

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД  
ПРИКАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНІКА  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА  
ФРАНКА

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**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

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

—\_\_\_\_\_ О.М. Стрільбицька

Науковий керівник: **Луцак Олег Володимирович**, кандидат біологічних  
наук, доцент кафедри біохімії та біотехнології

Львів – 2020

## АНОТАЦІЯ

Стрільбицька О.М. Регуляція фізіолого-біохімічних процесів *Drosophila melanogaster* шляхом модуляції сигнальної системи TOR/IS/Мус у стовбурових клітин кишківника. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, МОН України, Івано-Франківськ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена комплексному фізіолого-біохімічному вивченню ролі сигнальних шляхів у стовбурових клітин кишківника (СКК) та їх недиференційованих похідних ентеробластах (ЕБ), що проявляється у змінах фізіологічного стану, біохімічних показників та транскрипційній регуляції багатьох генів.

За допомогою генетичних схрещувань з використання двокомпонентної системи Gal4-UAS отримано експериментальні мухи з інгібуванням або активацією сигнальних шляхів TOR (target of rapamycin), IS (insulin signaling) та надекспресією транскрипційного фактору Мус у СКК та ЕБ. Шляхом селекції на основі зовнішніх ознак відбирали самок певних генотипів, у яких і визначали фізіологічні та біохімічні параметри.

Фізіологічними методами визначали тривалість життя, споживання їжі, репродуктивну активність, стійкість до оксидативного стресу, голодування та нестачі поживних речовин. Показано, що як інгібування, так і активація сигнальних шляхів TOR та IS, а також надекспресія Мус у СКК та ЕБ знижує тривалість життя *Drosophila*. Мухи експериментальних генотипів були чутливіші до дії менадіону, голодування та недоїдання ніж контрольні. Методом спостереження 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 гена *inr* у СКК та ЕБ.

Споживання їжі та репродуктивну активність визначали за допомогою фізіологічних методів. Показана чітка тенденція до зниження апетиту/плодючості самок при інгібуванні IS у СКК, та підвищення даних показників при активації. Навпаки діяв TOR шлях: його активація не впливала на плодючість, але знижувала апетит, в той самий час, як інгібування не впливало на апетит, але призводило до підвищення плодючості. Окрім того, показано, що функціонування ЕБ не впливає на сукупність показників апетит/плодючість. Фізіологічні методи визначення апетиту/плодючості продемонстрували, що активація Мус знижує дані фізіологічні параметри.

Вміст циркулюючих вуглеводів в гемолімфі та запасних метаболітів у тілі *Drosophila* визначали біохімічними методами. За допомогою глюкооксидазного методу визначено вміст глюкози в тілі та гемолімфі, який був нижчим при інгібуванні сигнальних шляхів, та значно вищим при їх активації. Цікаво, що інгібування TOR та IS у СКК та ЕБ призводило до зниження інтенсивності запасання резервних вуглеводів та ліпідів, однак їх інгібування тільки у ЕБ значно підвищувало рівень глікогену та триацилгліцеролів.

За допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі визначали рівень транскриптів генів, які кодують білки залучені у модуляції перебігу метаболічних процесів у відповідь на інгібування/активацію сигнальних шляхів TOR, IS та транскрипційного фактору Мус у СКК та ЕБ. Аналіз отриманих даних, а також даних літератури дозволили встановити інтегральний механізм ролі TOR/IS та Мус у СКК на фізіологічний стан цілого організму.

Для виявлення порушення цілісності кишківника проведено аналіз «Смурф». Мухи фенотипу «Смурф» характеризувались поширенням синього барвника з травного тракту по цілому тілу, що свідчить про порушення цілісності кишківника. Отримані дані не виявили впливу сигнальної системи TOR/IS та Мус у СКК та ЕБ на цілісність травного тракту, оскільки ми спостерігали тільки поодинокі випадки фенотипу «Смурф» серед мух дослідних

когорт. Проте, наші дослідження виявили регуляторну роль TOR/IS та Мус у контролі проліферації СКК та диференціації ЕБ.

Використовуючи метод кількісної ПЛР, встановлено взаємозв'язок між активністю TOR, IS та транскрипційного фактору Мус у СКК та ЕБ та сигнальними шляхами JAK/STAT, EGFR, JNK, які залучені у регуляції проліферації СКК та диференціації ЕБ. Результати експресії генів свідчать про те, що TOR/IS та Мус функціонують у тісній координованій взаємодії з JAK/STAT, EGFR, JNK та інсуліновим сигналінгом для контролю гомеостазу СКК. Встановлено, що дана взаємодія відбувається на рівні контролю генів, які кодують сигнальні ліганди.

Новизна роботи полягає у наступному. Дана робота зосереджена на механізмах регуляції функціонування СКК та ЕБ *Drosophila* шляхом взаємодії сигнальних шляхів TOR та IS, які мають спільну мішень – протоонкоген Мус. Вперше встановлена роль компонентів сигнального шляху TOR, IS та Мус у регуляції тривалості життя, стійкості до стресів, плодючості, споживання їжі, метаболізму та кишківникового гомеостазу *Drosophila*, яка реалізується через модуляцію функціонування СКК та ЕБ. Вперше виявлено, що будь-яка модуляція активності сигнальних шляхів TOR та IS скорочує тривалість життя особин дослідних мух, що свідчить про порушення гомеостазу СКК при активації чи інгібуванні даних сигнальних шляхів. Про зміни у кишківниковому гомеостазі свідчать зміни рівня мРНК генів, які кодують білки залучені в регуляції процесів диференціації та проліферації СКК та ЕБ, що у свою чергу, може мати безпосередній вплив на скорочення тривалості життя експериментальних мух. Вперше встановлено харчові раціони, при яких спостерігається продовження тривалості життя експериментальних самок із активацією/інгібуванням сигнальної системи TOR/IS та Мус. Водночас, відбуваються зміни метаболічних процесів, про що свідчать зміни вмісту основних метаболітів у тілах експериментальних та дослідних мух, а також зміни в експресії метаболічних генів. Вперше встановлено механізми, за участі яких сигнальна система TOR/IS та Мус у невеликій популяції стовбурових

клітин впливає на метаболізм та фізіологічні процеси на рівні метаболізму. Ми припустили, що модуляція сигнальних шляхів тільки у СКК призводить до інгібування/активації цих шляхів у клітинах всього тіла плодової мушки через передачу сигналу до ЦНС та жирового тіла. Тому, отримані дані відкривають нові цікаві перспективи у дослідженнях фізіології та метаболічних процесів плодової мушки.

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

*Список публікацій здобувача:*

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).

#### Тези доповідей на конференціях:

1. 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.
2. 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.
3. **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.

## 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. – Quantification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a philosophy doctor in biology of speciality 03.00.04 “Biochemistry”. – Vasyl Stefanyk National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Ivano-Frankivsk, 2019.

The dissertation is devoted to the complex physiological and biochemical study of the role of signaling pathways in the regulation of the intestinal stem cells (ISCs) functioning and their undifferentiated progenitor cells enteroblasts (EB). These events affect the stress resistance, feeding/fecundity rate, metabolic processes, and lifespan of females *Drosophila*.

Bipartite Gal4-UAS system was used to generate the experimental fly lines with the inhibition/activation of signaling pathways TOR, IS, and overexpression of the Myc transcription factor in ISCs and EB. The experimental fly lines were selected by phenotypic traits and used for physiological and biochemical measurements.

The general-biological methods were used to determine the lifespan of experimental females, their resistance to oxidative stress, starvation, and malnutrition. 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 menadione treatment and starvation. Using observation method we found that TOR signaling activation ISCs in conjunction with the low calorie diet extended lifespan. Moreover, malnutrition increased the survival of females with *InR* knockdown ISCs.

The amount of food intake and reproductive activity were also determined by biological methods. A clear tendency of decreased feeding/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. However, modulation of TOR

had a reciprocal effect on feeding/fecundity rate. Besides, it has been shown that EB functioning did not affect the feeding/fecundity rate. General biological methods demonstrated, that Myc coexpression reduced these physiological parameters.

The levels of circulating and stored metabolites in *Drosophila* body and hemolymph were measured by biochemical methods. Using the colorimetric, enzymatic method, the glucose content in the body and hemolymph was determined. We observed lower glucose concentrations in fly body and hemolymph when signaling pathways were inhibited, and significantly higher at activation. Interestingly, the inhibition of TOR and IS in ISCs and EB reduced stored glycogen and triglycerides (TAG) content, but TOR and IS inhibition in the EB significantly increased these parameters.

The quantitative polymerase chain reaction (PCR) method with reverse transcriptase was used to establish the role of metabolic genes in the modulation of metabolic processes in response to the TOR/IS and Myc inhibition/activation in ISCs and EB. The analysis of the experimental data as well as the literature data let us suggesting the integral mechanism of the role of TOR/IS and Myc in the ISCs on the physiological state of the whole *Drosophila* organism.

To determine intestinal integrity, we examined flies that consumed food supplemented with non-absorbable blue food dye E133. “Smurf” flies were defined by visible blue food dye seen throughout the body, which suggests disruption of gut integrity. Measurements of gut integrity with the” Smurf” assay showed that perturbation of TOR/IS and Myc did not affect tissue integrity. In all cases, the incidence of “smurf” flies was lower than 3% of total flies (data not shown). However, our experimental study revealed the regulatory role of TOR/IS and Myc in controlling ISCs proliferation and EB differentiation.

The quantitative PCR method has established the relationship between the activity of TOR, IS, and the transcription factor of Myc in ISCs and EB and the signaling pathways JAK/STAT, EGFR, JNK involved in regulating ISCs proliferation and EB differentiation. The results of gene expression indicated that TOR/IS and Myc functions in close coordination with JAK/STAT, EGFR, JNK, and



insulin signaling at the level of gene expression for the control of homeostasis of ISCs. This interaction occurs at the level of signaling ligands.

The novelty of the work is as follows. This work focuses on the mechanisms of *Drosophila* ISCs functioning and its regulation via interaction of signaling pathways TOR and IS, which have a common target – Myc. For the first time, the interaction of TOR, IS, and Myc signaling has been established to regulate lifespan, stress resistance, fecundity, food consumption, metabolism and intestinal homeostasis in *Drosophila* via modulation the functioning of the ISCs and the EB. We were the first, who has been found that any modulation of the TOR and IS activity reduced survival of the experimental fly lines, suggesting a disturbance of the midgut homeostasis when these signaling pathways were either activated or inhibited. Changes in the relative expression of genes, which regulate the processes of differentiation and proliferation of ISCs and EB, confirm the changes in the intestinal homeostasis, which, in turn, could have a direct impact on the lifespan reduction. We for the first time established low-calorie diets, which extended the lifespan of the experimental females with the inhibited/activated TOR/IS/Myc signaling network. At the same time, we detected changes in metabolic processes, as evidenced by changes in the metabolites content in the bodies of experimental flies, as well as changes in the relative expression of genes, which encode proteins involved in metabolism regulation. 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

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	13
ВСТУП.....	15
<b>РОЗДІЛ 1. СИГНАЛЬНІ ШЛЯХИ У РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННИХ ПРОЦЕСІВ, КИШКІВНИКОВОГО ГОМЕОСТАЗУ ТА СТАРІННЯ.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1. Кишківник <i>Drosophila</i> як модель для встановлення взаємозв'язку між регенеративною здатністю та старінням.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2. Сигнальні шляхи, які залучені у регуляції клітинних процесів та старіння.....</b>	<b>25</b>
1.2.1. Сигнальний шлях TOR.....	25
1.2.2. Інсуліновий сигнальний шлях (IS).....	32
1.2.3. Транскрипційний фактор Мус.....	34
<b>1.3. Взаємодія сигнальних шляхів TOR/IS/Мус у регуляції гомеостазу СКК <i>Drosophila</i> та старіння.....</b>	<b>36</b>
Висновки до розділу 1.....	40
<b>РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1. Лінії мух.....</b>	<b>41</b>
<b>2.2. Реактиви.....</b>	<b>41</b>
<b>2.3. Умови утримання лабораторних ліній <i>D. melanogaster</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>2.4. Схрещування, які проводились в роботі.....</b>	<b>41</b>
<b>2.5. Визначення тривалості життя.....</b>	<b>44</b>
<b>2.6. Визначення стійкості мух до стресових умов.....</b>	<b>44</b>
2.6.1. Стійкість до голодування.....	44
2.6.2. Стійкість до недоїдання.....	45
2.6.3. Чутливість до дії індуктора оксидативного стресу.....	45
<b>2.7. Визначення кількості спожитої їжі .....</b>	<b>45</b>
<b>2.8. Визначення плодючості самок.....</b>	<b>46</b>
<b>2.9. Визначення вмісту вуглеводів та триацилгліцеролів.....</b>	<b>46</b>
2.9.1. Концентрація глюкози.....	46
2.9.2. Вмісту глікогену.....	48

2.9.3. Рівень триацилгліцеролів.....	48
<b>2.10.</b> Визначення цілісності кишківника.....	49
<b>2.11.</b> Метод кількісної ПЛР.....	50
<b>2.12.</b> Статистична обробка результатів.....	51
<b>РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ TOR/IS ТА MYC У СТОВБУРОВИХ КЛІТИНАХ КИШКІВНИКА НА ФІЗІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ <i>DROSOPHILA</i></b> .....	56
<b>3.1.</b> Сигнальний шлях TOR у стовбурових і похідних клітинах впливає на фізіологічні показники <i>D. melanogaster</i> .....	56
<b>3.2.</b> Інсуліновий сигнальний шлях у стовбурових і похідних клітинах впливає на фізіологічні показники <i>D. melanogaster</i> .....	67
<b>3.3.</b> Транскрипційний фактор Мус у стовбурових і похідних клітинах впливає на фізіологічні показники <i>D. melanogaster</i> .....	78
Висновки до розділу 3.....	88
<b>РОЗДІЛ 4. РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ <i>DROSOPHILA</i> ШЛЯХОМ ЗМІНИ АКТИВНОСТІ TOR/IS ТА MYC У СТОВБУРОВИХ КЛІТИНАХ КИШКІВНИКА</b> .....	83
<b>4.1.</b> Вплив сигнального шляху TOR у стовбурових і похідних клітинах на метаболізм <i>D. melanogaster</i> .....	83
<b>4.2.</b> Вплив інсулінового сигнального шляху у стовбурових і похідних клітинах на метаболізм <i>D. melanogaster</i> .....	94
<b>4.3.</b> Вплив транскрипційного фактору Мус у стовбурових і похідних клітинах на метаболізм <i>D. melanogaster</i> .....	101
Висновки до розділу 4.....	109
<b>РОЗДІЛ 5. РОЛЬ TOR/IS ТА MYC У СТОВБУРОВИХ КЛІТИНАХ У РЕГУЛЯЦІЇ ГОМЕОСТАЗУ КИШКІВНИКА <i>DROSOPHILA</i></b> .....	111
<b>5.1.</b> Локальна регуляція транскрипції генів, які кодують компоненти JAK/STAT, EGFR, JNK у кишківнику <i>D. melanogaster</i> за участі сигнального шляху TOR..	111
<b>5.2.</b> Локальна регуляція транскрипції генів, які кодують компоненти JAK/STAT, EGFR, JNK у кишківнику <i>D. melanogaster</i> за участі інсулінового сигнального шляху.....	117

<b>5.3. Локальна регуляція транскрипції генів, які кодують компоненти JAK/STAT, EGFR, JNK у кишківнику <i>D. melanogaster</i> за участі транскрипційного фактору Мус .....</b>	<b>122</b>
Висновки до розділу 5.....	127
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	130
ВИСНОВКИ.....	135
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	137

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- СКК – стовбурові клітини кишківника
- ЕБ – ентобласти
- ЕЦ – ентоцити
- ЕЕК – ентоендокринні клітини
- Esc (escargot) – транскрипційний фактор, який експресується у СКК та ЕБ
- SuH (Suppressor of Hairless) – транскрипційний фактор сигнального шляху Notch, який експресується виключно в ЕБ
- IGF-1 (insulin growth factor) – інсуліноподібний фактор росту
- IS (insulin signaling) – сигнальний шлях інсулін/інсуліноподібного фактору росту
- JAK/STAT (Janus kinases/Signal Transducer and Activator of Transcription) – сигнальний шлях регуляції проліферації та диференціації клітин
- TOR (target of rapamycin) – сигнальний шлях обміну амінокислот
- Rheb (Ras homolog enriched in brain) – компонент-активатор сигнального шляху TOR; ГТФ-зв’язуючий білок
- TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex) – туберозно-склерозні комплекси, компонент-інгібітор сигнального шляху TOR
- S6K (S6 kinase) – кіназа білка S6
- 4E-BP (4E binding protein) – білок-інгібітор початку трансляції
- ТАГ – триацилгліцероли
- НСК – нейросекреторні клітини мозку
- DILP (*Drosophila* insulin-like peptide) – інсуліноподібні пептиди у *Drosophila*
- InR (insulin recceptor) – рецептор інсуліну
- ФІЗК – фосфатидилінозитол-3-кіназа
- ФІД – фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат
- ФІТ – фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат
- ПК-Б – протеїнкіназа-Б
- РНК – рибонуклеїнова кислота

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

DAF-16 – ортолог транскрипційного фактору FOXO ссавців

FOXO (forkhead box O protein) – транскрипційний фактор родини

Forkhead box

SAFE (sapillary feeding assay) – капілярний метод визначення кількості  
спожитої їжі

АКГ – адипокінетичний гормон

ІПК – інсулін-продукуючі клітини

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** 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 [162]. 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, отриманих 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 [116]. Регенеративні процеси у кишківнику *Drosophila* критично важливі для збереження проліферативного гомеостазу [153]. Тому проліферація та диференціація стовбурових клітин кишківника (СКК) знаходяться під контролем сигнальних шляхів Notch, JAK/STAT, EGFR, TOR та інсулінового сигнального шляху [10; 92; 121]. На сьогодні, встановлено як дані сигнальні шляхи у стовбурових клітинах кишківника впливають на функціонування клітин ніші, на збереження проліферативного гомеостазу і функціонування кишківника [100], 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 перевірити 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* – виживання *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 триацилгліцеридів, глюкози, глікогену; методи молекулярної біології – вимірювання відносного рівня мРНК; генетичні – метод схрещування; селекція особин за певними ознаками; методи математичної статистики.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Дана 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 особин трансгенних ліній, що вказує про важливість підтримання гомеостазу СКК. Про зміни гомеостазу кишківника свідчать зміни рівня мРНК генів *upd2*, *upd3*, *soc36*, *spi*, *krrn*, *vn*, *pic*, *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.** Використання результатів роботи можливе у 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 виникнення ракових захворювань. 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 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.

