „Prism” (GraphPad Software, Inc.). Дані подані як середнє значення (M) та похибка середнього значення (m). Порівняння різниці між середнім арифметичним виконували за допомогою критерію Стюдента (Student's t test).

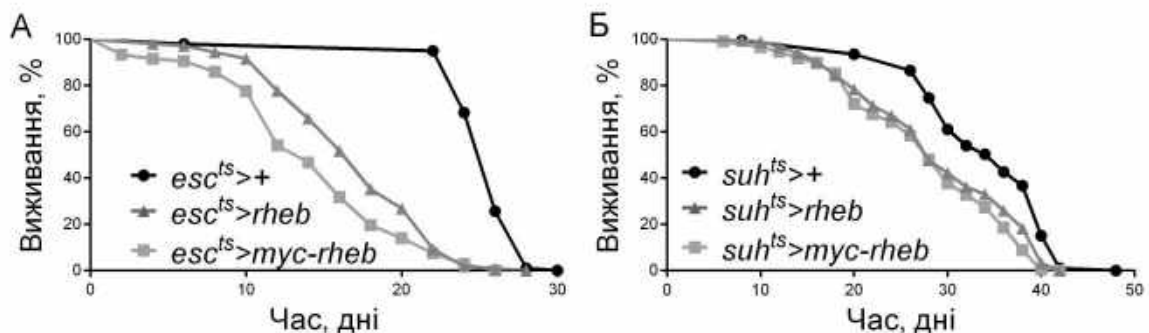
## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Тривалість життя та стійкість до умов нестачі поживних речовин при модуляції TOR/IS/Мус у стовбурових клітинах кишківника *Drosophila*. Встановлена важлива роль сигнальних шляхів TOR, IS та транскрипційного фактору Мус у регуляції фізіологічних процесів, що, ймовірно, відбувається шляхом модуляції функціонування стовбурових та похідних стовбурових клітин *D. melanogaster*. В ході експерименту виявили, що як активація (надекспресія *rheb*), так і інгібування (нокдаун *tor*) сигнального шляху TOR в обох типах клітин призводили до скорочення тривалості життя мух (Рис. 1А, Б).



**Рис. 1.** Тривалість життя особин *D. melanogaster* із нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах кишківника(А) або ентеробластах (Б).

Як TOR, так і Мус беруть участь у регуляції клітинного росту, біогенезу рибосом, метаболізму, що у свою чергу, впливає на тривалість життя. Мухи, у яких здійснювали надекспресію *mus-rheb* в *esc*-клітинах проявляли значно нижчу тривалість життя як порівняно з контрольною групою *esc<sup>ts</sup>>+* (на 44%), так і з *esc<sup>ts</sup>>rheb* (на 16%) (Рис. 2А). Надекспресія *mus-rheb* і *rheb* тільки в ентеробластах також скорочувала тривалість життя мух на 18% у порівнянні із контролем (Рис. 2Б).



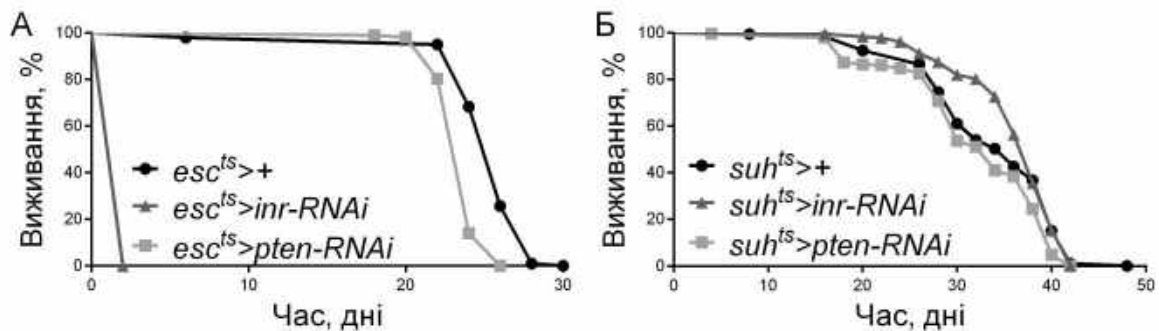
**Рис. 2.** Тривалість життя особин *D. melanogaster* із надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах кишківника(А) або ентеробластах (Б).

Відомо, що інсуліновий сигнальний шлях (IS – insulin signaling) бере участь у регуляції процесів росту, розмноження, метаболізму та тривалості життя і консервативний від нематод до людини (Clancy et al., 2001). Наші результати показали, що інгібування сигнального шляху IS через експресію *inr-RNAi* призводить до загибелі особин вже на другу добу, що свідчить про



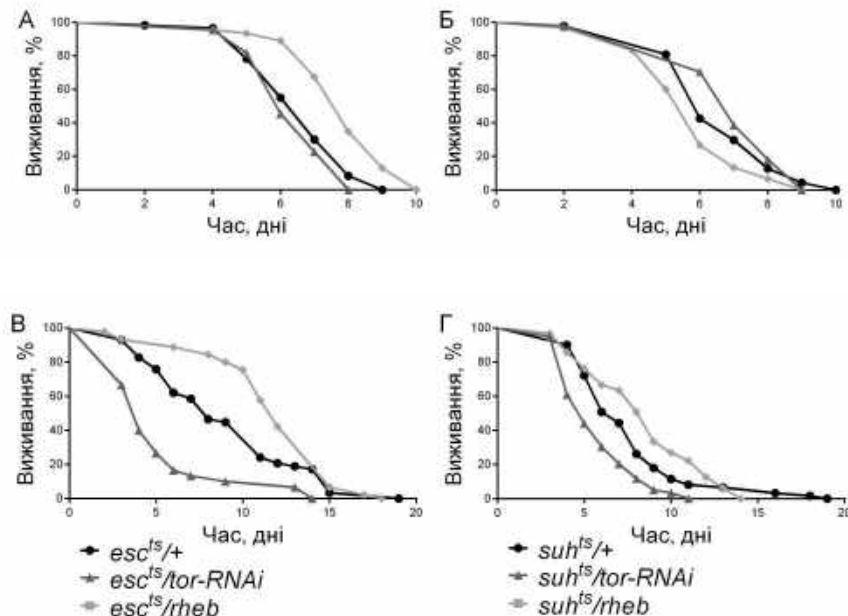
визначальну роль інсулінового рецептору у функціонуванні СКК (Рис. 3А). Середня тривалість життя мух генотипу *suh<sup>ts</sup>>inr-RNAi* не відрізнялася від такої у контрольних мух (Рис. 3Б). Активація IS в *esc*-клітинах не впливала на тривалість життя (Рис. 3А), однак дана маніпуляція у *suh*-клітинах скорочувала середню тривалість життя експериментальних мух на 11% (Рис. 3Б).

Обмеження доступності поживних речовин – це один із найефективніших зовнішніх стресових факторів, який відіграє центральну роль у регуляції фізіологічного та біохімічного стану організму. Тому, аналіз стійкості до недоїдання та голодування є важливим для оцінки ролі функціонування СКК та ЕБ у регуляції фізіологічних процесів дрозофіли.