## РОЗДІЛ 1.

### СИГНАЛЬНІ ШЛЯХИ У РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННИХ ПРОЦЕСІВ, КИШКІВНИКОВОГО ГОМЕОСТАЗУ ТА СТАРІННЯ

#### 1.1. Кишківник *Drosophila* як модель для встановлення взаємозв'язку між регенеративною здатністю та старінням

Дослідження шлунково-кишкового тракту набуває все більшої актуальності, оскільки кишківник відіграє важливу сигнальну роль, яка полягає у регуляції споживання їжі, метаболізму та виживання організму загалом. Завдяки тому, що кишківник безпосередньо контактує з поживними речовинами, він регулює фізіологічні процеси у відповідь на зміни у харчовому раціоні. Показаний високий ступінь гомології між кишківником плодової мушки та ссавців, включно з людиною [143]. Тому кишківник плодової мушки часто використовують для встановлення механізмів функціонування стовбурових клітин та клітин їх ніші, імунних реакцій та взаємозв'язку між регенеративною здатністю та старінням.

Найбільшим органом тіла плодової мушки є його кишківник, який складається з передньої, середньої та задньої кишок. Окрім основних функцій травного тракту *Drosophila* – участь у перетравлюванні, всмоктуванні, транспорті поживних речовин та екскреції неперетравлених решток, він функціонує як перша лінія захисту від патогенів. Навіть більше, травний тракт – це основний генератор ендокринних сигналів, що дозволяє йому модулювати інтенсивність накопичення поживних речовин, споживання їжі шляхом регуляції активності підшлункової залози та мозку у ссавців [143]. Таким чином, кишківник є ключовим регулятором фізіологічних процесів.

З точки зору структури травний тракт *Drosophila* складається з простого епітелію, оточеного вісцеральними м'язами, нервовими волокнами та трахеями. Три основні відділи травного тракту структурно та функціонально відрізняються, що зумовлене їх різним походженням [63]. Так, передній та

задній відділ кишківника ектодермального походження, а середня – ендодермального. Кишківник дрозофіли утворюється заново на кожній зі стадій метаморфозу плодової мушки. А саме, три різні тканини заміщують одна одну під час розвитку: личинковий кишківник (який утворюється з ембріонального кишківника) заміщується перехідним кишківником лялечки, який, у свою чергу, формує дорослий кишківник [147; 200; 201]. Після метаморфозу кишківник личинки та лялечки дегенерують для утворення меконію, який виштовхується невдовзі після вилуплення [143].

Кишківник плодової мушки на даний час детально вивчений та охарактеризований, у зв'язку з чим він є зручним модельним об'єктом для досліджень процесів збереження, проліферації та диференціації СКК. Епітелій кишківника дорослої мушки складається з кількох типів клітин: стовбурових клітин кишківника (СКК), ентеробластів (ЕБ), ентероцитів (ЕЦ) та ентероендокринних клітин (ЕЕК), і оточений вісцеральними м'язами. Вісцеральні м'язи секретують кілька факторів ніші СКК, які беруть участь у регуляції росту СКК, а саме *wingless (Wg)*, *Vein (Vn)* та *DILP3* [121; 153; 223]. Таким чином вісцеральні м'язи функціонують як ніша для СКК.

Стовбурові клітини кишківника – клітини із невеликим ядром, характерною ознакою яких є виділення сигнального ліганду *DI (Delta)* специфічного для рецептору сигнального шляху *Notch* [217]. Похідні клітини для СКК – ентеробласти – також диплоїдні з невеликим ядром, однак характеризуються експресією транскрипційного фактору для сигнального шляху *Notch* – *SuH (Suppressor of Hairless)* [217]. Маркером обох цих типів клітин є білок *Escargot (Esc)*.

Епітелій кишківника дорослої дрозофіли містить два типи диференційованих клітин [143] – ЕЦ та ЕЕК, які також виділяють сигнальні ліганди і, таким чином, створюють нішу для стовбурових клітин. Ентероцити, є великими поліплоїдними клітинами з великим ядром, які секретують травні ферменти; ферменти розщеплюють великі молекули та часточки їжі на менші молекули, після чого клітини вже поглинають прості молекули, які утворились

у результаті травлення [143]. Характерною особливістю ЕЦ є експресія транскрипційного фактору Pdm1 [217]. Поміж моношару ЕЦ зустрічаються клітини з невеликим ядром – ЕЕК, які специфічно експресують транскрипційний фактор *prospero* [142; 154]. Похідні стовбурових клітин відіграють важливу роль у формуванні ніші для СКК, шляхом виділення сигнальних лігандів для регуляції сигнальних шляхів, які регулюють процеси збереження, проліферації та диференціації СКК.

Клітини епітелію травного тракту характеризуються високою швидкістю відмирання та оновлення. Правильна регуляція гомеостазу СКК, а саме контроль процесів проліферації та диференціації, критично важлива для перебігу фізіологічних процесів організму, що безпосередньо позначається на тривалості життя.

За сприятливих умов епітелій кишківника оновлюється за 1-2 тижні [142]. Активність СКК головним чином залежить від інтенсивності метаболізму та факторів навколишнього середовища [91]. Центральним регулятором активності СКК є сигнальний шлях Notch. Ген Notch експресується як у СКК, так і в ЕБ. Однак, сигнальний ліганд D1 (Delta), який активує Notch, синтезується тільки у СКК. Цікаво, що асиметрична активація Notch здійснюється тільки в ЕБ [154]. Зниження активності D1, Notch або SuH призводить до порушення подальшого процесу диференціації, в результаті якої швидкими темпами утворюються переважно ЕЕ, а не ЕЦ [142; 154]. Зворотний ефект спостерігається при надекспресії Notch, який проявляється у швидкій диференціації СКК, в результаті якої утворюються ентероцитоподібні клітини. Це призводить до швидкої втрати кількості СКК [142]. Дані процеси порушують тканинний гомеостаз.

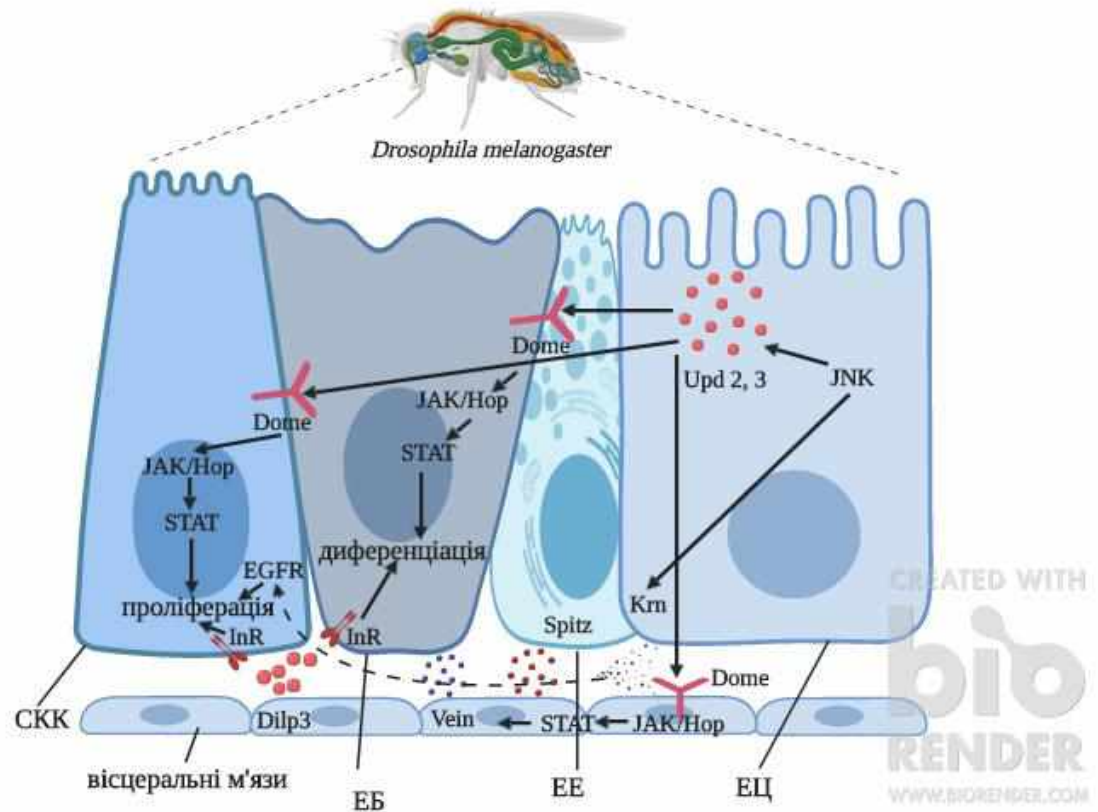
Цитокіни, пов'язані з лептинами та інтерлейкінами (Unpaireds, Upd), а також лігандами для сигнального шляху EGFR (Spi, Krn, Vn), функціонують як фактори росту та виживання СКК *Drosophila* [16; 223]. Надмірна активація JAK/STAT або EGFR призводить до стрімкої проліферації СКК (Рис. 1.1), що призводить до гіперплазії. Клітини кишківника з дефектами даних сигнальних

шляхів характеризуються зниженою регенеративною здатністю, що в деяких випадках призводить до атрофії [92]. Ліганди, які активують сигнальні шляхи продукуються різними типами клітин, синтез яких інтенсифікується при пошкодженнях клітин (Upd2, Upd3, Vn), або є конститутивним при будь-яких стресових умовах [92]. Зворотна кореляція, яка існує між типами клітин та сигнальними шляхами JAK/STAT, EGFR та Notch, сприяє відновленню кишківникового епітелію (Рис. 1.1). Отже, система функціонування сигнальних шляхів зосереджена на збереженні базального рівня відновлення епітелію. З огляду на це, за допомогою зворотних механізмів регуляції гомеостазу кишківника та регенерації, пошкоджені ЕЦ генерують сигнали, які активують СКК і сприяють відновленню ЕЦ.

Нещодавні дослідження продемонстрували важливу роль сигнального шляху Hippo у збереженні гомеостазу кишківника. Функціонування Hippo у ЕЦ плодової мушки критично важливе для обмеження надмірної швидкості проліферації СКК [175; 191]. Сигнальний шлях Hippo функціонує як сенсор клітинної адгезії та цілісності цитоскелету, таким чином служить як сенсорний механізм першої лінії захисту від пошкоджень, контролюючи при цьому синтез цитокінів та факторів росту для регуляції проліферації СКК [92].

Клітини кишківника дорослих особин *Drosophila* постійно оновлюються шляхом асиметричного поділу СКК [142]. СКК здатні до симетричного та асиметричного поділу. Під час асиметричного поділу СКК ділиться на дві дочірні клітини, одна з яких (ЕБ) перетворюється на ЕЦ або ЕЕК, що залежить від активності сигнального шляху Notch [154], а інша дочірня клітина зберігає всі властивості стовбурової клітини. Симетричний поділ СКК буває двох типів: перший – з однієї стовбурової клітини утворюються дві дочірні стовбурові клітини; другий – з однієї стовбурової клітини утворюються дві диференційовані клітини. Експериментальні дослідження продемонстрували, що майже всі поділи СКК *Drosophila* є асиметричними [154].





**Рисунок 1.1.** Ніша стовбурових клітин кишківника. Сигнальні ліганди *Upd2* та *3*, які продукуються в ЕЦ, активують рецептори *Dome* в ЕБ, СКК та вісцеральних м'язах і таким чином запускають сигнальний шлях *JAK/STAT*. Останній підвищує інтенсивність синтезу ліганду *Vein* клітинами вісцеральних м'язів. Сигнальні ліганди *Spitz* (продукуються ЕЕ), *Krn* (продукуються ЕЦ), *Vein* (продукуються вісцеральними м'язами) активують сигнальний шлях *EGFR* у СКК. Клітини вісцеральних м'язів секретують також *DILP3*, який через *InR* у СКК та ЕБ активує інсуліновий сигнальний шлях у цих клітинах. Сигнальний шлях *JNK* в ентероцитах контролює синтез цитокінів *Upd2, 3*, а також *Krn*. Таким чином дані сигнальні шляхи у координованій взаємодії регулюють проліферацію СКК та диференціацію ЕБ.

Наближення СКК до вісцеральних м'язів, які синтезують ліганди *Vn*, *Wg* (*Wingless*) і *DILP3*, сприяє збереженню кількості СКК [123; 153]. Варто зазначити, що ЕБ також синтезують ліганд *Spi* (*EGFR*) та цитокіни *Upd*, які також сприяють процесам росту СКК [92].

Також показано, що за умов доступності поживних речовин сигнальний шлях IS підвищує активність СКК та сприяє симетричному поділу, що інтенсифікує процеси тканинного росту [153]. Це призводить до збільшення пулу СКК і, як наслідок, збільшується розмір кишківника. Умови голодування, які знижують активність IS, зумовлюють зворотний ефект, а саме істотне зменшення розмірів кишківника [153]. Роль харчування у регуляції функціонування СКК ссавців все ще детально не досліджена. Тому подальші дослідження механізмів проліферації та диференціації СКК є досить актуальними для регенеративної медицини.

## 1.2. Сигнальні шляхи у регуляції клітинних процесів та старіння

Дослідження останніх років підтверджують гіпотезу про те, що старіння – це фізіологічний процес, який регулюється низкою сигнальних шляхів та транскрипційних факторів. До важливих сигнальних шляхів, які контролюють процес старіння, належать сигнальні шляхи TOR та інсуліновий, які сходяться на регуляції спільної мішені – транскрипційного фактору Мус.

### 1.2.1. Сигнальний шлях TOR

Ключовим компонентом сигнального шляху TOR є кіназа TOR, яка була виявлена як мішень дії антибіотику рапаміцину (*target of rapamycin – TOR*). Сигнальний шлях TOR бере участь у регуляції метаболізму та життєздатності у всіх еукаріотичних організмів, а також необхідний для росту на ранніх стадіях розвитку організму [143].

Останніми десятиліттями показано, що інгібування сигнального шляху TOR продовжує тривалість життя різних модельних організмів, зокрема дріжджів, нематод та плодової мушки. Це свідчить про те, що шлях TOR контролює процес старіння як на клітинному рівні (оскільки дріжджі є одноклітинними еукаріотами), так і у багатоклітинних організмів. Дослідження Vellai та колег (2003) вперше продемонстрували важливу роль TOR у контролі тривалості життя нематод *Caenorhabditis elegans* шляхом інгібування даного сигнального

шляху, що подвоювало тривалість життя [214]. Роль генів шляху TOR встановлена також для плодової мушки *Drosophila melanogaster*, демонструючи таким чином важливість цієї моделі у дослідженні процесу старіння [98].

Серед багатьох факторів, які впливають на тривалість життя і старіння організму, основна увага дослідників зосереджена на ролі харчового раціону як одного з визначальних чинників. У цьому руслі детально проаналізований вплив доступності поживних речовин, обмеження доступних калорій харчового раціону, типу джерела калорій [98; 125; 126; 179] та співвідношення білок/вуглевод у харчовому раціоні [125] на тривалість життя різних організмів. При цьому сигнальний шлях TOR є одним з інтегральних механізмів регуляції тривалості життя організмів, оскільки його активність залежить від наявності поживних речовин, факторів росту та дії стресових чинників.

Сигнальний шлях TOR безпосередньо активується за дії факторів росту, доступності амінокислот, енергетичного стану клітини, доступності кисню, дії інших стресорів тощо. У відповідь на зміну умов шлях TOR регулює процеси синтезу ліпідів та білків, автофагію, біогенез лізосом та виживання клітини загалом (Рис. 1.2) [112]. Дані чинники, впливаючи на конкретні компоненти сигнального шляху TOR, призводять як до активації, так і до інгібування кінази TOR, і, відповідно, можуть викликати протилежні біологічні ефекти.

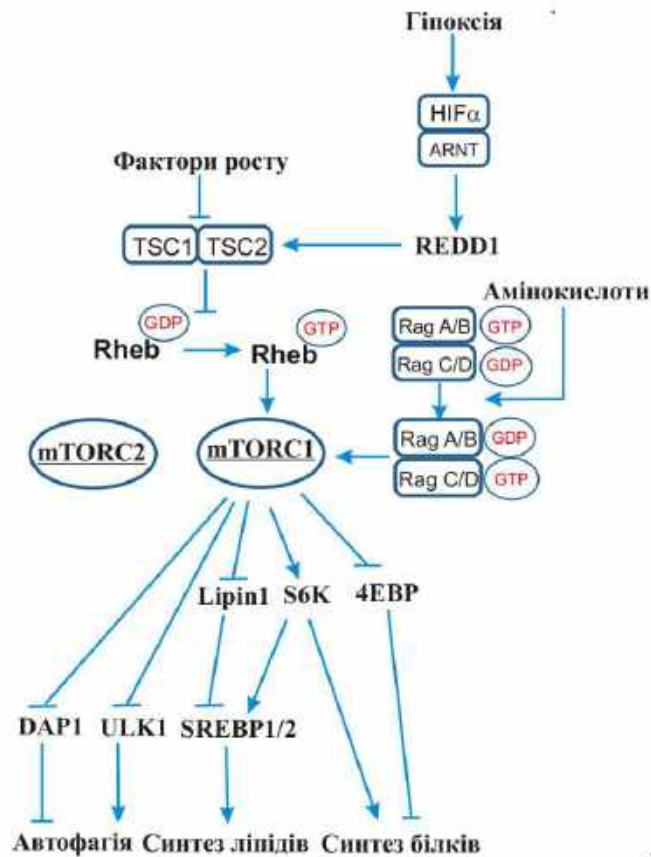
TSC (*tuberous sclerosis complex* – туберозно-склерозний комплекс) – гетеродимерний комплекс білків TSC1 (гамартин) та TSC2 (туберин), який опосередковано інгібує кіназу TOR [60; 84; 88; 131; 206]. Активний комплекс TSC1/TSC2 інактивує свою основну мішень – ГТФазу Rheb шляхом стимуляції її ГТФазної активності і утворення, як наслідок, неактивної ГДФ-зв'язаної форми Rheb [85; 206]. Комплекс TSC1/TSC2 інтегрує сигнали від багатьох чинників, зокрема від гормонів та факторів росту, наприклад, інсуліну та інсуліноподібного фактору росту, які діють через активацію фосфатидилінозитол-3-кіназного та Ras шляхів. Окрім факторів росту, через туберозно-склерозні комплекси діють сигнали від багатьох стресорів, таких, як гіпоксія, пошкодження ДНК тощо [54].

Мутації генів TSC1 і/або TSC2 у плодової мушки *D. melanogaster* призводить до збільшення розмірів клітин, а надекспресія туберозно-склерозних комплексів сповільнює ріст клітин [59; 166; 205].