**Рис. 3.** Тривалість життя особин *D. melanogaster* із нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах кишківника(А) або ентеробластах (Б).

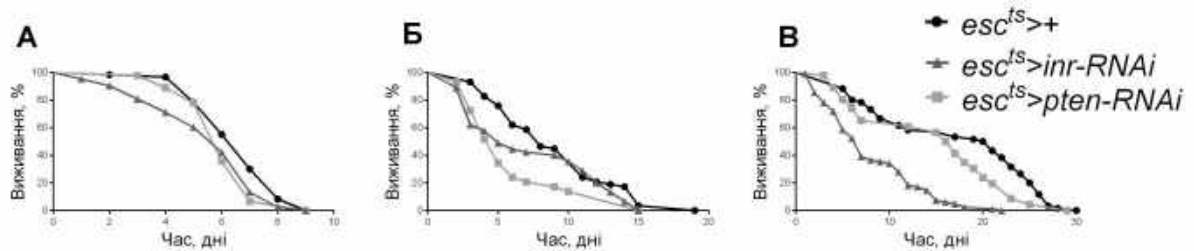
Цікаво, що нестача поживних речовин продовжувала тривалість життя деяких експериментальних груп. Так, при споживанні 1% сахарози (1%С) самками з активованим шляхом TOR за рахунок надекспресії *rheb* у СКК та ЕБ (Рис. 4А), жили на 19% довше, ніж контрольні.



**Рис. 4.** Стійкість мух із нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* до нестачі поживних речовин: 1% сахарози (А – СКК та ЕБ; Б – ЕБ), 1% дріжджового автолізу (В – СКК та ЕБ; Г – ЕБ).

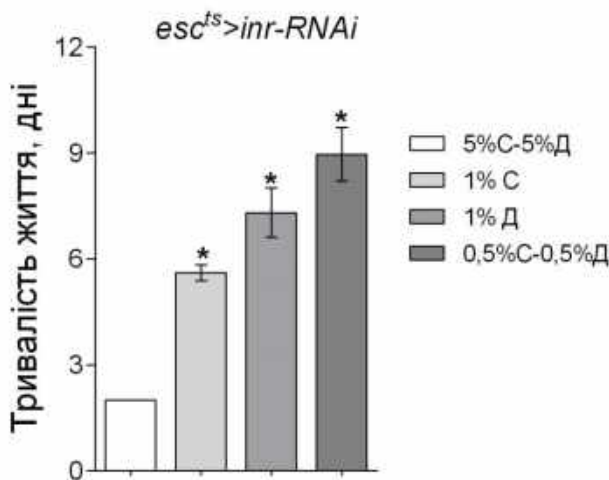
Низький вміст білка у харчовому раціоні мух (1% дріжджів), у яких проводили нокдаун гена *tor* у стовбурових клітинах (Рис. 4В) та ентеробластах (Рис. 4Г), призводив до скорочення тривалості життя на 42 та 35% відповідно.

Цікаво, що підвищення резистентності до даних стресових умов спостерігалось в особин, в яких експресували *rheb* у *esc*-клітинах на 32% та у *suh*-клітинах на 11% порівняно з відповідними контролями. Дані результати демонструють, що активація сигнального шляху TOR може компенсувати вплив умов недоїдання як стресового фактору. Стійкість до недоїдання у мух з надекспресією *inr-RNAi* в *esc*-клітинах була нижчою порівняно з контрольними особинами *esc<sup>ts</sup>>+* (1% С – на 16%; 1% АД – на 15%; 0,5% С + 0,5% АД – на 46%) (Рис. 5).



**Рис. 5.** Стійкість мух із *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) до нестачі поживних речовин: 1% сахарози (А), 1% дріжджового автолізу (Б), 0,5% сахарози та 0,5% дріжджового автолізу (В).

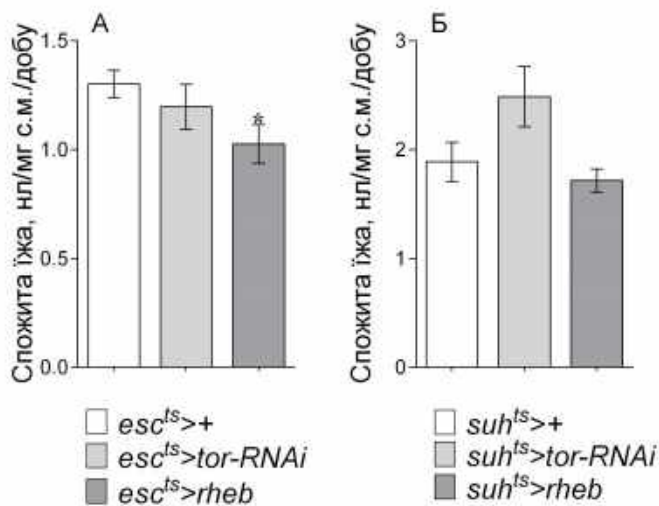
Цікаво, що умови недоїдання продовжували тривалість життя особин генотипу *esc<sup>ts</sup>>inr-RNAi* порівняно із контрольною дієтою. Так, самки даного генотипу жили дві доби на контрольній дієті (5% сахарози та 5% дріжджів), в той час як споживання 1% сахарози (С), 1% автолізованого дріжджів (АД) чи 0,5% С + 0,5% АД продовжувало тривалість життя експериментальних мух до 6, 7 та 9 діб відповідно (Рис. 6).



**Рис. 6.** Середня тривалість життя мух *D. melanogaster* генотипу *esc<sup>ts</sup>>inr-RNAi* при споживанні дієт наступного складу: 5% С - 5% Д, 1% С, 1% Д, 0,5% С - 0,5% Д. Дані подані як середнє ± похибка середнього, n=2-3. \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (5% С - 5% Д).

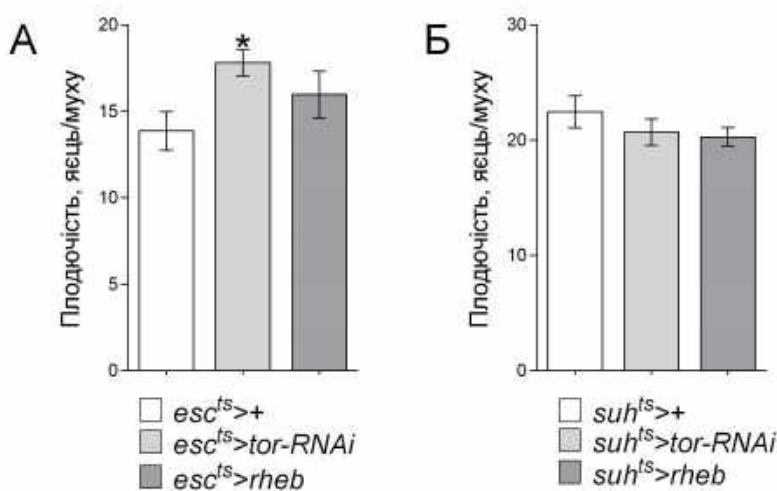
**Споживання їжі та плодючість самок при модуляції TOR/IS/Мус у стовбурових клітинах кишківника *Drosophila*.** Встановлено залежність споживання їжі та плодючості від активності сигнального шляху TOR у стовбурових та похідних клітинах. Надекспресія *rheb* призводила до зниження

кількості спожитої їжі на 30% (Рис. 7А), але не впливала на кількість відкладених яєць (Рис. 7Б). Самки генотипу *esc<sup>ts</sup>>tor-RNAi* відкладали на 22% менше яєць (Рис. 7Б), однак не відрізнялися за кількістю спожитої їжі від контрольних (Рис. 7А). Таким чином, ми показали, що модуляція сигнального шляху TOR у невеликій популяції стовбурових клітин впливає на стан цілого організму. Інгібування IS в *esc*-клітинах знижувало кількість спожитої їжі на 52% порівняно з контрольними особинами (Рис. 8А).