ГТРаза Rheb (Ras homologue enriched in brain) вперше виявлена у мозку людини через збільшення експресії гена *rheb* після епілептичних приступів [224]. Пізніше було встановлено, що Rheb є мішенню комплексу TSC1/TSC2 [229]. Активні туберозно-склерозні комплекси стимулюють гідроліз зв'язаного з Rheb ГТФ до ГДФ. Це зрештою призводить до утворення неактивної ГДФ-зв'язаної форми Rheb. Генетичні дослідження свідчать про здатність TSC1/TSC2 інгібувати шлях TOR через інактивацію Rheb (Рис. 1.2) [4]. Активна форма Rheb (зв'язана з ГТФ) безпосередньо приєднується до комплексу TORC1 (TOR complex 1) та підвищує кіназну активність Tor у його складі.

Мутація гена *rheb* у дрозофіли зменшує розмір клітин, в той час як надекспресія має зворотний ефект [103]. За умов нестачі амінокислот інгібується передача сигналу від кінази TOR до її мішеней, а надекспресія Rheb знімає це інгібування [122]. Відомо, що Rheb бере участь у контролі клітинного росту у відповідь на доступність харчових компонентів [187].

Кіназа TOR функціонує у складі двох окремих комплексів: TORC1 та TORC2 (Рис. 1.2). Комплекс mTORC1 ссавців містить у своєму складі регуляторний асоційований білок Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), LST8 (mLst8, також відомий як GbL), домен Deptor (DEP, що містить mTOR-взаємодіючий білок) та збагачений проліном субстрат PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40-kDa). mTORC2 функціонує у комплексі з білками Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR – нечутливий до дії рапаміцину партнер mTOR), mLst8, mSin1, Deptor та білок Protor1/2 [199]. Було також встановлено, що Deptor взаємодіє з обома комплексами TORC1 та TORC2 [161]. Deptor, подібно до PRAS40, інгібує TORC1. TORC1 чутливий до дії рапаміцину та доступності поживних речовин, а TORC2 – нечутливий, хоча обидва комплекси активуються у відповідь на дію факторів росту. Детальний механізм інгібування TOR рапаміцином остаточно не з'ясований.



**Рисунок 1.2.** Сигнальний шлях TOR у ссавців. Вказані ключові фактори, які регулюють активність сигнального шляху TOR, а також основні мішені та клітинні процеси, які зазнають впливу. Шлях TOR реагує на фактори росту, амінокислоти, концентрацію кисню, стреси та енергетичний стан клітини. Активація кінази TOR безпосередньо або за посередництва певних компонентів сигнального шляху призводить до інтенсифікації біосинтезу білків, ліпідів та інгібування автофагії.

Можливо, рапаміцин порушує структурну цілісність білка TOR [226], оскільки він алостерично знижує активність кіназного домену. Структурні компоненти цих обох комплексів здебільшого є консервативними від дріжджів до ссавців.

Амінокислотна послідовність білка TOR (dTOR) у *D. melanogaster* на 56% ідентична до mTOR, зокрема, висока консервативність спостерігається у кіназному та FRB доменах [101]. Клітини, у яких знижена експресія dTOR, характеризуються нижчим рівнем проліферації у всіх тканинах тіла мухи [22].

Кіназа рибосомального білка S6 та білок зв'язування фактору ініціації трансляції 4E – 4E-BP1 (4E-binding protein) є найбільш відомими субстратами

TORC1 (Рис. 1.2). У клітинах ссавців виявлені дві кінази білка S6 (S6K1 та S6K2), які кодуються двома відповідними генами [195]. Дані кінази регулюють ріст клітини у *D. melanogaster* та ссавців і є безпосередніми мішенями кінази TOR. Функції S6K1 у регуляції росту клітини вивчені набагато краще, ніж S6K2, оскільки остання ідентифікована значно пізніше.

Фосфорилування S6K призводить до підвищення експресії генів на стадії ініціації та елонгації трансляції [112]. Субстратом S6K є компонент 40S субодиниці рибосоми – S6. Рівень фосфорилування субодиниці S6 тісно пов'язаний з активністю комплексу TORC1, і тому цей показник широко використовують для визначення активності TORC1 *in vivo* [103]. Фосфорилування S6 відбувається по п'яти залишках серину, які є консервативними у різних видів організмів [138]. Більшість мутантних мух за геном *dS6K* помирають під час розвитку, а мухи, які виживають, характеризуються меншими розмірами тіла порівняно з особами дикого типу [145].

Якщо у випадку S6K фосфорилування призводить до її активації, то білок 4E-BP1 у фосфорильованій формі є неактивним. 4E-BP1 належить до родини білків репресорів трансляції. У ссавців виявлені три підтипи низькомолекулярних білків (4E-BP1, 4E-BP2, 4E-BP3), які кодуються трьома різними генами, проте у дрозофіли експресується тільки один білок 4E-BP [14; 144]. В результаті інгібування комплексу TORC1 білок 4E-BP приєднується до фактору ініціації трансляції eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) [28]. У комплексі з 4E-BP трансляційний фактор eIF4E не може зв'язатись з eIF4G (eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1), таким чином перешкоджаючи утворенню комплексу eIF4F [73]. Активованій комплекс TORC1 фосфорилує 4E-BP, який у такій формі втрачає здатність взаємодіяти з eIF4E та інгібувати таким чином трансляцію [28; 189].

Надекспресія гена *d4ebp*, який кодує білок зв'язування фактору ініціації трансляції 4E у плодової мушки, призводить до зменшення розмірів клітин, проте мутанти за даним геном життєздатні та не проявляють відмінностей у

рості та розвитку порівняно з контрольними тваринами [144]. Однак дослідження Зід та колег показали, що надекспресія *4ebp* у *D. melanogaster* продовжує тривалість життя самців на 11%, а самок – на 22% [232].

Завдяки роботам на модельних об'єктах було показано, що сигнальний шлях TOR регулює швидкість старіння клітин та тканин [142; 222], тим самим впливаючи на тривалість життя цілого організму. Встановлений зв'язок між процесами, які контролюються TOR, та старінням, що робить можливим отримання розуміння цілісної картини про те, як пов'язані процеси росту та розвитку з тривалістю життя. Найбільш дослідженими клітинними процесами, які регулюються шляхом TOR, є біосинтез білка, біогенез рибосом, біосинтез ліпідів, аутофагія та енергетичний обмін [113; 142]. Оскільки TOR регулює клітинні процеси у відповідь на доступність поживних речовин, обмеження доступності калорій є важливим фактором, який продовжує тривалість життя організмів за участю даного сигнального шляху [99].

Біосинтез білка є важливим та найбільш вивченим процесом, який регулюється сигнальним шляхом TOR. Існує обернений взаємозв'язок між інтенсивністю трансляції та тривалістю життя. Інгібування біосинтезу білка через обмеження доступності амінокислот у харчовому раціоні продовжує тривалість життя багатьох видів [98]. Отже, опосередковані зміни інтенсивності трансляції безпосередньо впливають на старіння організму.

Окрім регуляції синтезу білків, mTORC1 бере участь у синтезі мембранних ліпідів у клітинах, які проліферують [112]. Регуляцію ліпогенезу mTORC1 здійснює через транскрипційний фактор SREBP1/2, який контролює біосинтез жирних кислот та холестеролу. У відповідь на наявність факторів росту SREBP1/2 активується та мігрує з ендоплазматичного ретикулуму до ядра для активації транскрипції генів, які кодують білки відповідальні за ліпогенез [120; 216]. Контроль активності SREBP1/2 відбувається опосередковано через рибосомальну S6 кіназу [120; 216]. Індукція ліпогенезу через активацію SREBP1/2 може провокувати розвиток раку шляхом інтенсифікації синтезу ліпідів, які необхідні для мембран. Цей факт свідчить про те, що комплекс

mTORC1-SREBP1/2 відіграє важливу роль у рості та розвитку ракових клітин [112].

Оскільки сигнальний шлях TOR чутливий до надходження поживних речовин, він також контролює процес клітинної відповіді на голодування – автофагію. Він спрямований на збереження гомеостазу та життєздатності клітини та супроводжується деградацією частини цитоплазми з органелами за умов обмеження доступності калорій з метою повторного використання клітинних ресурсів. Процес характеризується утворенням багатьох двомембранних везикул – автофагосом, які згодом деградують у лізосомах [117]. Комплекс mTORC1 сприяє процесам росту та розвитку через пригнічення автофагії. При інгібуванні mTORC1 формуються автофагосоми, які містять цитоплазматичні білки та органели. Автофагосоми з їх вмістом деградуються у лізосомах та відбувається переробка “будівельних блоків” клітини [113]. Описана регуляція відбувається за участю комплексу ULK1, який складається з кінази ULK1, Atg13 і Atg101 (гени, пов’язані з автофагією), та FIP200 (білок, який взаємодіє з адгезійними кіназами) [199]. Активний mTORC1 безпосередньо фосфорилує та пригнічує активність ULK1 – кіназний комплекс, який відповідає за ініціацію автофагії [94]. За умов пригніченої активності mTORC1 він дисоціює від комплексу ULK1, активуючи його таким чином. Активна ULK1 фосфорилує Atg13 та FIP200, які запускають процес утворення автофагосом [199]. Інгібування сигнального шляху TOR підвищує інтенсивність автофагії та забезпечує запуск механізму, який пояснює ефект зниженої активності TOR при продовженні тривалості життя [79].

Відомо, що mTORC1 підвищує синтез АТФ та інтенсифікує метаболізм, зокрема він інтенсифікує гліколіз через активацію транскрипції та підвищення рівня HIF-1 $\alpha$  (фактор індукований гіпоксією) [26], який стимулює експресію багатьох гліколітичних генів [113]. На відміну від mTORC1, mTORC2 нечутливий до впливу поживних речовин, хоча змінює свою активність у відповідь на дію факторів росту. mTORC2 контролює кілька кіназ з родини



AGC таких як Akt, SGK1 та протеїнкіназу С- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ), які беруть участь у регуляції метаболічних процесів [113].

Аналіз досліджень, проведених на різних модельних об'єктах, дозволив дійти висновку, що генетичні шляхи регуляції тривалості життя є консервативними від одноклітинних організмів до людини. Оцінюючи ефекти зниженої активності шляху TOR на продовження тривалості життя у різних модельних об'єктів та зважаючи на високу консервативність даного сигнального шляху, можна припустити, що люди-довгожителі можуть мати модифікації у генах TOR сигнальної мережі, зокрема тих, що призводять до інгібування TORC1 у дорослому віці. Повне розуміння молекулярних механізмів цього процесу сприятиме пошуку шляхів уповільнення старіння та зниженні ризику прояву захворювань у похилому віці.

### 1.2.2. Інсуліновий сигнальний шлях (IS)

Відомо, що регуляція тривалості життя за участі інсулінового сигнального шляху (insulin signaling – IS) зберігається від нематод до мишей, навіть більше, існує високий ступінь гомології IS між комахами та людиною. Шляхом генетичних маніпуляцій було показано, що IS залучений у регуляції росту клітин та органів [106]. Окрім того, мутації генів, які кодують компоненти даного сигнального шляху, призводять до продовження тривалості життя *D. melanogaster* [159]. Даний шлях контролює ріст, розвиток, метаболізм, стійкість до стресів, розмноження та тривалість життя.

Інсуліновий шлях включає як пептидні ліганди, що діють на віддалено, так і внутрішньоклітинні компоненти. У ссавців лігандами інсулінових рецепторів є інсулін, інсуліноподібні фактори росту (insulin growth factor, IGF) та релаксини [64]. Геноми більшості безхребетних кодують кілька інсуліноподібних пептидів, зокрема, 40 ILPs у *C. elegans* та 8 у *D. melanogaster* (DILPs 1-8) і принаймні один інсуліновий рецептор [24; 50].

У плодової мушки виявлено вісім типів DILP, які продукуються різними кластерами нейросекреторних клітин (НСК) мозку [83]. Приєднання молекули

DILP до рецептору інсуліну (InR) сприяє активації IS, і як наслідок, імпорту глюкози в клітину, накопичення енергії у формі поживних речовин – глікогену та триацилгліцеролів, що, в свою чергу, призводить до клітинного росту [183]. Фосфоінозитол-3-кіназа (ФІЗК) прикріплюється до активованого InR через субстрат інсулінового рецептору (chico), а також через білок-адаптер p60. Окрім того, мембранна локалізація ФІЗК дозволяє їй фосфорилувати фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (ФІД) до фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату (ФІТ). Зворотній напрям даної реакції каталізується фосфатазою Pten, яка таким чином виконує роль інгібітора IS [60]. Вторинний месенджер ФІТ разом з фосфатидилінозитол-залежною кіназою (PDK) приєднується та активує протеїнкіназу-Б (ПК-Б), яка у свою чергу інгібує FOXO [50] (Рис. 1.3). Шляхом регуляції експресії цілої низки генів, транскрипційний фактор FOXO контролює багато фізіологічних процесів у плодової мушки, зокрема стійкість до стресів [108], клітинний цикл [139], апоптоз [29] та метаболізм [9].

Завдяки відносній простоті маніпуляцій з геномом *Drosophila*, дослідниками було створено багато специфічних генетичних мутацій, які дозволяють вивчати роль ILPs та IS у регуляції фізіологічних процесів [72; 148]. Зокрема, дослідження останніх десятиліть, показали, що координація росту і розвитку в *Drosophila* регулюються IS спільно з сигнальним шляхом TOR, який чутливий до надходження поживних речовин. Окрім того, TOR може активувати IS [159]. Показано, що часткова втрата функціональної здатності InR у мух призводить до затримки розвитку та росту ембріону, а на дорослій стадії спричиняє зниження кількості й розміру клітин імагінальних дисків крил [24]. У мух з повним нокаутом гена *dInR* спостерігається смертність на ембріональних стадіях розвитку, що вказує на важливу роль *dInR* у розвитку *Drosophila* [36; 55]. Окрім росту і розвитку, інсуліновий сигнальний шлях регулює репродуктивну здатність плодової мушки [72].

Сигнальні шляхи чутливі до надходження поживних речовин пов'язані складними механізмами в мозку та регулюють поведінку комах. У *Drosophila* різні ILPs, які експресуються в центральній нервовій системі комах, активують

IS в конкретних нейронних шляхах, що регулюють поведінку та харчування особин [52]. Зниження синтезу DILP та інтенсивності IS призводить до збільшення кількості спожитої їжі у личинок мух, які повноцінно харчувалися [221]. Разом з тим, надекспресія DILP та підвищення інтенсивності IS знижує споживання їжі в личинок, які голодували [221]. Мутації генів IS підвищують чутливість *Drosophila* до етанолу [44], що є доказом того, що DILPs та IS залучені у регуляції поведінкових процесів, пов'язаних з харчуванням.

Відомо, що дієтичні та генетичні маніпуляції, які безпосередньо чи опосередковано знижують секрецію інсуліну, продовжують тривалість життя багатьох організмів [162]. Одним з перших досліджень, що показали роль шляху IS в регуляції тривалості життя плодової мушки, було вивчення мутації в гені *chico* [40]. Самки з мутацією субстрату інсулінового рецептору *chico* характеризуються підвищеною тривалістю життя на 48% [40]. Мутація *InR* плодової мушки продовжує тривалість життя у дорослих комах на 85% та призводить до безплідності самок [202]. Ці дані свідчать про те, що інсуліноподібні пептиди функціонують як вторинні сигнальні молекули, а інсуліновий сигнальний шлях регулює фізіологічні процеси та швидкість старіння у *D. melanogaster*.

### 1.2.3. Транскрипційний фактор Мус

Відкриття Мус відбулося при дослідженні пухлин у курчат, які були спричинені онкогенними ретровірусами. При цьому, виявлено онкоген *v-myc*, який призводив до виникнення мієлоцитоматозу (**m**yelocytomatosis) – саркоми та лейкемії [193]. Були виявлені гомолог Мус, його білок-партнер Мах та антагоніст Mnt у плодової мушки *D. melanogaster* [141]. Численні дослідження показали, що Мус активує експресію генів, які залучені у синтезі білка та регуляції метаболізму [42]. У 1930 році вперше була виявлена мутація гена *myc* у *Drosophila*, яку вчені (Eleanor Nichols-Skoog та Calvin Bridges) назвали *diminutive (dm)*, у зв'язку з маленькими розмірами тіла комах. *Diminutive* виявлена як мутація гена *dmyc (Drosophila myc)* у 1996 році [61]. Однією з

найбільших переваг *Drosophila* як модельного об'єкту для дослідження функцій Мус є легкість та доступність спостереження процесів росту. Будь-які мутації гена *dmus* проявляються в дефектах росту. Так, нокдаун *dmus* у личинок призводить до припинення росту та загибелі особин вже на другій личинковій стадії [163]. Такі ж дефекти процесів росту плодової мушки виникають і при мутаціях генів відповідальних за рибосомальні білки (клас мутацій *Minute*), а також інші компоненти біогенезу рибосом [111]. Це свідчить про те, що Мус є мішенню кінази S6, яка є одним з основних компонентів сигнального шляху TOR [157]. Отже, існує тісна взаємодія між сигнальним шляхом TOR та транскрипційним фактором Мус, що створює своєрідну систему регуляції фізіологічних процесів *Drosophila*.

Відомо, що Мус контролює експресію 15% генів геному людини. У *Drosophila* даний процес також детально охарактеризований: ДНК хеліказа Pontin/Tip49 (або Reptin/Tip48) генетичним та фізичним способом взаємодіє з Мус та контролює експресію генів-мішеней [11].

Надекспресія гена *Mus* проявляється у значному збільшенні розмірів ядра клітини та підвищенні експресії пре-рРНК. Збільшення розмірів ядра, зазвичай, свідчить про підвищену активність рибосом [69]. Таким чином, Мус є потенційним протоонкогеном, надекспресія якого спостерігається при виникненні різного типу пухлин у людини. Відомо, що 70% випадків виникнення пухлин у людини пов'язані з надекспресією *Mus* [68]. Також надекспресія *Mus* може призводити до певних метаболічних змін під час ракових захворювань. Дослідження *in vivo* та *in vitro* показали, що основна функція Мус полягає у регуляції процесів клітинного росту [86]. Підтвердженням даної гіпотези є дані, які продемонстрували, що Мус залучений у процесингу РНК, біогенезі рибосом та функціонуванні ядра [11; 81]. Висновки щодо біологічної ролі білків класу Мус (С-, N- та L-Мус) зроблені на основі аналізу їх онкогенних властивостей. Показано, що С-Мус залучений у регуляції проліферації клітини, в той час як функції N- та L-Мус переважно зосереджені на контролі процесу диференціації клітини [48]. Мус

активізує глютаміноліз шляхом ініціації експресії генів, які кодують ферменти даного процесу, наприклад, глютаміназу [215]. Інтенсифікація даного процесу через Мус призводить до виникнення значної потреби ракових клітин у глютаміні.

Дослідження останніх років зосереджені, в основному, на встановленні опосередкованих шляхів зниження інтенсивності експресії Мус через інгібування кофакторів, які взаємодіють з Мус [169]. Виявлені компоненти, які інгібують Мус шляхом блокування приєднання до Мах або стабілізації гомодимеризації Мах, та показана значна ефективність даних маніпуляцій у ракових клітинах [93].

Ступінь гомології між білком Мус *Drosophila* та білком с-Мус людини становить всього 26%, однак рівень гомології значно зростає до 57% порівнюючи функціональні аспекти, таких як домени Acidic Box та PEST [61]. Навіть більше, обидва білки виконують одні й ті ж функції, оскільки було показано, що експресія с-Мус компенсує летальний ефект мутації *dmус* [13]. Також dМус частково компенсує дефекти у процесах проліферації при зниженні активності с-Мус в ембріонах мишей [211]. Отже, логічно постає питання про здатність поживних речовин та факторів росту регулювати процеси росту за участю Мус як на рівні транскрипції, так і на рівні активності білка.

### **1.3. Взаємодія сигнальних шляхів TOR/IS та транскрипційного фактору Мус у регуляції фізіологічних процесів та старіння *Drosophila***

Старіння, яке тривалий час вважалося виключно результатом зношеності певних систем клітини, насправді регулюються специфічними сигнальними шляхами. З віком відбуваються зміни тканинного гомеостазу, що призводить до порушення здатності організму реагувати на стрес і, як наслідок, різко підвищується ризик розвитку захворювань та смертності. Старіння також пов'язане зі зниженням регенеративної здатності тканин, підвищенням ризику виникнення дегенеративних хворіб та раковими захворюваннями [218]. Все ще

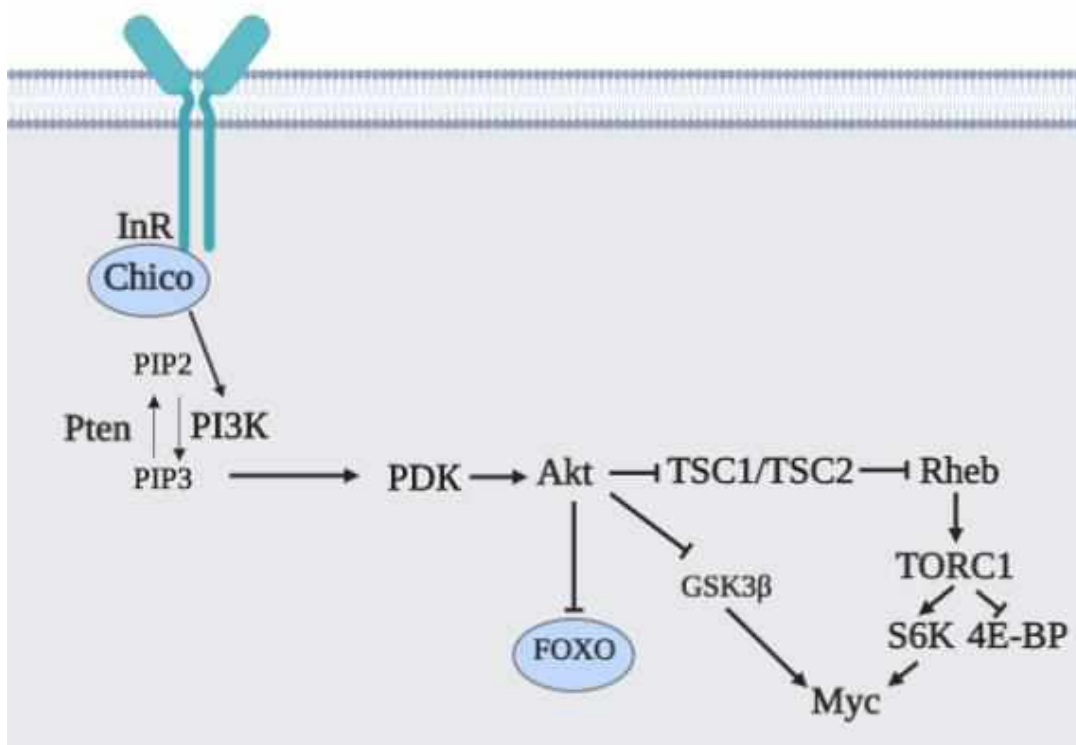
залишається малодослідженим питання про те, як зниження функціональної здатності стовбурових клітин з віком може впливати на тривалість життя. Однак, механізми, які контролюють тривалість життя, частково реалізують свої функції через регуляцію активності стовбурових клітин. Цікаво, що генетичні маніпуляції, які покращують гомеостаз стовбурових клітин через інгібування гіперпроліферації та усунення дефектів диференціації, продовжують тривалість життя *Drosophila* [15]. Подібно до інших клітин організму, старіння стовбурових клітин пов'язане з накопиченням пошкоджень [17]. Зниження функціональної здатності стовбурових клітин під час старіння може бути прискорене за рахунок вкорочення довжини теломер, пошкодження ДНК та мітохондрій [38; 182; 186]. Старіння стовбурових клітин може бути сповільнене при обмеженні споживання калорій [35; 114; 129], що свідчить про ключову роль сигнальних шляхів, які чутливі до надходження поживних речовин, у регуляції старіння стовбурових клітин.

На даний час багато уваги приділяється дослідженню регуляторних шляхів, які залучені в регуляції тканинного гомеостазу, що критично важливо для виживання організму. Відомо, що клітина регулює процеси росту у відповідь на дію двох основних чинників: перший – фактори росту, при чому активується сигнальний шлях IS, другий – поживні речовини, які безпосередньо модулюють активність TOR. Ці два сигнальні шляхи функціонують паралельно та автономно, однак, водночас існують спільні компоненти та мішені. Багато досліджень продемонстрували, що взаємозв'язок між IS та TOR здійснюється через Akt-залежне фосфорилування TSC2 (Рис. 1.3), що призводить до інактивації комплексу TSC1/TSC2 [46; 84].

Додаткова можливість взаємодії між сигнальними шляхами IS та TOR виникає через зворотний негативний зв'язок за участю TOR-залежного інгібування субстрату інсулінового рецептору *chico*, який залучений в активацію IS [77]. Підвищення інтенсивності сигнального шляху TOR призводить до фосфорилування та протеосомної деградації *chico*, що, у свою

чергу проявляється в інгібуванні IS [77]. Також показано, що мутація S6K підвищує кіназну активність Akt у *Drosophila* [172].

Окрім TOR та IS, ще одним потужним регулятором процесів росту та метаболізму є Мус. Продемонстрований негативний вплив *dGSK3* на стабільність білка Мус [57], наводить на висновок про те, що сигнальні шляхи, які залучені у регуляції процесів росту, перетинаються на спільній мішені – Мус (Рис. 1.3). Дана кіназа фосфорилує dМус по двох специфічних залишках серину і таким чином запускає протеосомну деградацію білка dМус. GSK3 є мішенню сигнальних шляхів, які активуються у відповідь на наявність поживних речовин та факторів росту [188]. Активація InR призводить до фосфорилування та інактивації GSK3 кіназою PKB/Akt [230], що є доказом того, що Мус є мішенню IS.



**Рисунок 1.3.** Сигнальна система TOR/IS/Мус.

Рівень фосфорилування і таким чином активації Мус строго корелює з подальшим функціонуванням клітини – чи в ній активно будуть відбуватись біосинтетичні процеси, чи проліферація зупиниться і клітина загине [157]. Вагомим доказом даної гіпотези є результати, які продемонстрували підвищений рівень стабільності білка Мус при активації IS [157]. Цікаво, що

підвищення активності Мус у відповідь на активацію сигнального шляху IS залежить також і від активності сигнального шляху TOR. Якщо IS підвищує мРНК *dMyc* у клітині, то сигнальний шлях TOR регулює Мус на посттранскрипційному рівні [157].

Ще один спосіб взаємодії IS з Мус – через транскрипційний фактор FOXO, який активується за умов голодування та інгібується через IS при достатньому надходженні поживних речовин [170]. FOXO регулює рівень транскриптів Мус у різних типах тканин: FOXO активує Мус у жировому тілі комах за умов голодування, однак не впливає на активність Мус у м'язовій тканині [207]. За допомогою експериментальних досліджень було продемонстровано, що TOR фосфорилує Мус по сериновому залишку Ser77 у ссавців [80]. Так, було показано, що TOR бере участь як у транскрипційній [207], так і у посттранскрипційній регуляції Мус [157]. Окрім того, ГТФ-аза Rheb впливає на рівень білка Мус незалежно від активності сигнального шляху TOR [157]. Даний процес реалізується через модуляцію активності GSK3. Також відомо, що TOR інгібує GSK3 шляхом фосфорилування кіназою S6 у ссавців [230]. Отже, сигнальний шлях TOR чинить вплив на Мус на двох рівнях – S6K та Rheb.

Також було виявлено взаємозв'язок між комплексом TORC2 та Мус [109]. Цитоплазматичне розташування Мус зумовлене інгібуванням TORC2 [109]. Отже, TORC2 бере участь у регуляції процесів росту та метаболізм через регуляцію активності Мус.

Дослідження Телемана та колег (2008) продемонстрували, що нокаут гена TSC1 є недостатньою умовою для інтенсифікації процесів росту тканин за умов втрати активності Мус. Також надекспресія Мус не компенсувала інгібування TOR [207]. Тому можна зробити висновок, що хоча Мус є одним з основних компонентів сигнальної системи, яка регулює функціонування, ріст і поділ клітин та діє як мішень TOR та IS, однак надекспресія Мус не здатна компенсувати ефекти від інгібування даних сигнальних шляхів.



## Висновки до розділу 1

Проаналізовано літературні джерела щодо взаємозв'язку між сигнальними шляхами, які чутливі до надходження поживних речовин, для регуляції функціонування СКК, та, як наслідок, старіння цілого організму. Кишківник *Drosophila* є перспективною модельною системою для встановлення механізмів функціонування стовбурових клітин, імунних реакцій та взаємозв'язку між регенеративною здатністю та старінням.

Літературні дані вказують на існування взаємозв'язку між активністю СКК та тривалістю життя [15]. Результати досліджень Біто та колег (2008) продемонстрували, що зниження регенеративної здатності клітин кишківника скорочують тривалість життя плодової мушки. Навіть більше, взаємозв'язок між активністю СКК та тривалістю життя реалізується за участю сигнальних шляхів, чутливих до поживних речовин, а саме – IS та TOR [90], спільною мішенню для яких є Мус.

Отже, роль Мус у регуляції функціонування СКК *Drosophila* залежить від взаємодії сигнальних шляхів, основним чином, чутливих до доступності поживних речовин та факторів росту. Порушення функціонування даних сигнальних шляхів часто відбувається при таких захворюваннях, як діабет та рак. Тому регуляція активності сигнальних шляхів може бути потенційно важливим фактором для запобігання хвороб та загального покращення фізіологічного стану організму людини.

Це стало основою для фізіологічних та біохімічних досліджень ролі сигнальної системи TOR/IS/Мус у регуляції функціонування СКК з подальшою розробкою проєктів по опису застосування модуляцій активностей сигнальних шляхів для запобігання гіперпроліферативних захворювань, метаболічних порушень та сповільнення старіння організму. Підкреслена важлива роль моделі кишківника *Drosophila* в ідентифікації та аналізі фізіологічних та генетичних станів, які блокують патологічні аспекти старіння.

## РОЗДІЛ 2

### Об'єкти і методи досліджень

#### 2.1. Лінії мух

У роботі використовували плодову мушку *Drosophila melanogaster* наступних ліній:

- $w^{1118}$ ; +/+; +/+; *esc-Gal4, UAS-GFP tub-Gal80<sup>ts</sup>*
- $w^{1118}$ ; +/+; +/+; *Su(H)GBE-LacZ-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80<sup>ts</sup>*
- $w^{1118}$  – *BDSC 3605*;
- $w^{1118}$ ; +/+; *UAS-inr-RNAi/UAS-inr-RNAi*; +/+
- $w^{1118}$ ; +/+; *UAS-pten-RNAi/CyO*; +/+
- $w^{1118}$ ; +/+; *UAS-tor-RNAi/CyO*; +/+
- $w^{1118}$ ; +/+; *UAS-rheb/UAS-rheb*; +/+
- $w^{1118}$ ; +/+; *UAS-rheb, UAS-myc/UAS-rheb, UAS-myc*; +/+

Лінії мух були люб'язно надані лабораторією професора Брюса Едгара (Хейделберг, Німеччина), а також  $w^{1118}$  була з колекції Блумінгстонського Стокового Центру університету Індіани (США).

#### 2.2. Реактиви

У дослідженні використовували реактиви виробництва „Sigma Chemical Co.” (США), „Сормау” (Польща). Решта реактивів були вітчизняного виробництва класу не нижче ч.д.а.

#### 2.3. Умови утримання лабораторних ліній *D. melanogaster*

Мухи утримувались при температурі 25°C та відносній вологості повітря 60-65% у пробірках об'ємом 150 мл які заповнювались 25 мл поживного м'ясо-дріжджово-кукурудзяного середовища наступного складу у відсотках (маса/об'єм): 5% сухих дріжджів («Львівські дріжджі»), 6,1% кукурудзяної крупи, 1% агару, а також (об'єм/об'єм) 7,5% м'яси. Наважки доводили до бажаного об'єму дистильованою водою та тричі кип'ятили. Для пригнічення

росту цвілевих грибів до середовища додавали 0,18% (маса/об'єм) ніпагіну (метилпарабензойна кислота) та 0,6% (об'єм/об'єм) пропіонової кислоти.

#### 2.4. Схрещування, які проводилися в роботі

Для отримання експериментальних мух використовували чутливу до температури Gal4-UAS систему [21]. Білок Gal4 складається з 881 амінокислоти, був виявлений у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та залучений у метаболізмі галактози. Gal4 приєднується до послідовності UAS (Upstream activating sequence) та запускає експресію гена, який знаходиться під контролем цієї промоторної послідовності. Gal4-UAS – це двокомпонентна система, в якій драйверна лінія, яка тканинно-специфічно експресує білок Gal4, а інша – містить послідовність UAS з генетичною конструкцією, експресію якої планується провести. Для активації транскрипції, драйверну лінію схрещують з лінією UAS та отримують нащадків з експресією певного гена у певній тканині. Окрім надекспресії, в нашій роботі ми також використовували метод інтерференційних РНК (РНКі, RNAi) для проведення нокдауну певних генів. Мухи, які містили в геномі UAS-RNAi для певного гена при схрещенні із лініями Gal4, давали нащадків, у яких практично не відбувалася експресія певного гена у певній тканині. Нокдаун гена відбувається внаслідок утворення дволанцюгової РНК (double stranded RNA – dsRNA), яка під дією рестриктази DICER розщеплюється до коротких дволанцюгових фрагментів РНК (short interfering RNAi – siRNA) [105]. Приєднання до siRNA певного набору білків (специфічних для кожного виду) сприяє утворенню комплексу RISC (RNA-induced silencing complex), який комплементарно приєднується до певних ділянок іРНК та призводить до її деградації [5].

Для одержання необхідних в роботі генотипів було проведено низку схрещувань. Вихідними лініями для здійснення надекспресії *rheb*, *myc-rheb* та нокдауну генів *inr*, *pten*, *tor* у стовбурових та похідних клітинах кишківника, шляхом використання Gal4-UAS-системи, слугували трансгенні лінії *UAS-rheb*, *UAS-myc-rheb*, а також *UAS-inr-RNAi*, *UAS-pten-RNAi*, *UAS-tor-RNAi* відповідно. В

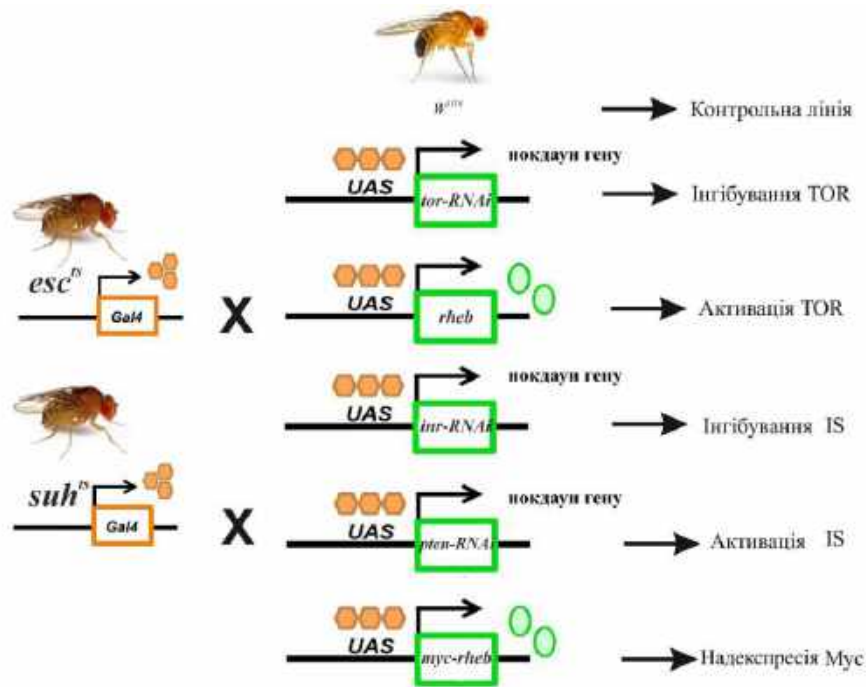
результаті цих схрещувань експресія відбуватиметься в клітинах, в яких буде активований промотор UAS. Схрещування драйверних ліній Gal4 із лініями UAS призводить до зв'язування білока Gal4 з промоторною послідовністю UAS та викликає експресію послідовності, яка розташована під промотором UAS [21]. Незайманих самок лінії *esc<sup>ts</sup>* (для модуляції сигнальної системи у стовбурових клітинах та їх недиференційованих похідних ентеробластах) та *suh<sup>ts</sup>* (для модуляції сигнальної системи тільки в ентеробластах) [142] з самцями, які містили у геномі різні типи UAS послідовностей (Рис. 2.1). Відомо, що в кишківнику дрозоділі наявно близько 1000 *esc+* клітин та близько 300 *suh+* клітин. Окрім того, описані драйвери можуть проявляти незначну експресію у інших тканинах тіла дрозоділі (Табл. 2.1).