**Рис.8.** Споживання їжі самками з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у *esc*-клітинах (А) або *suh*-клітинах (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=10$ . \*відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Цікаво, що при активації IS дослідні мухи споживали на 43% більше їжі у порівнянні із контрольними *esc<sup>ts</sup>>+* (Рис. 8А). Подібна тенденція прослідковувалась і при дослідженні плодючості експериментальних самок (Рис. 8Б). Нижчу кількість відкладених яєць реєстрували при інгібуванні IS, а вищу – при його активації.

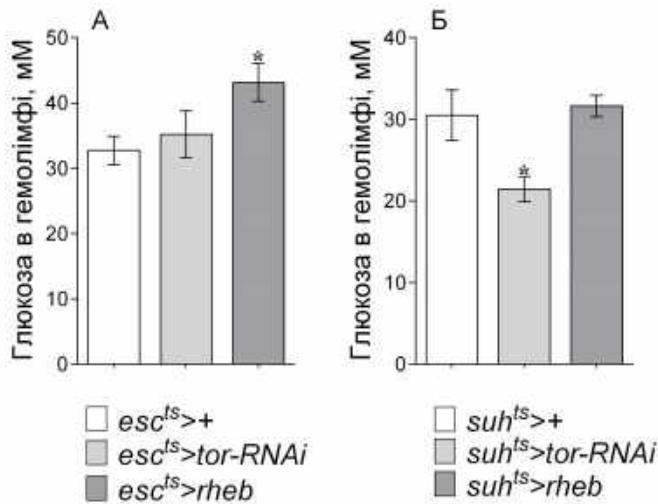


**Рис.9.** Плодючість самок з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у *esc*-клітинах (А) та *suh*-клітинах (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=10$ . \*відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

**Рівень метаболітів вуглеводного та ліпідного обмінів при модуляції TOR/IS та Мус у стовбурових клітинах кишківника *Drosophila*.** Сигнальний шлях TOR та IS регулюють метаболічні процеси у відповідь на зміни зовнішніх факторів (Karahi et al., 2004; Laplante and Sabatini, 2012). Оскільки кишківник бере участь у травленні поживних речовин та регуляції метаболізму, ми

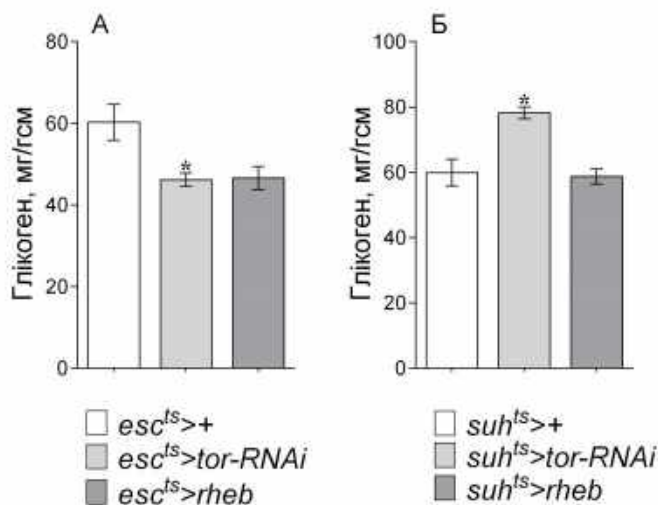
вивчили участь даних сигнальних шляхів у СКК у регуляції метаболізму вуглеводів та ліпідів. Встановили, що при активації TOR (надекспресія *rheb*) концентрація глюкози в гемолімфі була на 25% вищою порівняно з контрольними (Рис. 9А). На 30% нижчу концентрацією глюкози в гемолімфі реєстрували у самок *suh<sup>ts</sup>>tor-RNAi* (Рис. 9Б).

Відомий механізм регуляції запасання вуглеводів за участю сигнального шляху TOR. Контроль експресії генів, які беруть участь у контролі біосинтезу глікогену реалізується транскрипційним фактором Mef2 (Clark et al., 2013).

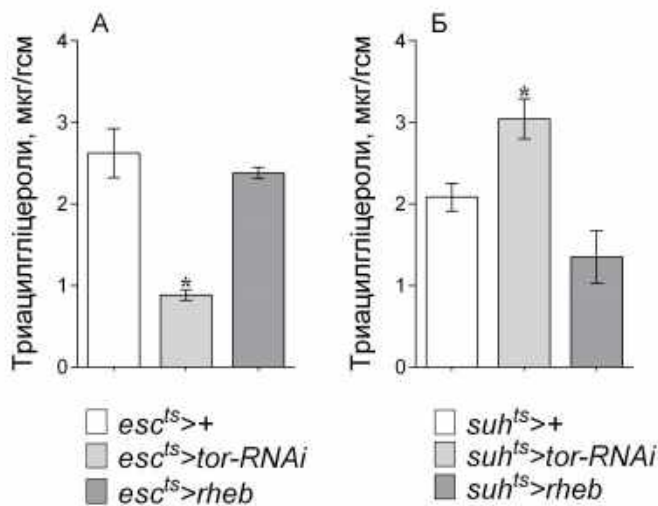


**Рис. 9.** Концентрація глюкози в гемолімфі самок з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у *esc*-клітинах (А) та *suh*-клітинах (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Цікаво, що Mef2 активується шляхом фосфорилування кіназою S6K, яка є компонентом сигнального шляху TOR (Clark et al., 2013). Результати наших експериментів добре узгоджуються з цими дослідженнями, оскільки ми спостерігали нижчий вміст глікогену та ТАГ в тілі самок із заінгібованим шляхом TOR за допомогою експресії *tor-RNAi* в *esc*-клітинах (Рис. 10А, 11А). Однак експресія даного конструкту у *suh*-клітинах підвищувала рівень глікогену та ТАГ (Рис. 10Б, 11Б).