**Таблиця 2.1.** Експресія драйверів *esg* та *suh* у тілі дорослої особини *Drosophila* (відповідно даних FlyAtlas).

<u>Тканини</u>	<u>esg</u>	<u>suh</u>
Мозок		+
Грудно-черевний ганглій		+
Воло		+
Середній кишківник	+	+
Задній кишківник	+	
Жирове тіло		+
Яйники		+
Сім'яники	+	

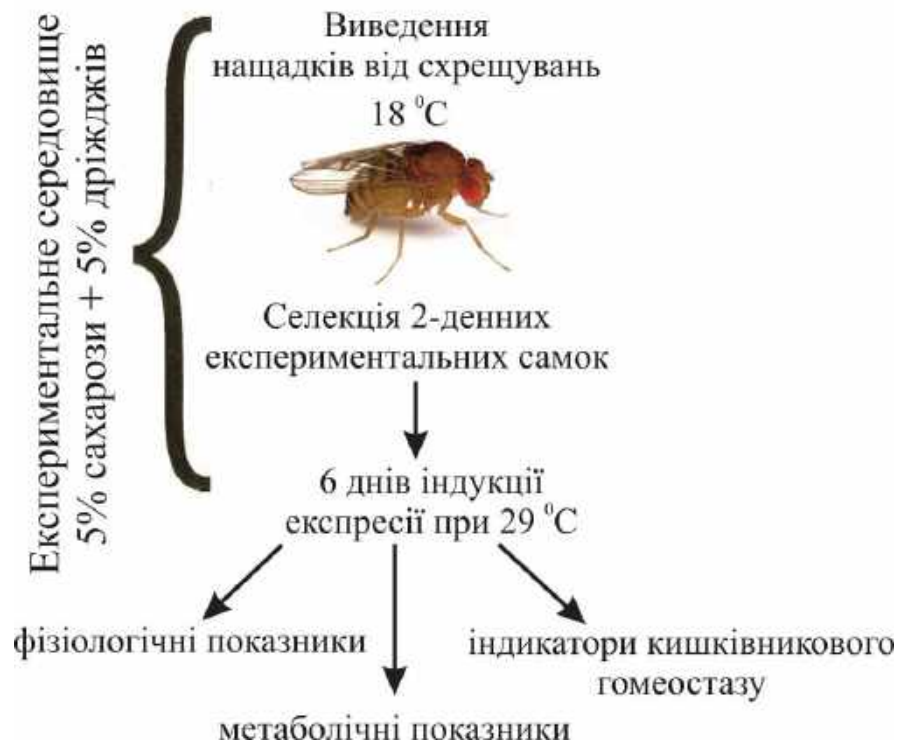
Для інгібування сигнального шляху TOR використовували *UAS-tor-RNAi*, а для його активації – *UAS-rheb*. Інгібування інсулінового сигнального шляху відбувалось при використанні лінії *UAS-inr-RNAi*, а його активація – *UAS-pten-RNAi*. Окрім того, для активації TOR/Мус сигнальної гілки проводили схрещування з самцями лінії *UAS-myc-rheb*. Контрольних особин отримували шляхом схрещування самок ліній *esc<sup>ts</sup>* та *suh<sup>ts</sup>* із самцями лінії *w<sup>1118</sup>*. Детальні схеми схрещувань подані у додатку 1. Ефективність конструктів RNAi з

використанням драйверу *tubulin<sup>ts</sup>-Gal4* подано в Додатку 2 і становить 57% для *inr-RNAi*, 71% – *pten-RNAi* та 71% для *tor-RNAi*.



**Рисунок 2.1.** Схема отримання експериментальних особин.

Після схрещування мух поміщали у скляні банки, які містили 20-25 мл дріжджово-цукрового середовища наступного складу у % (маса/об'єм): 5% сухих дріжджів, 5% сахарози, 1% агару та 0,18% ніпагіну для відкладання яєць (Рис. 2.2). Оскільки ми використовували чутливу до температури систему Gal4-UAS, розвиток особин відбувався при 18°C з метою запобігання експресії UAS-конструктів. При 18°C білок Gal80 інгібує приєднання Gal4 до послідовності UAS. Мух, які вилупилися після схрещування, переносили у пластикові пробірки з експериментальним середовищем наступного складу у відсотках (маса/об'єм): 5% сухих дріжджів, 5% сахарози, 1,2% агару та 0,18% ніпагіну. Після вилуплення пробірки з експериментальними мухами поміщали в інкубатор на 29°C для індукції експресії відповідних конструкцій на 6 днів [1]. Селекцію експериментальних самок проводили, використовуючи CO<sub>2</sub> анестезію.



**Рисунок 2.2.** Виведення нащадків від схрещувань.

## 2.5. Визначення тривалості життя

Після шести днів індукції експресії, самок кожної експериментальної когорти поміщали у демографічні клітки (40-100 мух/клітку). Пластикові контейнери місткістю 1000 мл мали у трьох перпендикулярних напрямках широкі отвори (діаметр отворів 9,5 см), кожен з яких закривався сіткою. Кожен з контейнерів містив ще два додаткові отвори діаметром близько 2 см. Один з них слугував для відбору мертвих особин, до іншого прикріплювали пластикову пробірку місткістю 25 мл, яка містила 5 мл експериментального живильного 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 замінювали на свіже і підраховували кількість мертвих мух, яких відбирали з контейнеру. Експеримент проводили у трьох незалежних повторях при 29 °C до загибелі всіх особин.

## **2.6. Визначення стійкості мух до стресових умов**

2.6.1. Стійкість до голодування. Для визначення стійкості до голодування мух поміщали у пластикові пробірки об'ємом 20 мл, які містили 3 мл 0,5% агарози (маса/об'єм). Наважку агарози розчиняли у дистильованій воді та тричі доводили до кипіння. Після охолодження додавали 0,18% ніпагіну. Кожні 6/6/12 (9:00, 15:00, 21:00) годин підраховували кількість мертвих мух до загибелі всіх особин. Експеримент виконували у трьох незалежних повторах, по 20 самок на повтор.

2.6.2. Стійкість до недоїдання. Мух поміщали у пластикові пробірки, які містили середовища з низьким вмістом поживних речовин. Середовище з низьким вмістом вуглеводів містило у своєму складі у відсотках (маса/об'єм) 1% сахарози та 1% агару, а з низьким вмістом дріжджів – 1% сухих дріжджів та 1% агару. Збалансована низькокалорійна дієта містила 0,5% сахарози, 0,5% дріжджів та 1% агару. Всі компоненти розводили у дистильованій воді та тричі доводили до кипіння. Кількість мертвих особин підраховували щодня до загибелі всіх особин та заміняли середовище на свіже. Для експерименту використовували по 20-30 мух в трьох незалежних повторах.

2.6.3. Чутливість до дії менадіону. Для визначення стійкості до оксидативного стресу мух поміщали у скляні пробірки об'ємом 15 мл. На дні пробірки знаходилась серветка змочена розчином 20 мМ менадіону (Sigma-Aldrich, M5750) у 5% розчині сахарози [126]. Кількість мертвих мух підраховували кожні 6/6/12 годин (9:00, 15:00, 21:00) до загибелі всіх особин та заміняли пробірку з серветкою кожні дві доби. Експеримент виконувався при 29 °C у чотирьох незалежних повторах, по 12 мух на повтор.

## **2.7. Визначення кількості спожитої їжі.**

Для визначення кількості спожитої їжі мухами використовували капілярний метод SAFE (capillary feeding assay) [87]. Цей метод дозволяє виміряти кількість спожитої їжі однією мухою. Метод SAFE був модифікований Луцаком та колегами [125]. У даному експерименті муху

поміщали у центрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл з невеликим шматочком (0,5 см x 1,5 см) фільтрувального паперу. До отвору на кришці пробірки прикріплювали капіляр (Drummond Scientific Company) об'ємом 5 мкл та довжиною 32 мм заповнений експериментальним рідким середовищем. Склад експериментального середовища у відсотках (маса/об'єм): 5% сахарози, 5% дріжджового екстракту. Компоненти розчиняли у розчині 0.01% ніпагіну та 0.001% фосфорної кислоти. На кожен генотип тестували по 10 мух, а також ставили по одній контрольній пробірці, яка не містила мух. Штатив з пробірками поміщали у герметично закриту посудину, яка на дні містила невелику кількість дистильованої води для зниження випаровування рідкого середовища з капіляру. Кожного дня вимірювали довжину порожньої частини капіляру та замінювали капіляр з середовищем. Експеримент проводили при 29°C. Експеримент повторювали протягом чотирьох днів та у двох біологічних повторях. Кількість спожитої їжі оцінювали як середнє значення на одну самку за добу.

## **2.8. Визначення плодючості.**

Для визначення плодючості мух кожного з генотипів по одній самці та одному самцю поміщали у скляну пробірку Флоринського з 1 мл експериментального агаризованого середовища 5%С+5%Д. Кожного дня заміняли пробірку із середовищем в 11-12 годині та підраховували кількість відкладених яєць [125, 126]. Експеримент проводили протягом 6-8 днів при температурі 29°C. Експеримент виконували у 2 біологічних повторях, у кожному повторі по 10 пробірок із парами мух на кожен генотип. Кількість відкладених яєць виражали як середнє по кількості яєць відкладених однією самкою за добу.

## **2.9. Визначення вмісту вуглеводів та триацилгліцеролів**

**2.9.1. Концентрація глюкози.** Концентрацію глюкози визначали колориметричним ензиматичним методом з глюкозооксидазою з



використанням діагностичного набору Liquick Cor-Glucose diagnostic kit (Cormay, Польща). Метод дозволяє визначати концентрацію глюкози у системі спряжених реакцій. На першому етапі з глюкози за участі глюкооксидази утворюється глюконова кислота та як побічний продукт пероксид водню. На другому етапі пероксид водню окислює 4-аміноантипірін до 4-(п-бензохінономоноіміно)-фенозину, який має малиново-червоне забарвлення. Інтенсивність забарвлення, прямо пропорційну концентрації глюкози, реєстрували на спектрофотометрі Specoll-211 (Німеччина) при довжині хвилі 500 нм.

Вміст глюкози визначали у гемолімфі та тілі мух. Для отримання гемолімфи попередньо зважених мух поміщали у морозильну камеру (-70 °C) на 10 хвилин. Після цього мух декапітували шляхом інтенсивного струшування пластикових пробірок із мухами. Вимивання гемолімфи здійснювали у 50 мМ натрій-фосфатному буфері у співвідношенні 1:5 (мг мух/мкл буферу) шляхом центрифугування на центрифугі "Eppendorf 5415R" (Німеччина) протягом 6 хв при 3000 g та 4°C. Одержану гемолімфу відбирали і депротейнізували шляхом термічної обробки при 70°C протягом 5 хвилин та повторно центрифугували (13200 об/хв, 15 хв, 4°C) для осадження денатурованих білків. Отриману гемолімфу використовували для визначення вмісту глюкози. Тіла мух, які залишилися після вимивання гемолімфи, гомогенізували автоматичним гомогенізатором Pellet pestle motor (Kontes) у 50 мМ натрій-фосфатному буфері у співвідношенні 1:10 (мг мух/мкл буферу). Гомогенати депротейнізували шляхом термічної обробки (70°C) протягом 5 хвилин. Денатуровані білки осаджували центрифугуванням на центрифугі "Eppendorf 5415R" (Німеччина) протягом 15 хв при 132000 об/хв та 4 °C. Отримані надосадові рідини використовували для визначення вмісту глюкози та глікогену в тілі плодових мушок.

Кінцевий об'єм проби становив 1,1 мл. До складу експериментальних проб входило 10 мкл надосадової рідини чи розчину гемолімфи, 90 мкл дистильованої води та 500 мкл робочого розчину. Одночасно з дослідними

пробами готували проби для побудови калібрувальної кривої з використанням стандартного розчину глюкози у концентрації 0,2 мг/мл. Після 30 хвилинної інкубації на шейкері при 37 °С, додавали 500 мкл дистильованої води та визначали інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі Specoll-211 (Німеччина) при довжині хвилі 500 нм. Вміст глюкози в гемолімфі виражали у молярній концентрації, а в тілі – як кількість глюкози на грам сирової маси (мг/гсм).

2.9.2. Вміст глікогену. Для визначення вмісту глікогену у досліджуваних пробах проводили ферментативне розщеплення глікогену до залишків глюкози. Для цього до 10 мкл надосадової рідини (приготовленої як описано вище) додавали розчину 10 мкл амілоглюкозидази (0,7 Од/пробу) виділеної з *Aspergillus niger* (Sigma 10115) та інкубували при 25°C протягом 4 годин. При цьому розщеплювалися  $\alpha$ -1,4-глікозидні зв'язки глікогену. Після чого додавали 80 мкл дистильованої води та 500 мкл робочого розчину для визначення концентрації глюкози та інкубували протягом 30 хвилин на шейкері при 37°C. Додавали 500 мкл дистильованої води та визначали інтенсивність забарвлення на Specoll-211 (Німеччина) при довжині хвилі 500 нм, яке пропорційне концентрації глюкози.

2.9.3. Рівень триацилгліцеролів. Визначення вмісту триацилгліцеролів (ТАГ) проводили з використанням діагностичного набору (Cormay, Lipoic Cor – TAG). Колориметричний ензиматичний метод полягає в ферментативному омиленні жирів з наступним фосфорилуванням гліцеролу та його окисненням, в результаті чого утворюється дигідроксиацетонфосфат та як побічний продукт пероксид водню, який, у свою чергу, окислює 4-аміноантипірін до хіноніміну з появою малиново-червоного забарвлення.

Після шести днів індукції експресії UAS-конструкцій мух заморожували при -70°C. Гомогенізацію мух автоматичним гомогенізатором Pellet pestle motor (Kontes). Гомогенізація виконувалась у PBS-буфері, що містив 0,05% тритону X-100 (рН 7,4), співвідношення при гомогенізації складало 6:200 (кількість мух :мкл PBST). Отриманий гомогенат інкубували на кип'ячій водяній бані

протягом 10 хвилин і після цього центрифугували 15 хвилин при 13200 об/хв. (21°C) на центрифугі “Eppendorf 5415R” (Німеччина).

Вміст ТАГ визначали колориметрично при довжині хвилі 550 нм на спектрофотометрі “Spekol 211”. До складу проб входило по 40 мкл надосадової рідни, 60 мкл дистильованої води та 300 мкл робочого розчину (1-TG і 2-TG у співвідношенні 1:4). Після 30 хвилинної інкубації, до досліджуваних зразків додавали 1000 мкл дистильованої води і в результаті цього об’єм проби становив 1400 мкл. Одночасно з дослідними пробами готували проби для побудови калібрувальної кривої, для чого використовували розчин триацилгліцеролів з концентрацією 0,25 ммоль/л. Вміст ТАГ виражали як кількість ТАГ (мкг) на міліграм сирової маси.

### **2.10. Визначення цілісності кишківника *Drosophila***

Для виявлення пошкоджень цілісності кишківника ми проводили аналіз «Смурф» [176]. Мух у кількості 100 осіб поміщали у демографічні контейнери, до яких прикріплювали пробірки із середовищем. До експериментального середовища (5% сахарози, 5% дріжджів, 1,2% агару, 0,18% ніпагіну) додавали синій харчовий барвник E133 у концентрації 2,5% та через 12 годин рахували та відбирали мух синього кольору [176]. Мухи фенотипу «Смурф» характеризувались поширенням синього барвника по цілому тілу, що свідчить про порушення цілісності кишківника. Визначення проводили кожні п’ять діб протягом 30 експериментальних днів.

### **2.11. Визначення рівня експресії генів**

Загальну кількість мРНК визначали для певних генів у головах мух (*dilp2*, *dilp3*, *dilp5*), кишківниках (*upd2*, *upd3*, *soc36*, *spi*, *krn*, *vn*, *dilp3*, *perck*, *pus*) та тілах (*dilp6*, *akh*, *tobi*, *perck*, *bmm*, *4ebp*). Кишківник виділяли для проведення визначення рівня мРНК певних генів, для цього використовували протокол описаний Таус et al., 2014. Відповідно до протоколу мух поміщали на чашки Петрі, які попередньо були вкриті шаром агарози та PBS-буферу (Phosphate-

Buffered Saline). Використовуючи пінцети для препарування, притримували з одного боку за грудну клітку, а з іншого плавними рухами витягували кишківник. мРНК виділяли та стабілізували за допомогою набору RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). Праймери, які використовували для аналізу рівня експресії досліджуваних генів, наведені в табл. 2.1 [124].

**Таблиця 2.2.** Праймери використані для проведення ПЛР

Назва гена	Абревіатура	Нуклеотидна послідовність праймерів
Ribosomal protein 49	<i>rp49</i>	F: ATCGGTTACGGATCGAACA R: GACAATCTCCTTGCCTTCT
Croquemort	<i>crq</i>	F: CAGAGCTCTCCTCCGAATTG R: ATGCCGGTGATGAGAAAGAC
<i>Drosophila</i> insulin-like peptide 2	<i>dilp2</i>	F: AGCAAGCCTTTGTCCTTCATCTC R: ACACCATACTCAGCACCTCGTTG
<i>Drosophila</i> insulin-like peptide 3	<i>dilp3</i>	F: TGTGTGTATGGCTTCAACGCAATG R: CACTCAACAGTCTTTCCAGCAGGG
<i>Drosophila</i> insulin-like peptide 5	<i>dilp5</i>	F: GAGGCACCTTGGGCTATTC R: CATGTGGTGAGATTCGG
<i>Drosophila</i> insulin-like peptide 6	<i>dilp6</i>	F: CCCTGGCGATGTATTTCCCAACA R: CCGACTTGACACAAATCGGTTA
Adipokinetic hormone	<i>akh</i>	F: AGACCTCCAACGAAATGCTG R: GTGCTTGCAGTCCAGAAAGAG
Phosphoenolcarboxykinase	<i>pepck</i>	F: TCAATGGCGAATCCTGCTAC R: TCCTTACGTCCACCTTATCC
Target of brain insulin	<i>tobi</i>	F: CCACCAAGCGAGACATTTACC R: GAGCGGCGTAGTCCATCAC
Brummer	<i>bmm</i>	F: GGTCCTTCAGTCCCTCCTT R: GCTTGTGAGCATCGTCTGGT
4E-binding protein	<i>4ebp</i>	F: CCAGGAAGGTTGTCATCTCG R: CCAGGAGTGGTGGAGTAGAGG
Unpaired 2	<i>upd2</i>	F: CACAAGTGCGGTGAAGCTAA R: GGCTCTT CTGCTGATCCTTG
Unpaired 3	<i>upd3</i>	F: GCCCTCTTCAACAACTGAA R: TTTCTTCTGGATCGCCTTTG
Spitz	<i>spi</i>	F: CCTTCTATTTGCGCTTCGAG R: CGCATGTGGTAGGGTAGCTT
Keren	<i>kren</i>	F: CGTGTTTGGCAACAACAAGT R: TGTGGCAATGCAGTTTAAGG
Vein	<i>vn</i>	F: AACGCAGAGGTCACGAAGAT R: GCGCACTATTAGCTCGGAAC
Puckered	<i>puc</i>	F: CATGTGGCTAGCAATTTGA R: GTCTTCGAAAAACGTACAGC
Suppressor of cytokine signaling 36	<i>soc36</i>	F: CAGTCAGCAATATGTTGTCG R: ACTTGCAGCATCGTCGCTTC

Умови та етапи проведення ПЛР: 1. Денатурація 40 циклів – 5 с при 95 °С.

2. Гібридизація – 10 с при 60°С.

3. Елонгація – 72 °С.

Після виділення та стабілізації мРНК, проводили синтез комплементарного ДНК фрагменту (кДНК). При цьому інкубували 2 мкг РНК, 1 мкг дНТФ (дезоксинуклеотидтрифосфати) у концентрації 10 мМ, 0,4 мкл праймерів у концентрації 0,5 мкг/мкл та 9,6 мкл води протягом 3 хв при 90°С.

Після цього зразки переносили на лід та до них додавали 4 мкл буферу та 1 мкл РНКаз. Інкубували 10 хв при 25 °С та додавали зворотну транскриптазу із серією інкубацій: 10 хв при 25°С; 1 год при 37°С; 10 хв при 70°С. Аналіз ПЛР для кожного експериментального зразку та досліджуваного гена проводили у 3-повторах. Зміну значення Ct (cycle threshold) визначали по відношенню до референтного гена *rp49* (*ribosomal protein 49*) для досліджуваних генів у головах та цілих мухах, а також *crq* (*croquemort*) – як референтний ген для кишківника мух.

## 2.12. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів кривих виживання виконували за допомогою комп'ютерної програми R-project (R Foundation for Statistical Computing). Для порівняння кривих 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), де n – це кількість незалежних повторів. Порівняння різниці між середнім арифметичним виконували за допомогою критерію Стьюдента (Student's t test).

## РОЗДІЛ 3

### ВПЛИВ TOR/IS ТА МУС У СТОВБУРОВИХ КЛІТИНАХ КИШКІВНИКА НА ФІЗІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ *DROSOPHILA*

Вивчення молекулярних механізмів функціонування сигнальних шляхів клітин є актуальною проблемою сучасної науки, оскільки їх функціонування і взаємодія є ключовим аспектом у регуляції розвитку та життєдіяльності організму. Відомо, що певні сигнальні шляхи контролюють функціонування стовбурових клітин [1; 196]. Інгібування сигнального шляху TOR сповільнює зниження функціонування стовбурових клітин з віком [74]. Проте, дане питання все ще залишається малодослідженим. Вивчення процесів функціонування сигнальних шляхів у СКК виглядає актуальним не тільки з точки зору консервативності сигнальних шляхів, а і тому, що з'ясування механізмів регуляції гомеостазу кишківника необхідне для розуміння взаємозв'язку між регенеративною здатністю та старінням.

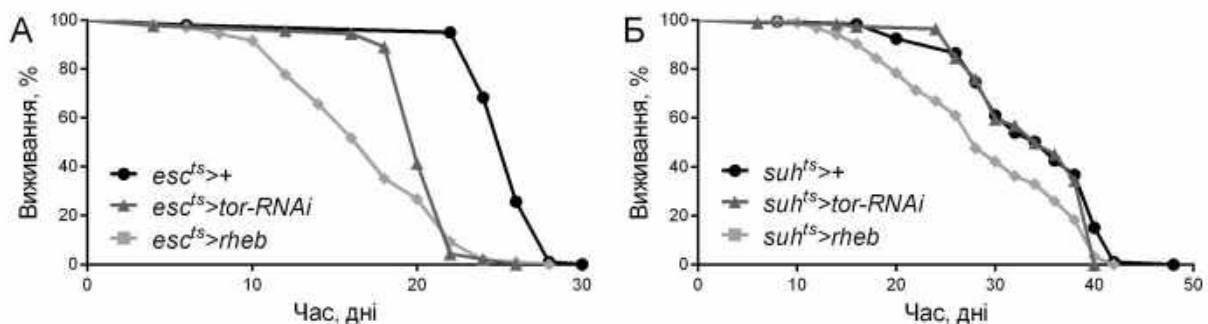
У дослідженнях, описаних у даному розділі, ми вивчали роль сигнальних шляхів TOR, IS та транскрипційного фактору Мус у регуляції фізіологічних параметрів таких як тривалість життя, плодючість, споживання їжі, стійкість до голодування, недоїдання та оксидативного стресу плодової мушки. Ключовим моментом в експерименті була зміна активності сигнальних шляхів у стовбурових та похідних клітинах, що, ймовірно, призводить до змін функціонування інших частин тіла (клітини жирового тіла, яйників) дрозофіли.

#### **3.1. Сигнальний шлях TOR у стовбурових і похідних клітинах впливає на фізіологічні показники *D. melanogaster***

Для встановлення ролі TOR у стовбурових та похідних клітинах ми проводили схрещування для отримання нащадків, у яких відбувалося інгібування (*esc<sup>ts</sup>>tor-RNAi* або *suh<sup>ts</sup>>tor-RNAi*), або активація (*esc<sup>ts</sup>>rheb* або *suh<sup>ts</sup>>rheb*) сигнального шляху TOR. Для активації сигнального шляху TOR проводили надекспресію *rheb*, оскільки відомо, що ГТФ-аза Rheb

безпосередньо приєднується до комплексу TORC1, підвищує кіназну активність Tor у його складі і, таким чином, активує сигнальний шлях TOR. Інгибування відбувалось при нокдауні гена *tor*, який кодує основний компонент обох функціональних комплексів сигнального шляху – TORC1 та TORC2 – кіназу TOR.

Проведені експерименти показали, що як активація, так і інгибування сигнального шляху TOR в обох типах клітин призводить до скорочення тривалості життя мух (Рис. 3.1А та Б). Інгибування сигнального шляху TOR через експресію *tor-RNAi* в *esc*-клітинах призводило до скорочення середньої тривалості життя на 20% порівняно із контролем. Однак нокдаун *tor* тільки в ентеробластах не впливала на даний показник. Ймовірно, нокдаун гена *tor*, призводить до зниження рівня білка TOR у клітині, що, в свою чергу, призводить до інгибування сигнального шляху TOR, який бере участь у контролі процесу проліферації клітин [98].



**Рис. 3.1.** Тривалість життя особин *D. melanogaster* із нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) або надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних (А) клітинах кишківника або ентеробластах (Б).

Оскільки, в даному випадку мішенню генетичних маніпуляції були стовбурові клітини та їх недиференційовані похідні ЕБ, які дають початок всім іншим типам клітин [91], то можна припустити, що експресія *tor-RNAi* в цих клітинах призводить до зниження рівня проліферації стовбурових клітин. При цьому, стовбурових клітин недостатньо для повноцінного відновлення пошкоджених та постарілих клітин кишківника, що може призводити до передчасного

старіння та скорочення тривалості життя плодової мушки. Цікаво, що раніше показали продовження тривалості життя *D. melanogaster* при надекспресії туберозно-склерозних комплексів TSC1/TSC2, домінантно-негативної форми TOR, а також S6K у всіх клітинах тіла мухи [98]. Такі розбіжності результатів можуть бути зумовлені тим, що ми проводили модуляцію сигнального шляху саме в стовбурових клітинах кишківника плодової мушки, а Капахі та колеги (2004) проводили модуляцію сигнального шляху TOR у всіх клітинах тіла дрозофіли.

**Таблиця 3.1.** Аналіз даних тривалості життя особин *D. melanogaster* із нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах кишківника за допомогою тесту Log rank (Mantel-Cox).

		<i>esc<sup>ts</sup>&gt;+</i>	<i>esc<sup>ts</sup>&gt;tor-RNAi</i>	<i>esc<sup>ts</sup>&gt;rheb</i>	<i>suh<sup>ts</sup>&gt;+</i>	<i>suh<sup>ts</sup>&gt;tor-RNAi</i>	<i>suh<sup>ts</sup>&gt;rheb</i>
Тривалість життя (дні)	N	101	92	108	185	195	185
	M ± m	25,5±0,31	23,3±0,59	17,0±0,53	34,0±0,48	32,1±0,52	29,0±0,61
	Різниця,%		-20	-33		-6	-15
	P		<0,0001	<0,0001		0,01	<0,0001
Недоїдання 1%С (дні)	N	60	45	46	46	43	29
	M ± m	6,72±0,21	6,44±0,20	7,89±0,21	6,66±0,19	7,31±0,23	6,04±0,32
	Різниця,%		-4	+19		+8	-11
	P		0,12	<0,0001		0,14	0,03
Недоїдання 1%Д (дні)	N	58	30	45	61	59	63
	M ± m	9,02±0,60	5,21±0,56	12,01±0,57	7,61±0,56	5,92±0,27	8,42±0,42
	Різниця,%		-42	+32		-20	+11
	P		<0,0001	<0,0001			0,19
Недоїдання 0,5%С-0,5%Д (дні)	N	55	54	59	42	57	43
	M ± m	20,4±0,87	12,4±0,43	19,4±0,71	21,5±1,24	17,6±0,71	18,6±1,03
	Різниця,%		-39	-5		-22	-13
	P		<0,0001	0,063		<0,0001	0,0004
Стійкість до голодування (години)	N	56	56	68	59	54	59
	M ± m	83,8±2,24	75,9±2,03	73,8±2,22	117±2,61	116±3,04	106±2,93
	Різниця,%		-9	-12		-1	-10
	P		0,020	0,020		0,818	0,004
Стійкість до оксидативного стресу (години)	N	44	51	46	48	45	47
	M ± m	101±3,91	47,9±2,73	71,9±4,18	58,3±4,76	37,4±2,92	52,3±3,31
	Різниця,%		-52	-29		-35	-10
	P		<0,0001	<0,0001		<0,0001	0,616

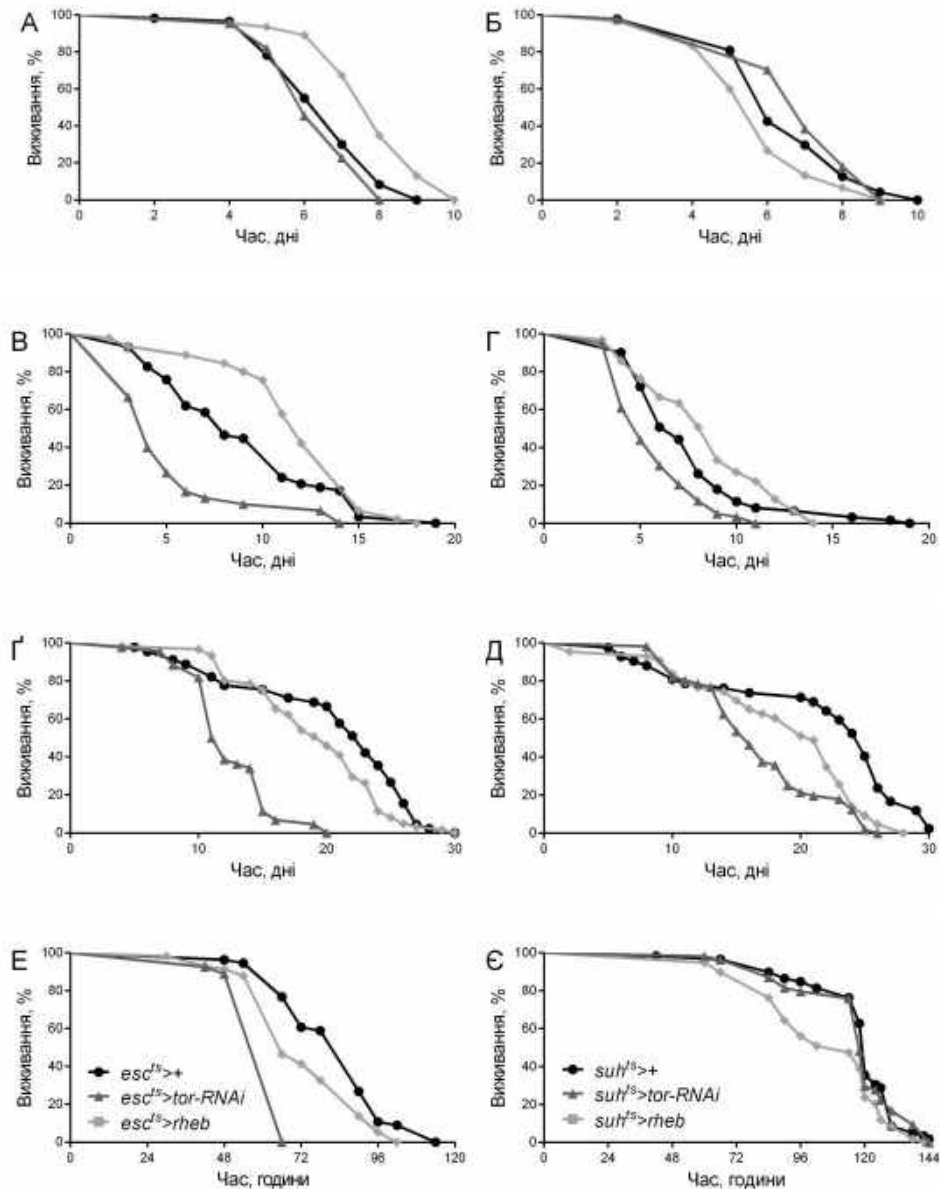
M – середня тривалість життя; N – кількість мух.



Встановлений зв'язок між процесами, які контролюються TOR, та старінням, робить можливим розуміння цілісної картини про те, як пов'язані процеси росту і розвитку з тривалістю життя. Результати наших досліджень продемонстрували, що активація сигнального шляху TOR через надекспресію *rheb* як в *esc*-експерсуючих клітинах (СКК та ЕБ) (Рис. 3.1А) так і у *suh*-клітинах (ЕБ) (на 15%) (Рис 3.1Б) скорочувала тривалість життя на 33% і 15%, відповідно. Це узгоджується з результатами отриманими іншими дослідниками які показали, що інгібування сигнального шляху TOR продовжує тривалість життя у різних модельних організмів, зокрема дріжджів, нематод та плодової мушки [53; 98; 214]. Існує обернений взаємозв'язок між інтенсивністю трансляції, росту і проліферації клітин та тривалістю життя [99]. Отримані результати нашої роботи наводять на висновок про те, що як активація, так і інгібування сигнального шляху TOR призводять до скорочення тривалості життя плодової мушки, що, ймовірно, пов'язане з порушенням гомеостазу кишківника.

Відомо, що доступність поживних речовин є важливим регулятором росту еукаріотичних клітин. При голодуванні та нестачі поживних речовин відбувається зниження рівня трансляції та біогенезу рибосом [210], а також до зміни метаболізму жирів та вуглеводів [22]. Отже на наступному етапі дослідження ми вивчали стійкість до недоїдання та голодування мушок з інгібуванням або активацією сигнального шляху TOR у СКК та ЕБ. Цікаво, що нестача поживних речовин призводила до продовження тривалості життя мух деяких досліджуваних генотипів. Так, при споживанні 1% сахарози (1% С) спостерігали скорочення тривалості життя на 19% у самок з активацією сигнального шляху TOR через надекспресію *rheb* у СКК та ЕБ (Рис. 3.2А). Однак, активація сигнального шляху TOR тільки в ЕБ скорочувала тривалість життя мух на 11% при споживанні середовища з 1% сахарози (Рис. 3.2Б). Інгібування TOR через експресію *tor-RNAi* в обох типах клітин не впливало на стійкість особин при споживанні середовища з 1% сахарози. Споживання їжі, яка містила 1% сахарози, призводило до амінокислотного голодування яке призводить до інгібування TOR шляху у жировому тілі мух [43]. Це

супроводжується інгібуванням InR/PI3K сигнального шляху у периферійних тканинах [43]. В результаті цього знижується активність Акт, яка вже не здійснює фосфорилування dFOXO, що спричиняє підвищення транскрипції *d4ebp* [210].



**Рис. 3.2.** Стійкість мух із нокаутом *tor* (*tor-RNAi*) або надекспресією *rheb* до нестачі поживних речовин: споживання 1% сахарози (А – СКК та ЕБ; Б – ЕБ), 1% дріжджового автолізу (В – СКК та ЕБ; Г – ЕБ), 0,5% сахарози та 0,5% дріжджового автолізу (Г – СКК та ЕБ; Д – ЕБ), умови повного голодування (Е – СКК та ЕБ; Є – ЕБ).

4EBP залучений у регуляцію трансляції як відповідь організму на стресові умови через контроль синтезу білка з уже наявних у клітині мРНК. Тому активація TOR за стресових умов нестачі поживних речовин має позитивний ефект на виживання плодової мушки. Раніше було описано, що рівень амінокислот у їжі модулює активність сигнального шляху TOR [128], хоча механізм, який лежить в основі даного процесу, залишається невідомим. Результати наших досліджень встановили, що низький вміст білка у харчовому раціоні мух (1% дріжджів – 1% Д), у яких здійснювали нокдаун гена *tor* у стовбурових клітинах (Рис. 3.2В) та ентеробластах (Рис. 3.2Г), призводив до скорочення тривалості життя на 42 та 35% відповідно. Цікаво, що підвищення резистентності до даних стресових умов спостерігалось в особин, в яких надекспресували *rheb* у *esc*-клітинах на 32% та у *suh*-клітинах на 11% порівняно з відповідними контролями. Дані результати вказують на те, що активація сигнального шляху TOR компенсує вплив умов недоїдання як стресового фактору.