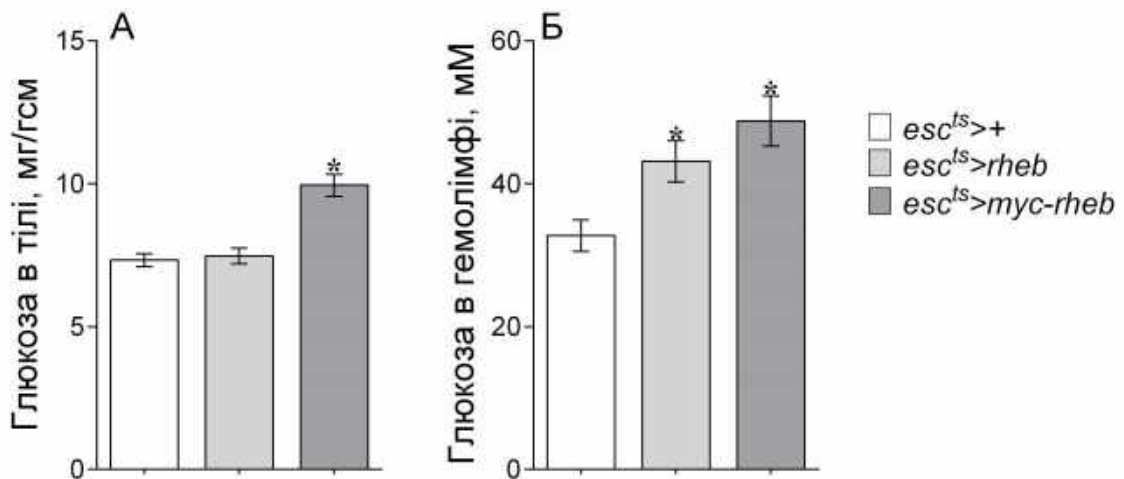


**Рис. 10.** Вміст глікогену в тілі самок з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у *esc*-клітинах (А) та *suh*-клітинах (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).



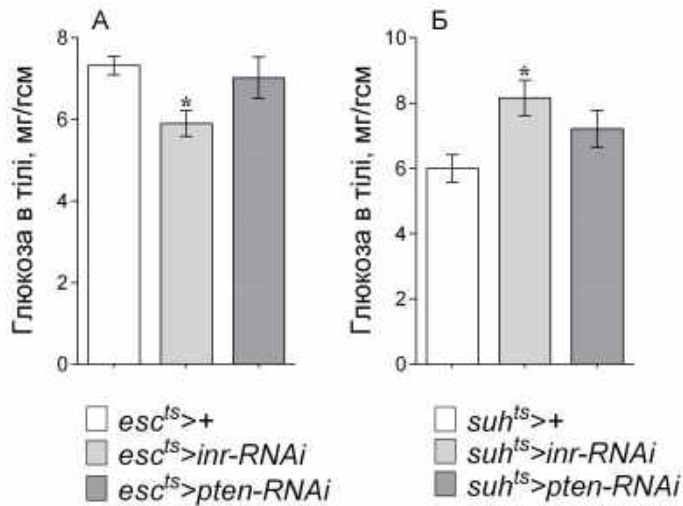
**Рис. 11.** Вміст триацилгліцеролів у тілі самок з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у *esc*-клітинах (А) та *suh*-клітинах (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

За умов активації сигнального шляху TOR/Мус шляхом надекспресії *myc-rheb* у СКК та ЕБ вміст глюкози в тілі мух був на 36% вищим порівняно з контрольними самками (Рис. 12А). Концентрація глюкози в гемолімфі також була на 50% вищою у мух з надекспресією *myc-rheb*, однак надекспресія *rheb* також підвищувала даний показник на 30% (Рис. 12Б).



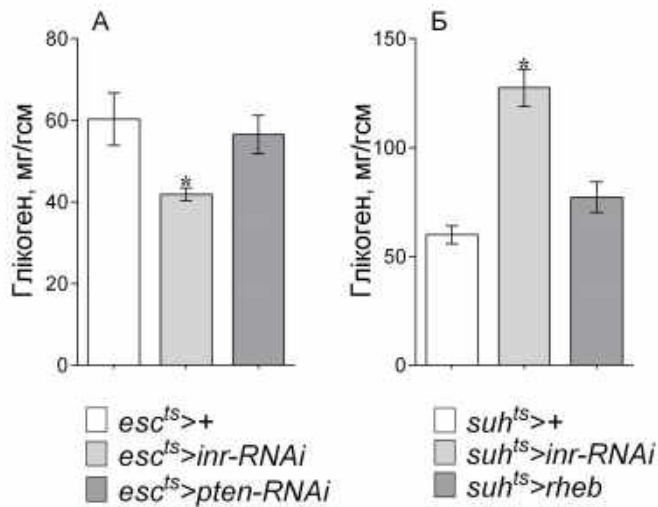
**Рис. 12.** Вміст глюкози в тілі (А) та гемолімфі (Б) самок з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових клітинах і ентеробластах (*esc*-клітини). Результати представлені як середнє ± похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*).

Вміст глюкози в тілі самок *esc<sup>ts</sup>>inr-RNAi* був нижчим на 19% порівняно зі значеннями у контрольних особин (Рис. 13А). Також при інгібуванні IS в *esc*-клітинах спостерігався нижчий вміст глікогену на 40% (Рис. 14А). Протилежна тенденція спостерігалась при модуляції IS тільки в ентеробластах. Так, експресія *inr-RNAi* в ЕБ призводила до підвищення вмісту глюкози в тілі на 36% (Рис. 13Б) та глікогену у 2,1 рази порівняно з мухами контрольного генотипу *suh<sup>ts</sup>>+* (Рис. 14Б).



**Рис. 13.** Вміст глюкози в тілі самок з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у *esc*-клітинах (А) та *suh*-клітинах (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього, n=4. \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Таким чином ми припускаємо, що кишківник дрозоділи у відповідь на зміну активності IS та TOR/Мус у СКК та ЕБ, сигналізує до ЦНС. При цьому, змінюється інтенсивність експресії *dilp2*, 3 або 5 в ІПК, що, в свою чергу, модулює перебіг всього метаболізму *Drosophila*.



**Рис. 14.** Вміст глікогену в тілі самок з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у *esc*-клітинах (А) та *suh*-клітинах (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього, n=4. \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

**Відносний рівень мРНК генів, які кодують компоненти, задіяні у регуляції метаболізму та тривалості життя.** Кишківник плодової мушки у відповідь на надходження поживних речовин відправляє сигнали до центральної нервової системи (ЦНС) для збереження енергетичного гомеостазу та регуляції харчової поведінки (Lemaitre and Miguel-Aliaga, 2013). Ця сигнальна функція реалізується за участю інсуліноподібних пептидів – DILP2, 3, 5 (Kannan and Fridell, 2013). Саме DILP з адипокінетичним гормоном (АКГ), створюють аналогічну людській системі інсулін-глюкагон, яка регулює гомеостаз глюкози та старіння організму (Kim and Rulifson, 2004).

На рисунках 15 та 16 зображено як зміна активностей сигнальних шляхів у СКК та ЕБ впливали на відносний рівень мРНК даних генів.