Показано, що регуляція стійкості до голодування та оксидативного стресу здійснюється за участі білка 4EBP [210]. За умов голодування спостерігається вища активність 4EBP. Також показана його роль в активації набору генів, експресія яких підвищується за умов голодування [231]. Мухи усіх експериментальних генотипів виявилися менш стійкими до умов голодування та збалансованого недоїдання (0,5% С + 0,5% ДА) порівняно з контрольними. Так, умови повного голодування у поєднанні з надекспресією *rheb*, як у *esc*-клітинах (Рис. 3.2Е; Табл. 3.1), так і в *suh*-клітинах (Рис. 3.2Є; Табл. 3.1), призводили до значного скорочення тривалості життя (стовбурові клітини – 12%, похідні клітини – 10%). Активація TOR в ЕБ знижувала виживання особин на 13% порівняно з контролем також за умов зниження доступності калорій (0,5% С + 0,5% Д) (Рис. 3.2Д; Табл. 3.1). Скорочення тривалості життя при повному голодуванні спостерігалось і у мух генотипу *esc<sup>ts</sup>>tor-RNAi* на (10%) (Рис. 3.2Е; Табл. 3.1). Окрім того, експресія *tor-RNAi* як в *esc*- (на 39%) (Рис. 3.2Г; Табл. 3.1), так і *suh*-клітинах (на 22%) (Рис. 3.2Д; Табл. 3.1)

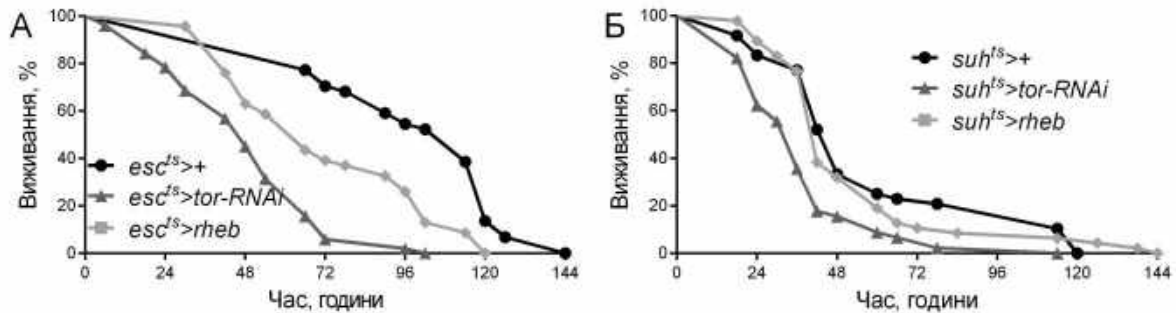
знижувала стійкість до умов збалансованого недоїдання. Відомо, що при голодуванні активність сигнального шляху TOR знижується [43]. Ми припускаємо, що надмірне зниження трансляційної здатності стовбурових та похідних клітин, яке зумовлене умовами голодування у поєднанні з генетичним інгібуванням TOR, призводить до критичного зниження інтенсивності проліферації СКК. При цьому, зменшується пул стовбурових клітин, що негативно впливає на регенеративну здатність, гомеостаз кишківника і, як наслідок, тривалість життя мух.

Відомо, що інгібування сигнальної системи TOR підвищує стійкість до дії стресових факторів [75; 167]. Дослідження проведенні на нематоді та пекарських дріжджах показали, що транскрипційні фактори PNA-4, HIF-1, Gis1 та Msn2/4, які задіяні у реакції організму на стрес, регулюються сигнальним шляхом TOR та позначаються на тривалості життя [140; 194]. Надекспресія *rheb*, *tor* або *s6k* підвищує чутливість мух до оксидативного стресу, а експресія *TSC2* або домінантно-негативної форми TOR наділяє мух підвищеною стійкістю до оксидативного стресу [160]. Інгібування TOR рапаміцином сприяє підвищенню стійкості до голодування та оксидативного стресу [18].

Для дослідження ролі сигнального шляху TOR у регуляції стійкості до прооксиданта, ми піддавали мух дії 20 мМ менадіону, розчиненого у 5% розчині сахарози [126]. Отримані результати вказують на те, що будь-які зміни активності сигнального шляху TOR у стовбурових та похідних клітинах призводять до скорочення тривалості життя за дії індуктора оксидативного стресу (Рис. 3.3; Табл. 3.1). Експресія *tor-RNAi* як у СКК та ЕБ, так і тільки в ЕБ підвищує чутливість даних мух на 52% (Рис. 3.3А) та 35% (Рис. 3.3Б) відповідно.

Інгібування сигнального шляху за допомогою генетичних маніпуляцій у поєднанні з індукованим оксидативним стресом може призводити до надмірного зниження рівня трансляції, а в результаті до значного скорочення тривалості життя мух. Дещо менша ступінь скорочення тривалості життя за даних умов спостерігається при активації сигнального шляху TOR через

надекспресію *rheb* (в *esc*-клітинах на 29%, у *suh*-клітинах – не впливає), оскільки, рівень трансляції в даному випадку знижується тільки за дії оксидативного стресу.

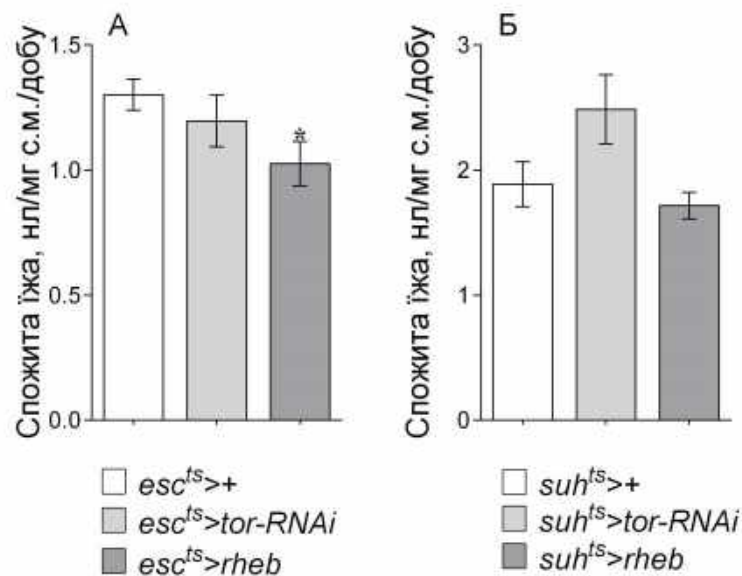


**Рис. 3.3.** Вживання особин із нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних (А) клітинах кишківника або ентеробластах (Б) *D. melanogaster*, за умов оксидативного стресу.

Отже, можемо припустити, що підвищення стійкості до стресу не є необхідною умовою для продовження тривалості життя, однак активність TOR впливає як на стійкість до стресів, так і на тривалість життя. Показано, що білок 4EBP бере участь у регуляції стійкості до голодування та оксидативного стресу *D. melanogaster* [210]. Оксидативний стрес спричиняє дефосфорилування dFOXO, що, у свою чергу, призводить до його переміщення в ядро та активацію транскрипції *d4ebp*, і як результат – зниження інтенсивності синтезу білка, що проявляється зниженням проліферативної активності клітини та порушенням тканинного гомеостазу [95].

Збалансоване споживання поживних речовин є необхідною умовою росту, розвитку та виживання організму. Сигнальний шлях TOR бере участь у збереженні балансу поживних речовин в організмі шляхом регуляції харчової поведінки [212]. Справді, коли перед мушкою виникає вибір, вона може регулювати споживання їжі для підтримання балансу поживних речовин [130]. Кота та колеги (2006) продемонстрували, що сигнальний шлях TOR залучений у регуляції механізмів, які контролюють споживання поживних речовин. Окрім того, TOR функціонує як сенсор АТФ для контролю споживання їжі [47]. АТФ

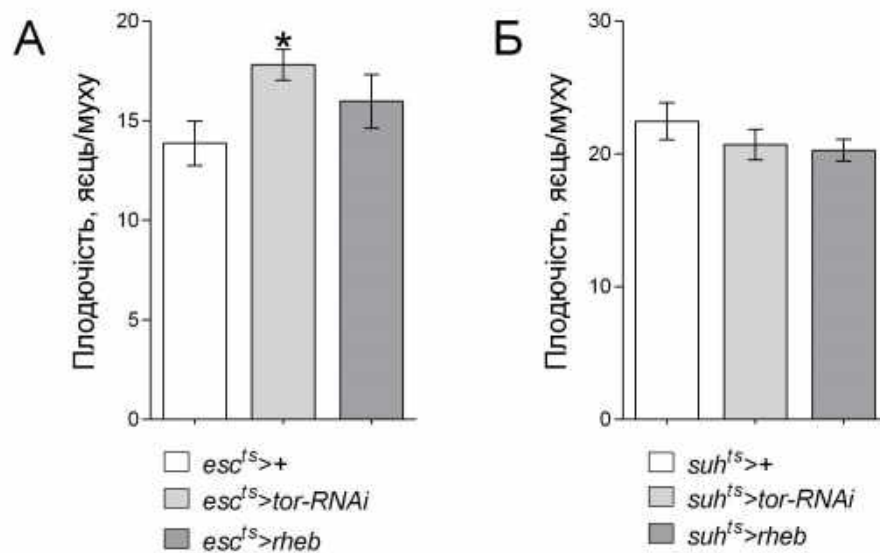
активує сигнальний шлях TOR, таким чином модулюючи енергетичний статус клітини, що, в свою чергу, впливає на інтенсивність проліферації та диференціації [89]. Споживання їжі та плодючість – це два процеси, які контролюються одними й тими ж сигнальними шляхами [8]. Існує позитивна кореляція між кількістю спожитої їжі самкою та кількістю відкладених яєць [8]. Тому нам, насамперед, було важливо з’ясувати, чи існує взаємозв’язок між даними параметрами, а також активністю сигнального шляху TOR у стовбурових та похідних клітинах. Для цього ми визначали кількість спожитої їжі кожною окремою мушкою, використовуючи метод капілярного живлення [126], а також підраховували кількість відкладених яєць однією мухою за добу. Активація сигнального шляху TOR через надекспресію *rheb* призводила до зниження кількості спожитої їжі на 30% (Рис. 3.4А), але не впливала на кількість відкладених яєць (Рис. 3.5А).



**Рис. 3.4.** Споживання стандартної рідкої їжі самками з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середне  $\pm$  похибка середнього,  $n=10$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc*<sup>ts</sup>>+, *suh*<sup>ts</sup>>+).

Самки генотипу *esc*<sup>ts</sup>>*tor-RNAi* відкладали на 22% менше яєць (Рис. 3.4А), однак не відрізнялися у кількості спожитої їжі від контрольних (Рис. 3.5А). Як

видно з рис. 3.4Б та Б, як активація, так і інгібування сигнального шляху TOR тільки в ЕБ не впливали на кількість спожитої їжі та плодючість самок. Відомо, що “sex peptide” стимулюють споживання їжі самками після спарювання [33], а енергія, яка використовується для спарювання, компенсується коштом підвищеного рівня споживання їжі.



**Рис. 3.5.** Плодючість самок із нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=20$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Тому споживання їжі та плодючість є взаємозалежними та виступають важливим показником фізіологічного стану організму. Дослідження на ссавцях показали участь сигнального шляху TOR у регуляції кількості споживання їжі, яка реалізується шляхом модуляції активності даного сигналювання у клітинах гіпоталамусу у відповідь на надходження в організм харчових компонентів, а також гормонів – лептину та інсуліну [32; 45].

Таким чином, ми встановили, що модуляція сигнального шляху TOR у невеликій популяції стовбурових клітин впливає на фізіологічний стан цілого організму. Так, ми показали, що активація/інгібування TOR у СКК та ЕБ впливає на стійкість до стресів, споживання їжі, репродуктивну активність та тривалість життя цілого організму. Це, ймовірно, пов'язане з тим, що

регенеративний потенціал СКК, який знаходиться під жорстким контролем консервативних сигнальних шляхів, критично важливий для збереження гомеостазу кишківника, та, як наслідок, для виживання організму загалом. Сигнальний шлях TOR перебуває у координованій взаємодії з сигнальними шляхами, які контролюють проліферацію та диференціацію СКК, та регулює баланс між регенеративними процесами та процесами запобігання гіперпроліферативних розладів. Підтримання цього балансу може бути перспективною стратегією для продовження тривалості життя еукаріотичних організмів.

### **3.2. Інсуліновий сигнальний шлях у стовбурових і похідних клітинах впливає на фізіологічні показники *D. melanogaster***

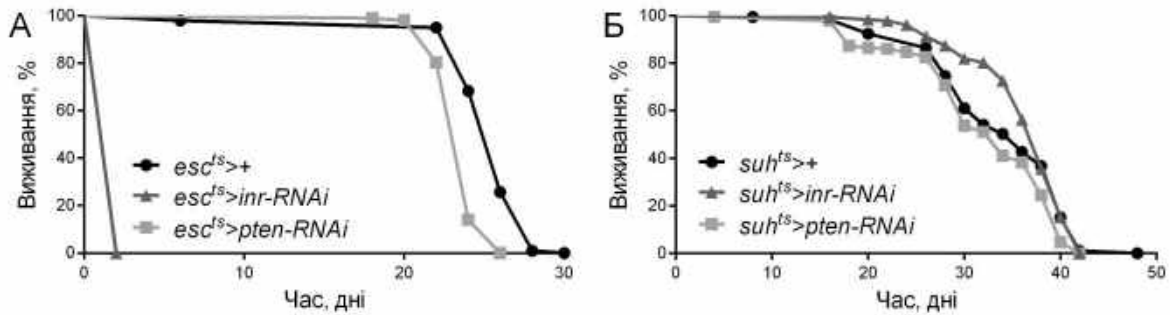
Інсуліновий сигнальний шлях (IS – insulin signaling) бере участь у регуляції процесів росту, розмноження, метаболізму та тривалості життя і є консервативним від нематод до людини. Знайдено, що IS регулює тривалість життя, стійкість до стресів [40; 79], та плодючість у *C. elegans*, *D. melanogaster* та мишей [150; 203]. Висока консервативність основних процесів функціонування IS між ссавцями та дрозоділою дозволяє використовувати плодону мушку для дослідження ролі компонентів цього сигнального шляху у регуляції тривалості життя. У *Drosophila* регуляція тривалості життя інсуліновим сигнальним шляхом була встановлена шляхом мутації генів, які кодують основні компоненти IS [66]. Крім того, IS залучений у контролі проліферації та диференціації СКК [37]. У свою чергу, функціонування СКК важливе для підтримання тканинного гомеостазу. Нещодавні дослідження показали, що швидкість проліферації СКК у кишківниках *P. americana* та *D. melanogaster* змінюється у відповідь на зміну харчового раціону та IS [136; 158]. Однак, механізми які опосередковують дані процеси та їх вплив на фізіологію та тривалість життя все ще залишаються невідомими. Тому ми поставили за мету встановити та оцінити вплив інгібування (експресія *inr-RNAi*) та активації (експресія *pten-RNAi*) IS у СКК та ЕБ плодової мушки на метаболізм,



плодючість, споживання їжі, стійкість до стресів та тривалість життя. Оскільки, до рецептору інсуліну (InR) приєднуються молекули DILP і, таким чином, сприяє активації IS [183], ми провели нокдаун *inr* для інгібування IS. Фосфатаза Pten каталізує реакцію дефосфорилювання фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату (ФІТ) до фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату (ФІД), при цьому виконує роль інгібітора IS. Тому нокдаун *pten* як інгібітору IS у нашій роботі призводив до активації даного сигнального шляху.

Відомо, що IS активує СКК через два можливі механізми: а) шляхом підвищення рівня проліферації СКК або б) шляхом перемикання з асиметричного поділу на симетричний [227]. Окрім того, IS активує проліферацію під час старіння та відновлення організму [2; 37]. Тому можна припустити, що будь-які зміни в активності IS у СКК та ЕБ будуть призводити до змін інтенсивностей даних процесів, що спричинить порушення тканинного гомеостазу, та, у свою чергу, матимуть значний вплив на тривалість життя дрософіли.

З даних наведених у таблиці 3.2 видно, що середня тривалість життя мух контрольної групи *esc<sup>ts</sup>>+* становила близько 25 діб. Інгібування сигнального шляху IS через експресію *inr-RNAi* призводить до загибелі особин вже на другий експериментальний день, що свідчить про визначальну роль InR у функціонуванні СКК (Рис. 3.6А). Середня тривалість життя мух генотипу *suh<sup>ts</sup>>inr-RNAi* не відрізнялася від такої контрольних особин (Рис. 3.6Б). Наші результати узгоджуються з попередніми дослідженнями, які показали, що у мух з нокаутом гена *dinr* спостерігається смертність на ембріональних стадіях розвитку, що вказує на важливу роль InR в процесі розвитку *Drosophila* [55]. Проте, варто зауважити, що нокаут гена *inr* у білій жировій тканині мишей продовжував тривалість життя [19]. Відомо, що модуляція IS у різних тканинах має відмінний вплив на фізіологічні процеси, в тому числі й на тривалість життя.



**Рис. 3.6.** Тривалість життя особин *D. melanogaster* із нокаутом *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах кишківника (А) або ентеробластах (Б).

Ми припускаємо, що InR важливий для збереження кількості СКК, тому при нокауті гена *inr* у СКК процес проліферації СКК блокується, що критично важливе для виживання особин. Окрім того, показано, що інгібування IS ссавців призводить до виникнення діабету, що, в свою чергу, характеризується високим рівнем глюкози в крові. Це виникає через зниження рівня поглинання глюкози з крові у тканини м'язів чи печінки [25]. Тому мухи генотипу *esc*<sup>ts</sup>>*inr-RNAi* не здатні утилізувати глюкозу, яка надходить з середовища у вигляді сахарози, що призводить до виникнення гострої форми гіперглікемії та, як результат, призводить до загальної смертності мух даного генотипу.

Активація IS в *esc*-клітинах не впливала на тривалість життя дрозофіли (Рис. 3.6А), однак дана маніпуляція у *suh*-клітинах скорочувала середню тривалість життя мух на 11% (Рис. 3.6Б; Табл. 3.2). Результати добре узгоджуються з попередніми дослідженнями, в яких показали, що надекспресія *pten* продовжує тривалість життя [82]. При інгібуванні сигнального шляху IS за участі білка PTEN, який пригнічує активність сигнального шляху, відбувається транслокація dFOXO в ядро клітини, активується експресія певних генів і, як наслідок, продовження тривалості життя приблизно на 20% [82]. Попередні дослідження продемонстрували суперечливі результати про скорочення тривалості життя за умов інгібування IS в усіх клітинах тіла *Drosophila* [15]. Показано, що зниження рівня експресії *inr* [202] та надекспресія *pten* [82]

продовжує тривалість життя плодової мушки. Ефекти від інгібування/активації IS реалізується через транскрипційний фактор FOXO [66]. FOXO мігрує до ядра, де індукує експресію багатьох генів відповідальних за стійкість до стресів та генів залучених в регуляції метаболізму [16]. Тому наступним етапом нашого дослідження була оцінка стійкості до стресів експериментальних мух за умов модуляції IS у СКК та ЕБ.

**Таблиця 3.2.** Аналіз даних тривалості життя особин *D. melanogaster* із нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах кишківника за допомогою тесту Log rank (Mantel-Cox).