Гени	<i>esc&gt;tor-RNAi</i>	<i>esc&gt;rheb</i>	<i>esc&gt;myc-rheb</i>	Гени	<i>suh&gt;tor-RNAi</i>	<i>suh&gt;rheb</i>	<i>suh&gt;myc-rheb</i>
<i>dilp2</i>	↑			<i>dilp2</i>	↑	↑	↑
<i>dilp3</i>	↓	↑		<i>dilp3</i>	↓	↑	↑
<i>dilp5</i>				<i>dilp5</i>	↑		
<i>dilp6</i>		↑	↑	<i>dilp6</i>	↑	↑	↑
<i>akh</i>		↑	↑	<i>akh</i>		↑	
<i>tobi</i>	↑		↑	<i>tobi</i>	↑		↑
<i>perck</i>	↓	↑	↑	<i>perck</i>	↑	↑	↑
<i>bmm</i>			↑	<i>bmm</i>			
<i>4ebp</i>		↑	↑	<i>4ebp</i>	↑	↑	↑

**Рис. 15.** Відносний рівень мРНК *dilp2*, *dilp3*, *dilp5* у головах мух, а також *dilp6*, *tobi*, *perck*, *bmm*, *4ebp* – у тілах мух з нокдауном *tor*, надекспресією *rheb* або *myc-rheb*.

Окрім того, зображені спільні ефекти від модуляції сигнального шляху у *esc*- та *suh*-клітинах. Так, наші дослідження демонструють залежність експресії інсулін-подібних пептидів (*dilps*) від активності сигнального шляху TOR/IS та Мус у стовбурових та похідних клітинах. При активації TOR рівень мРНК для *dilp2* і *tobi* був вищим.

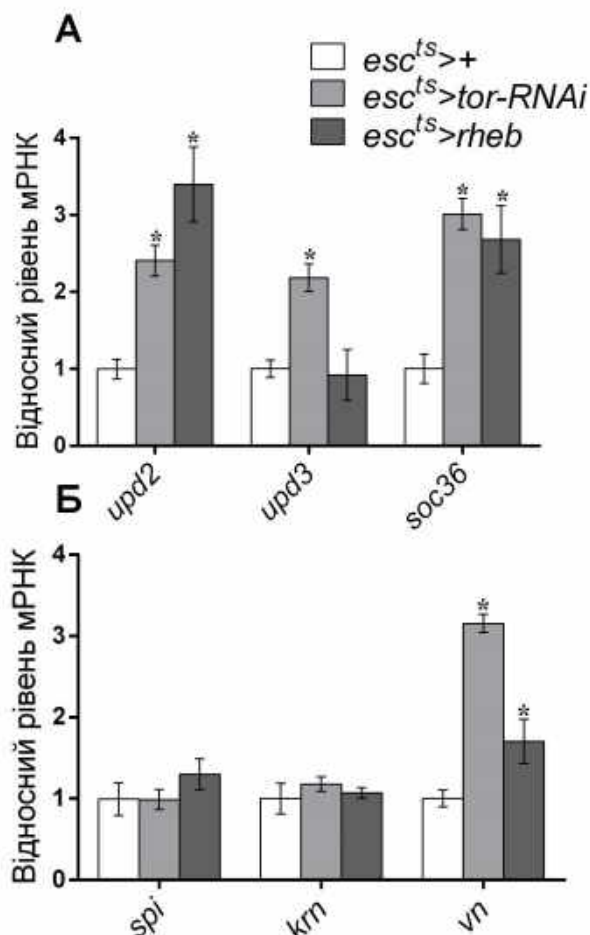
Гени	<i>esc&gt;inr-RNAi</i>	<i>esc&gt;pten-RNAi</i>	Гени	<i>suh&gt;inr-RNAi</i>	<i>suh&gt;pten-RNAi</i>
<i>dilp2</i>	↑		<i>dilp2</i>	↑	
<i>dilp3</i>			<i>dilp3</i>		↑
<i>dilp5</i>	↑		<i>dilp5</i>	↑	
<i>dilp6</i>	↑	↑	<i>dilp6</i>	↑	↑
<i>akh</i>		↑	<i>akh</i>	↑	↑
<i>tobi</i>	↑		<i>tobi</i>	↑	
<i>perck</i>			<i>perck</i>		
<i>bmm</i>			<i>bmm</i>	↑	
<i>4ebp</i>			<i>4ebp</i>	↑	↑

**Рис. 16.** Відносний рівень мРНК *dilp2*, *dilp3*, *dilp5* у головах мух, *dilp6*, *tobi*, *perck*, *bmm*, *4ebp* – у тілах мух з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*).

При активації TOR/Мус підвищувався рівень транскриптів для *dilp6*, *perck*, *4ebp*, *tobi*. Зниження транскриптів *dilp3* спостерігали при нокдауні TOR, та підвищення – при надекспресії *rheb*. При інгібуванні IS в обох типах клітин виявили підвищення рівня мРНК *dilp2*, *5*, *6* та *tobi*, а при активації – *dilp6* та *akh*. Отже можна припустити, що дані сигнальні шляхи регулюють метаболізм за участю генів системи *dilp-akh*.

**Регуляція транскрипції генів у кишківнику при модуляції TOR/IS/Мус.** Відомо, що IS та TOR впливають на диференціацію та проліферацію СКК у тандемі з сигнальними шляхами JAK/STAT та EGFR (Choi et al., 2011). Тому на наступному етапі нашого дослідження ми вивчали вплив інгібування/активації шляху TOR у СКК та ЕБ *Drosophila* на рівень мРНК генів, які кодують компоненти JAK/STAT (*upd2*, *upd3*, *soc36*) та EGFR (*spi*, *krn*, *vn*). Відносний рівень транскриптів *upd2*, *upd3*, *soc36* був приблизно у 2-3 рази вищий у самок генотипу *esc<sup>ts</sup>>tor-RNAi* порівняно з контрольними мухами. Однак, ми спостерігали вищий рівень транскриптів *upd2* та *soc36* і при активації TOR в *esc*-клітинах (Рис. 17А). Будь-які зміни активності сигнального шляху TOR не впливали на експресію гена *spi* та *krn*, однак як інгібування, так і активація підвищували рівень мРНК гена *vn*.

Інгібування IS через нокдаун гена *inr* тільки в ЕБ плодової мушки знижувала рівень транскриптів *upd2*, *upd3* та *soc36* у 3 рази порівняно з контролем (Рис. 18А). Рисунок 18А демонструє значно вищий рівень транскриптів *upd2*, *upd3* та *soc36* за умов активації IS (експресія *pten-RNAi*) у *suh*-клітинах.



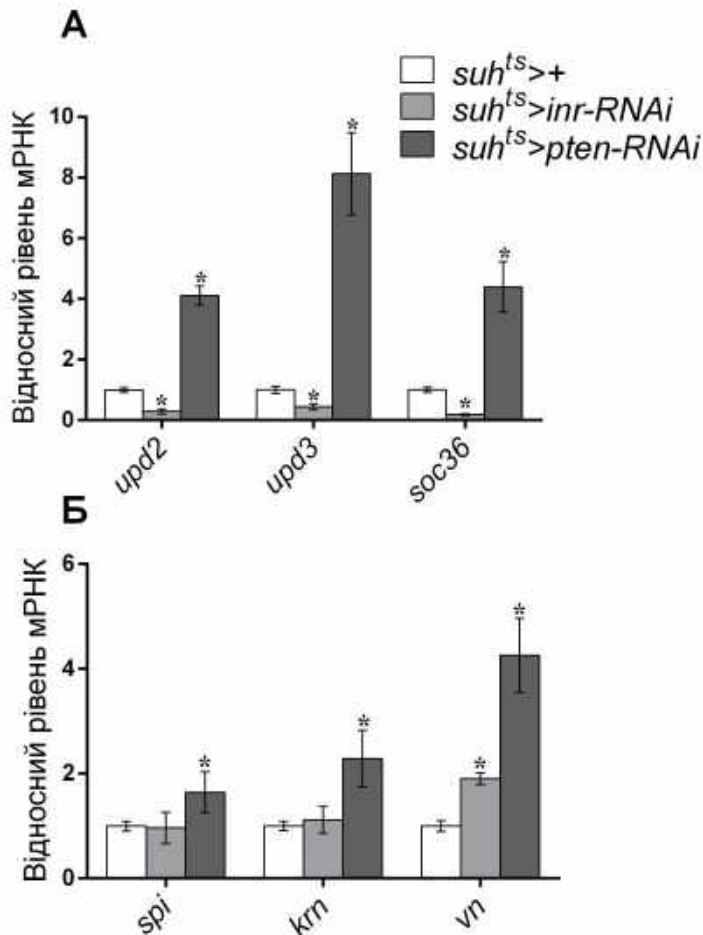
**Рис.17.** Відносний рівень мРНК *upd2*, *upd3*, *soc36*, *spi*, *krn*, *vn* у кишківнику самок з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у *esc*-клітинах. Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*).

Отже IS у СКК та ЕБ активує сигнальний шлях JAK/STAT на рівні транскрипції. Активація IS призводила до збільшення мРНК для *spi*, *krn*, та *vn* за умов активації тільки у ЕБ. Однак, інгібування IS в обох типах клітин також підвищувало рівень транскриптів *vn* (Рис. 18Б).

Отримані експериментальні дані дозволяють сформулювати фундаментальні висновки щодо



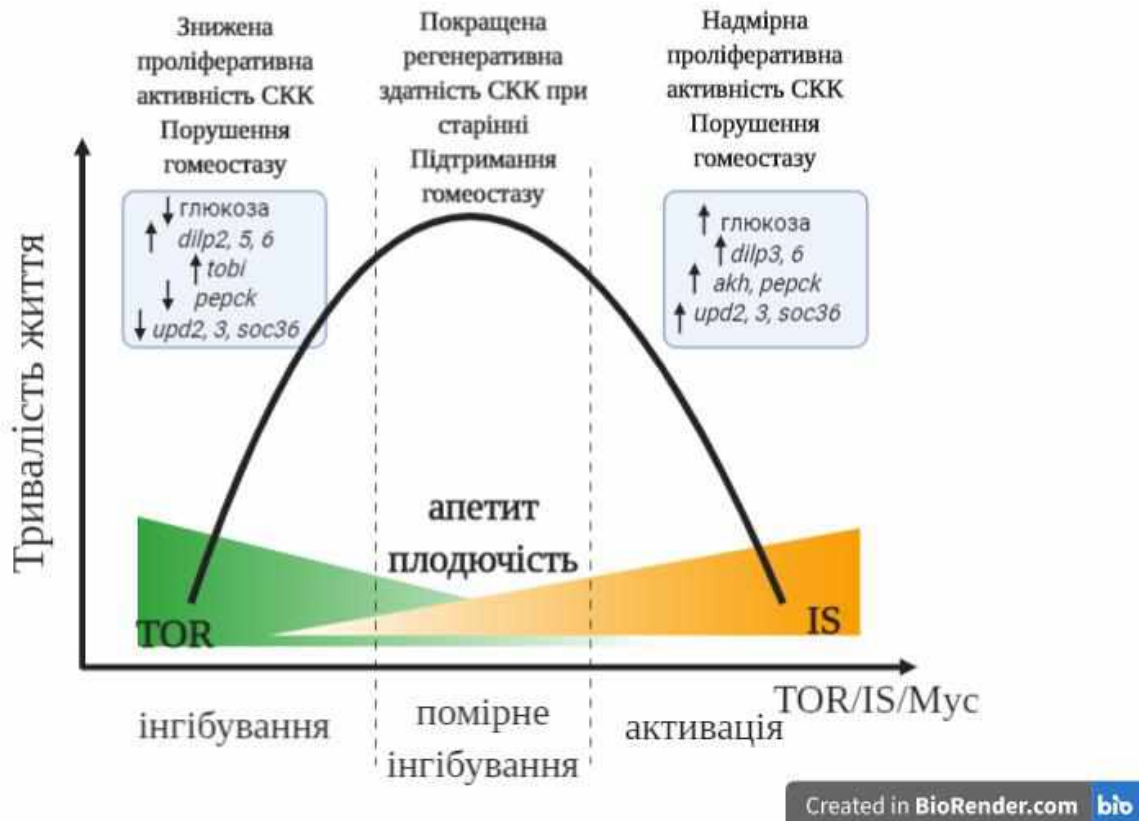
механізмів, які залучені у регуляцію метаболізму та фізіологічних процесів *Drosophila* за умов модуляції сигнальних шляхів у СКК. Вони вказують на те, що при інгібуванні/активації TOR/IS/Мус у невеликій популяції СКК, останній сигналізує про зміни функціонування кишківника до ЦНС, жирового тіла та яйників, які є основними регуляторами фізіологічного стану плодової мушки.



**Рис.18.** Відносний рівень мРНК *upd2*, *upd3*, *soc36*, *spi*, *krn*, *vn* у кишківнику самок з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у *suh*-клітинах. Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*suh<sup>ts</sup>>+*).

На рисунку 19 підсумовано зміни, індуковані модуляцією активностей TOR та IS у СКК та ЕБ. На основі цих результатів можна припустити, що залежність тривалості та якості життя від активності сигнальних шляхів TOR/IS у СКК та ЕБ має дзвоноподібний характер.

Спостерігались подібні ефекти у досліджуваних показниках як для TOR, так і для IS. Показано, що при інгібуванні TOR та IS рівень глюкози був нижчим, що пов'язано з підвищеним рівнем мРНК генів *dilp*, *tobi* та зниженням рівня транскриптів *perck*. Також ми спостерігали зниження рівня мРНК генів для JAK/STAT при інгібуванні IS в СКК та ЕБ. Тому ми припустили, що скорочення тривалості життя та підвищення чутливості до стресів, яке ми спостерігали при інгібуванні TOR та IS може бути спричинене зниженою проліферативною активністю СКК. Водночас, виявлено, що активація TOR та IS призводить до підвищення рівня глюкози, що, пов'язане з підвищенням рівня мРНК генів *akh* та *perck*. Підвищена експресія генів *upd2*, *upd3*, *soc36* та *vn* свідчить про активацію сигнальних шляхів JAK/STAT та EGFR, що, у свою чергу, призводить до надмірної проліферативної активності СКК, проявляється порушенням гомеостазу кишківника та скороченням тривалості життя.



**Рисунок 19.** Фізіологічні та метаболічні ефекти залежно від інгибування/активації TOR/IS/Myc у СКК та ЕБ.

## ВИСНОВКИ

Представлені результати дозволяють сформулювати фундаментальне уявлення про особливості регуляції метаболізму, стійкості до стресів, плодючості, споживання їжі та тривалості життя шляхом інгибування/активації сигнальних шляхів TOR/IS та Myc у СКК *Drosophila*. Вони вказують на те, що кишківник плодової мушки є важливим регуляторним органом, який контролює цілу низку фізіологічних процесів. Вивчення механізмів взаємозв'язку між активністю TOR/IS/Myc, гомеостазом у кишківнику та тривалістю та якістю життя показало, що:

1. Інгибування/активація TOR, IS та коекспресія Myc у СКК та ЕБ скорочує тривалість життя та підвищує чутливість до оксидативного стресу та голодування. Зниження виживання мух може бути пов'язане із порушенням гомеостазу кишківника, а також виникненням стресового стану.
2. Виявлено, що зниження доступності поживних речовин продовжує тривалість життя деяких експериментальних когорт мух. Активація сигнального шляху TOR підвищує стійкість до нестачі поживних речовин. Також зниження доступності харчових компонентів продовжує тривалість життя мух із інгибуванням IS у СКК та ЕБ.
3. Виявлено пряму залежність між активністю IS та кількістю спожитої їжі та плодючістю. Натомість, апетит і плодючість обернено залежать від активності TOR у СКК. Це свідчить про те, що TOR та IS регулюють дані фізіологічні процеси за участі відмінних механізмів із залученням сигнальних систем кишківник-ЦНС-яйники або кишківник-яйники.

4. Вперше встановлено, що модуляція TOR/IS та Мус у невеликій популяції СКК регулює перебіг метаболічних процесів. При інгібуванні TOR та IS у СКК та ЕБ спостерігається нижчий вміст глюкози в тілі та гемолімфі мух, а при активації – значно вищий. Показано, що інгібування інсулінового і TOR шляхів у стовбурових клітинах кишківника призводить до зниження рівня запасних триацигліцеролів та глікогену. В той самий час, інгібування цих шляхів у ентеробластах призводить до підвищення вмісту вказаних метаболітів у всьому тілі плодової мушки. Такі ефекти зумовлені різною активністю сигнальних шляхів між досліджуваними типами клітин, а саме СКК та ЕБ.
5. Вміст основних метаболітів у тілі та гемолімфі експериментальних мух залежить від рівня відносної експресії генів системи *dilp-akh*. Активність сигнальних шляхів TOR/IS та транскрипційного фактору Мус у стовбурових клітинах кишківника впливає на рівень мРНК генів *dilp2*, *3*, *5* та *6*, а також *akh*, *tobi*, *perck*, які кодують компоненти залучені у регуляції метаболізму та тривалості життя організму.
6. Інгібування/активація сигнальних шляхів TOR/IS та Мус не впливає на цілісність кишківника мух, однак впливає на рівень мРНК генів клітин кишківника, які кодують основні компоненти сигнальних шляхів JAK/STAT, EGFR, JNK. Отже, TOR/IS та Мус у СКК та ЕБ функціонують у тісній взаємодії із JAK/STAT, EGFR, JNK та інсуліновим сигналінгом для контролю гомеостазу СКК.

#### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Strilbytska O.**, Semaniuk U.V., Storey K.B., Edgar B.A., Lushchak O.V. Activation of the Tor/Myc signaling axis in intestinal stem and progenitor cells affects longevity, stress resistance and metabolism in *Drosophila*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 2017; 203: 92–99. (Частина експериментальної роботи, статистична обробка даних, написання рукопису та підготовка матеріалів до друку здійснені дисертанткою).
2. **Strilbytska O.**, Koliada A. K., Storey K. B., Mudra O., Vaiserman A. M., Lushchak O. Longevity and stress resistance are affected by activation of TOR/Myc in progenitor cells of *Drosophila* gut. *Open Life Sci.*, 2017; 12: 429–442. (Частина експериментальної роботи, статистична обробка даних, написання рукопису та підготовка матеріалів до друку здійснені дисертанткою).
3. **Strilbytska O.M.**, Storey K.B., Lushchak O.V. TOR signaling inhibition in intestinal stem and progenitor cells affects physiology and metabolism in *Drosophila*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 2020; 243-244: 110424. (Частина експериментальної роботи, статистична обробка даних, написання рукопису та підготовка матеріалів до друку здійснені дисертанткою).
4. **Strilbytska O.M.**, Semaniuk U.V., Storey K.B., Yurkevych I.S., Lushchak O. Insulin signaling in intestinal stem and progenitor cells as an important determinant of physiological and metabolic traits in *Drosophila*. *Cells*, 2020; 9(4): 803. (Частина експериментальної роботи, статистична обробка даних, написання рукопису та підготовка матеріалів до друку здійснені дисертанткою).

5. Lushchak O., **Strilbytska O.**, Piskovatska V., Storey K. B., Koliada A., Vaiserman A. The role of the TOR pathway in mediating the link between nutrition and longevity. *Mech Ageing Dev.*, 2017; 164: 127–138. (Написання рукопису та підготовка матеріалів до друку здійснені дисертанткою).
6. Piskovatska V., **Strilbytska O.**, Storey K.B., Vaiserman A., Lushchak O. mTOR pharmacology. Reference Module in Biomedical Sciences. *Encyclopedia of Biomedical Gerontology*. 2020; 447–454. (Написання частини рукопису та підготовка матеріалів до друку здійснені дисертанткою).
7. Lushchak O., **Strilbytska O.M.**, Yurkevych I., Vaiserman A.M., Storey K.B. Implications of amino acid sensing and dietary protein to the aging process. *Experimental Gerontology*, 2019; № 115: 69–78. (Написання частини рукопису здійснені дисертанткою).
8. Zvarych T.V, **Strilbytska O.M.**, Semaniuk U.V. TOR and Insulin signaling in stem and progenitor cells regulates the lifespan, stress resistance and metabolism in *Drosophila*. XIII International Scientific Conference of Young Scientists. Shevchenkivska vesna: LIFE SCIENCES, Kyiv, 2015.
9. Арабчук О.І., **Стрільбицька О. М.**, Семанюк У. В. TOR та інсуліновий сигнальні шляхи у вісцеральних м'язах кишківника задіяні у регуляції тривалості життя, стійкості до стресів та плодючості *Drosophila melanogaster*. XIII Міжнародна наукова конференція молодих вчених. Шевченківська весна: Біологія, Київ, 2015.
10. **Strilbytska O.**, **Burdyliuk N.** Insulin signaling in intestinal stem and progenitor cells is important determinant of *Drosophila* survival via regulation of gut homeostasis. Fourth annual BTRP Ukraine regional One Health research symposium, Kyiv, 2019.

### АНОТАЦІЯ

Стрільбицька О.М. Регуляція фізіологічних та метаболічних процесів *Drosophila melanogaster* шляхом модуляції сигнальної системи TOR/IS/Мус у стовбурових клітин кишківника. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2020.

Дисертаційна робота присвячена комплексному вивченню ролі сигнальних шляхів у стовбурових клітин кишківника (СКК) та їх недиференційованих похідних ентеробластів (ЕБ), яка позначається на стійкості до стресів, кількості спожитої їжі, репродуктивній активності, метаболічних процесах та тривалості життя *Drosophila*. Вперше показано, що як інгібування, так і активація сигнальних шляхів TOR та IS, а також надекспресія Мус у СКК та ЕБ знижує тривалість життя мух. Дослідні мухи були чутливіші до оксидативного стресу, голодування та недоїдання, ніж контрольні. Встановлено, що активація сигнального шляху TOR у СКК та ЕБ у поєднанні з низьким вмістом поживних речовин у харчовому раціоні продовжувала тривалість життя мушок. Також умови недоїдання підвищували виживання самок із нокдауном гену *inr* у СКК та ЕБ. Показана тенденція до зниження апетиту і

плодючості самок при інгібуванні IS у СКК, та підвищення цих показників при активації. Протилежна дія характерна для TOR шляху: його активація не впливала на плодючість, але знижувала апетит, в той самий час, як інгібування не впливало на апетит, але призводило до підвищення плодючості. Вперше було показано, що інгібування інсулінового і TOR шляхів у стовбурових клітинах кишківника призводить до зниження рівня запасних триацигліцеролів та глікогену. Також встановлено роль генів системи DILP-АКГ у регуляції перебігу метаболічних процесів у відповідь на інгібування або активацію сигнальних шляхів TOR, IS та транскрипційного фактору Мус у СКК та ЕБ. Інтеграція отриманих даних з наявними в літературі дозволили встановити інтегральний механізм ролі TOR/IS/Мус, які функціонують у тісній взаємодії з JAK/STAT, EGFR, JNK та інсуліновим сигналінгом для контролю гомеостазу СКК. Встановлено, що ця взаємодія відбувається на рівні контролю генів, які кодують сигнальні ліганди.

**Ключові слова:** стовбурові клітини кишківника, ентеробласти, сигнальні шляхи, тривалість життя, метаболізм.

### АННОТАЦИЯ

Стрильбицкая О.М. Регуляция физиологических и метаболических процессов *Drosophila melanogaster* путем модуляции сигнальной системы TOR/IS/Мус у стволовых клетках кишечника. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.04 – биохимия. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, 2019.

Диссертация посвящена комплексном физиолого-биохимическом изучении участия сигнальных путей в регуляции функционирования стволовых клеток кишечника (СКК) и энтеробластов (ЭБ), которая сказывается на устойчивости к стрессам, количестве принимаемой пищи, репродуктивной активности, метаболических процессах и продолжительности жизни самок *Drosophila*. Впервые показано, что как ингибирование, так и активация сигнальных путей TOR и IS, а также коэкспресия Мус в СКК и ЭБ снижает продолжительность жизни *Drosophila*, повышает чувствительность к действию менадиона и голоданию. Показана четкая тенденция к снижению аппетита / плодovitости самок при ингибировании IS в СКК, и повышение данных показателей при активации. Впервые было показано, что ингибирование инсулинового и TOR путей в стволовых клетках кишечника приводит к снижению уровня запасных триациглицеридов и гликогена. Также установлена роль генов системы DILP-АКГ в модуляции метаболических процессов в ответ на ингибирование / активацию сигнальных путей TOR, IS и транскрипционного фактора Мус в СКК и ЭБ. TOR/IS/Мус, функционируют при взаимодействии с JAK/STAT, EGFR, JNK и инсулиновым путем для контроля гомеостазу СКК.

**Ключевые слова:** стволовые клетки кишечника, энтеробласты, сигнальные пути, продолжительность жизни, метаболізм.

## ANNOTATION

Strilbytska O.M. Regulation of physiological and metabolic processes in *Drosophila melanogaster* via modulation of signaling net TOR/IS/Myc in intestinal stem and progenitor cells. – Manuscript.

Thesis for PhD degree in Biology, speciality 03.00.04 – biochemistry. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2019.

The dissertation is devoted to the complex physiological and biochemical study of the role of signaling pathways in the intestinal stem cells (ISCs) and their undifferentiated progenitor cells enteroblasts (EB), which causes some physiological and metabolic consequences. These manipulations affected the stress resistance, feeding and fecundity rate, metabolic processes, and lifespan of *Drosophila*.

Bipartite Gal4-UAS system was used to generate the experimental fly lines with the inhibition or activation of signaling pathways TOR, IS, and overexpression of Myc transcription factor in ISCs and EB. We found, that both, inhibition and activation of TOR and IS signaling pathways, as well as Myc coexpression in ISCs, decreased *Drosophila* lifespan. Experimental females were more sensitive to oxidative stress and starvation. We found, low-calorie diet extended the lifespan in flies with activated TOR signaling in ISCs. Moreover, malnutrition increased the survival of females with *inr* knockdown in ISCs.

A decreased of feeding and fecundity rate was observed in females with IS inhibition in ISCs, and the tendency of increase of these parameters was detected in females with IS activation. On the contrary to IS, the TOR pathway activation did not affect fertility, but reduced appetite, while inhibition did not affect appetite, but led to increased fertility. It was also demonstrated, that Myc coexpression reduced these physiological parameters. We found lower glucose concentrations in fly body and hemolymph when signaling pathways were inhibited, and significantly higher when activated. Interestingly, the inhibition of TOR and IS in ISCs and EB reduced the contents of stored glycogen and triglycerides (TAG), but TOR and IS inhibition in the EB significantly increased these traits. We also showed an important role of genes of DILP-AKH system in the modulation of metabolic processes in response to the TOR/IS/Myc inhibition/activation in ISCs and EB.

Measurements of gut integrity with the "Smurf" assay showed that perturbation of TOR/IS/Myc did not affect tissue integrity. However, our experimental study established, that TOR/IS/Myc functions in close coordination with JAK/STAT, EGFR, JNK, and insulin signaling for the control of homeostasis of ISCs. This interaction occurs at the level of signaling ligands. For the first time, the mechanisms have been established in which the signaling system TOR/IS/Myc acts in a small population of stem cells and affect metabolism and physiological processes. Besides, physiological effects from inhibition/activation of signaling pathways on the state of the organism *Drosophila* were first detected. Therefore, the obtained data reveal new interesting prospects in the studies of physiology and metabolic processes of the fruit fly.

**Key words:** intestinal stem cells, enteroblasts, signaling pathways, lifespan, metabolism

Підписано до друку 28.09.2020 р.  
Папір офсетний. Друк на різнографі.  
Формат 60×90/16. Ум. друк. арк. 0,9 Наклад 100 прим. Зам. №2

ПрАТ «Надвірнянська друкарня».  
м. Надвірна, вул. Визволення, 5  
тел./факс.: (03475) 2-25-68  
Свідоцтво про внесення до Державного реєстру суб'єкта видавничої  
справи серія ІФ 30 від 08.10.2008 р.  
e-mail: naddruk11@gmail.com