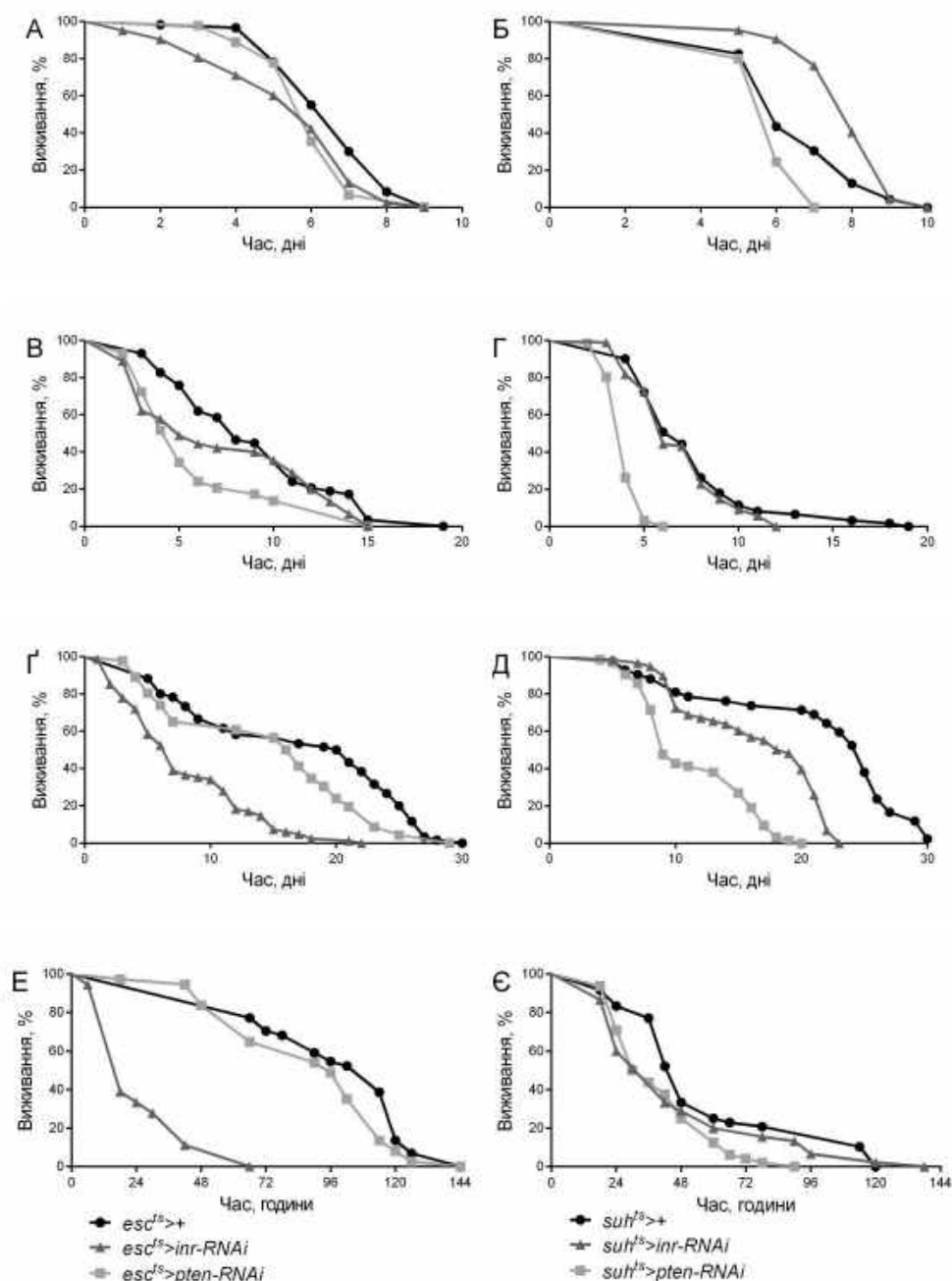
		<i>esc<sup>ts</sup>&gt;+</i>	<i>esc<sup>ts</sup>&gt;inr-RNAi</i>	<i>esc<sup>ts</sup>&gt;pten-RNAi</i>	<i>suh<sup>ts</sup>&gt;+</i>	<i>suh<sup>ts</sup>&gt;inr-RNAi</i>	<i>suh<sup>ts</sup>&gt;pten-RNAi</i>
Тривалість життя (дні)	N	101	27	106	185	185	204
	M ± m	25,5±0,19	2,04±0,00	24,2±0,55	34,0±0,17	36,2±0,41	32,1±0,36
	Різниця,%		-92	-7		+6	-11
	<i>P</i>		<0,0001	0,139		0,353	<0,0001
Недоїдання 1%С (дні)	N	60	59	60	45	58	58
	M ± m	6,73±0,19	5,61±0,22	6,14±0,18	6,7±0,2	8,1±0,2	6,0±0,1
	Різниця,%		-16	-8		+20	-10
	<i>P</i>		0,01	0,02		<0,0001	0,02
Недоїдання 1%Д (дні)	N	58	45	30	60	88	61
	M ± m	9,01±0,63	7,30±0,73	6,03±0,81	7,58±0,21	6,88±0,23	4,09±0,31
	Різниця,%		-19	-33		-8	-46
	<i>P</i>		0,08	0,001		0,29	<0,0001
Недоїдання 0,5%С-0,5%Д (дні)	N	55	60	30	45	58	60
	M ± m	20,3±0,87	9,03±0,66	19,6±0,62	21,52±1,20	16,5±0,68	11,5±0,50
	Різниця,%		-56	-4		-23	-46
	<i>P</i>		<0,0001	0,09		<0,0001	<0,0001
Стійкість до голодування (години)	N	56	12	59	59	59	57
	M ± m	83,7±2,19	47,0±6,7	76,9±1,70	117±2,63	112±2,88	92,9±3,03
	Різниця,%		-60	-8		-5	-21
	<i>P</i>		0,02	0,02		0,82	<0,0001
Стійкість до оксидативного стресу (години)	N	44	18	27	48	45	48
	M ± m	101±3,92	27,7±4,40	89,8±4,77	57,6±4,82	46,7±4,66	40,4±2,62
	Різниця,%		-72	-11		-19	-30
	<i>P</i>		<0,0001	0,075		0,109	0,003

M – середня тривалість життя; N – кількість мух.

Доступність поживних речовин відіграє визначальну 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 дрозозфіли. Відомо, що мухи ліній, які демонструють продовжену тривалість життя, стійкіші до голодування [181]. Більше того, відвищене виживання за умов голодування позитивно впливає на продовження тривалості життя [180]. Наші результати добре узгоджуються із цими даними оскільки ми спостерігали загальну смертність особин *esc<sup>ts</sup>>inr-RNAi* на другу експериментальну добу, мухи даного генотипу також жили близько 48 годин за умов повного голодування (Рис. 3.7Е). Однак, стійкість до голодування самок *esc<sup>ts</sup>>inr-RNAi* була на 60% нижчою порівняно з контролем (Рис. 3.7Е; Табл. 3.2), що підтверджує визначальну роль InR у функціонуванні СКК. Цікаво, що експресія *inr-RNAi* тільки в ЕБ не впливала на стійкість до повної відсутності поживних речовин (Рис. 3.7Є). Спостерігалася вища чутливість особин *esc<sup>ts</sup>>pten-RNAi* (на 8%) (Рис. 3.7Е) та *suh<sup>ts</sup>>pten-RNAi* (на 30%) (Рис. 3.7Є; Табл. 3.2) до повного голодування порівняно з відповідними контролями. Показано, що голодування знижує активність IS, що, в свою чергу, призводить до зменшення розміру кишківника [152]. Слід зазначити, що активація інсулінового сигнального шляху у стовбурових клітинах може бути достатньою умовою для уповільненої втрати стовбурових клітин за умов голодування [136].

Стійкість до недоїдання у мух з експресією *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%). Також варто звернути увагу на те, що інгібування IS тільки в ЕБ продовжувало тривалість життя самок на 20% за умов споживання 1% С (Рис. 3.7Б). Стійкість до недоїдання мух *suh<sup>ts</sup>>inr-RNAi* була нижчою на 23% порівняно з контрольними мухами при споживанні 1% АД (Рис. 3.7Д) та 0,5% С + 0,5% АД (Рис. 3.7Є; Табл. 3.2).

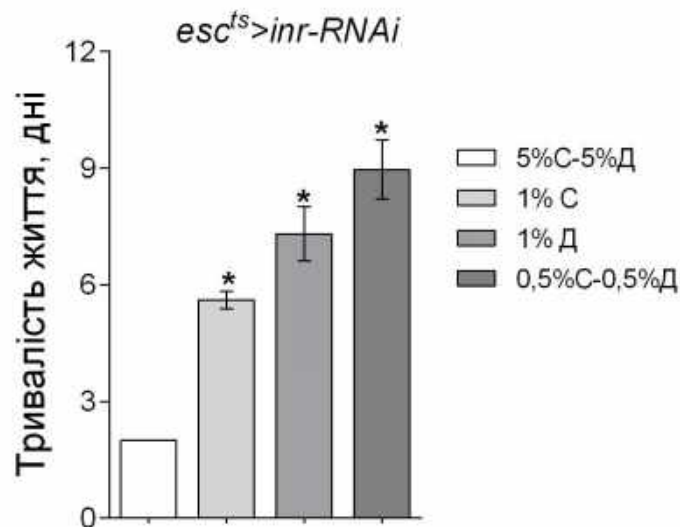


**Рис. 3.7.** Стійкість мух із *inr* (*inr-RNAi*) та нокдауном *pten* (*pten-RNAi*) до нестачі поживних речовин: споживання 1% сахарози (А – СКК та ЕБ; Б – ЕБ), 1% дріжджового автолізу (В – СКК та ЕБ; Г – ЕБ), 0,5% сахарози та 0,5% дріжджового автолізу (Г – СКК та ЕБ; Д – ЕБ), умови повного голодування (Е – СКК та ЕБ; Є – ЕБ).

Цікаво, що недоїдання продовжувало 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, 1% автолізованих дріжджів чи 0,5% С + 0,5% АД продовжувало тривалість життя мух до 6, 7 та 9 діб відповідно (Рис. 3.8). Це ще раз підтверджує наші припущення про те, що при нокдауні гена *inr* мухи не здатні утилізувати глюкозу, яка надходить ззовні. У випадку зниження надходження глюкози знижується ризик виникнення гіперглікемії, при цьому тривалість життя продовжується.

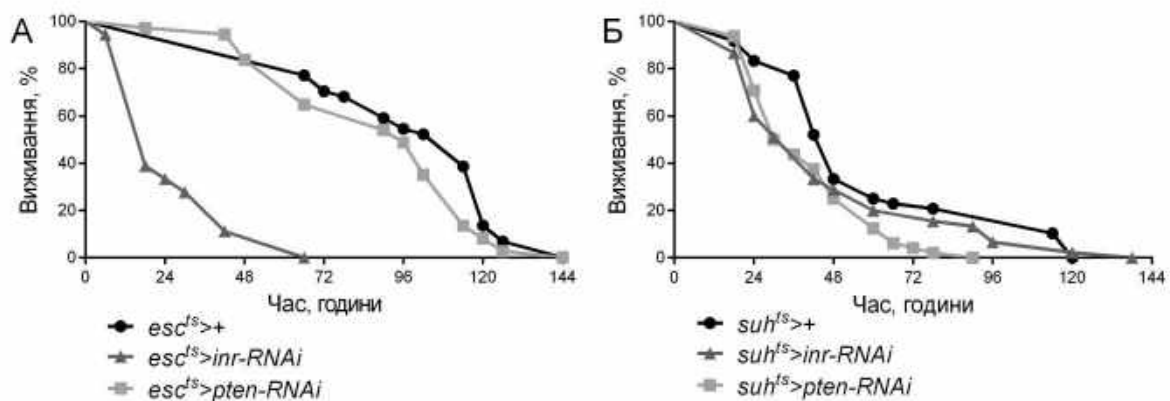
Активація IS в *esc*-клітинах знижувала тривалість життя мух при споживанні дієт 1% С (на 8%) (Рис. 3.7А) та 1% АД (на 33%) (Рис. 3.7В), але при споживанні збалансованої низькокалорійної дієти (0,5% С + 0,5% АД) не спостерігалось відмінностей від контрольного значення (Рис. 3.7Г). Так само, активація IS через експресію *pten-RNAi* тільки в ентеробластах знижувала стійкість до недоїдання при споживанні всіх низькокалорійних дієт (Рис. 3.7Б, Г, Д).



**Рис. 3.8.** Вживання мух *D. melanogaster* генотипу *esc<sup>fs</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).

Результати наших досліджень показали, що інгібування сигнального шляху IS через нокдаун гена *inr* у СКК та ЕБ знижує вживання мух на 72% за дії менадіону (Рис. 3.9А). Хоча експресія *inr-RNAi* тільки в ЕБ не впливала на чутливість мух до дії менадіону (Рис. 3.9Б; Табл. 3.2), а експресія *pten-RNAi*

знижувала виживання мух на 30%. Важлива роль у регуляції стійкості до оксидантів відводиться сигнальним шляхам, які через координовану взаємодію регулюють метаболізм та ріст клітини [218]. Транскрипційний фактор FOXO, який є ключовим регулятором метаболічного гомеостазу, також контролює експресію генів, які залучені у відповіді на дію стресу [218]. Регуляція активності FOXO може відбуватися за кількома шляхами. Показано, що у відповідь на знижену активність IS внаслідок обмеження доступності поживних речовин або стресові фактори, FOXO модулює метаболічні процеси у напрямку від анаболізму до збереження та відновлення клітини [67]. Окрім IS і незалежно від нього, FOXO може активуватись у відповідь на дію сигнального шляху JNK, який регулює експресію генів у відповідь на дію цілої низки стресових чинників [16]. Важливо зазначити, що доведено існування антагоністичного взаємозв'язку між IS та JNK [218], який має значний вплив на метаболічний та регенеративний гомеостаз і, як наслідок, на тривалість життя мух [16; 97]. У випадку підвищеної активності інсулінового шляху (у нашому випадку експресія *pten-RNAi*), яка супроводжується зниженою активністю JNK, тривалість життя скорочується.

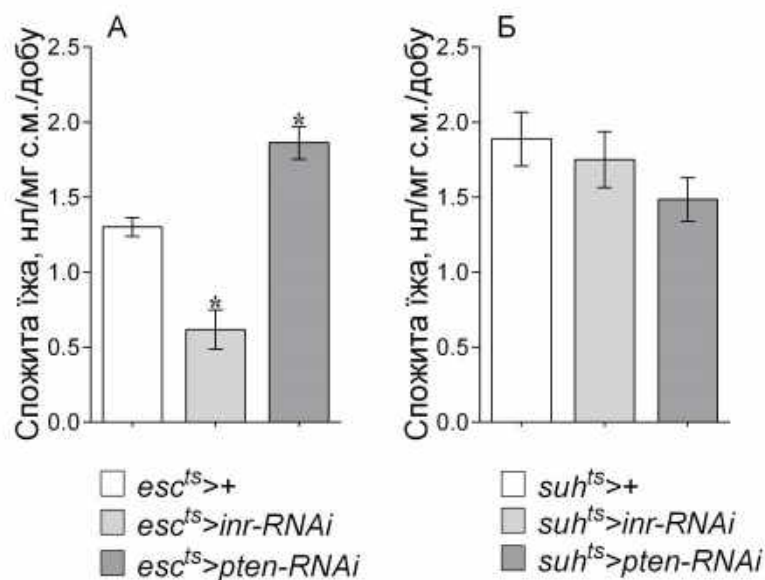


**Рис. 3.9.** Вживання особин із нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних (А) клітинах кишківника або ентеробластах (Б) *D. melanogaster*, за умов дії оксидативного стресу.

Якщо ж активність IS критично низька (у нашому випадку експресія *inr-RNAi*), що супроводжується підвищеною активністю JNK (за умов оксидативного стресу), тривалість життя також знижується. За умов помірного інгібування IS

та помірної активації JNK, метаболічний та регенеративний гомеостазис досягають свого піку, та, як наслідок, тривалість життя продовжується [218]. У даному випадку важливу роль відіграє експресія гена *рис*, який кодує фосфатазу JUN, та рівень експресії якого буде представлено у наступних розділах.

Важливими фізіологічними показниками є інтенсивність споживання їжі та плодючість, які частково корелюють з тривалістю життя та старінням [204]. Споживання їжі істотно впливає на фізіологічний стан організму. Існують механізми, які регулюють кількість спожитої їжі у плодової мушки. Значне місце в регуляції живлення належить серин-треонін кіназам TOR [212] та транскрипційному фактору FOXO [107], який є мішенню дії IS. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження ролі IS у СКК та ЕБ у регуляції кількості спожитої їжі плодової мушки. Мушка контрольного генотипу *esc<sup>ts</sup>>+* споживала близько 1,3 мкл рідкого середовища за добу. Інгібування IS в *esc*-клітинах знижувало кількість спожитої їжі на 52% (Рис. 3.10А).



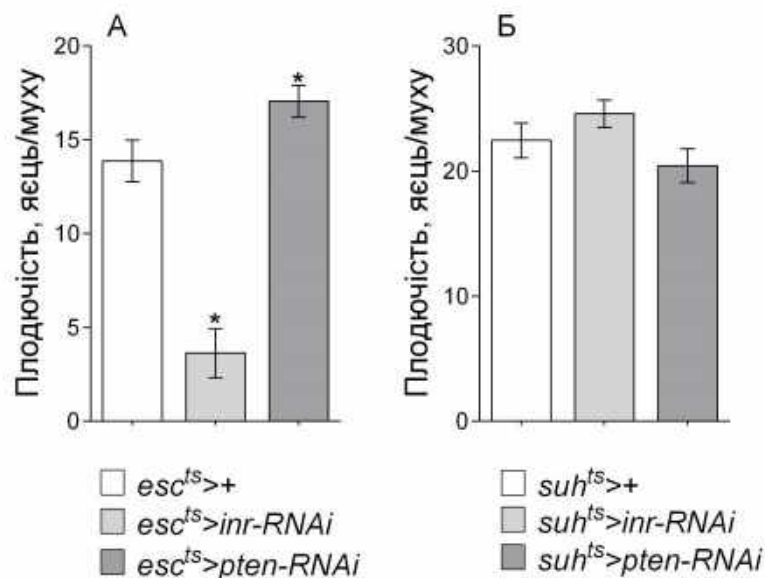
**Рис. 3.10.** Споживання стандартної рідкої їжі мухами із нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=10$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).



Цікаво, що при активації IS кількість спожитої їжі була на 43% вищою у порівнянні з мушкою  $esc^{ts}>+$  (Рис. 3.10А). Активація чи інгібування IS в ЕБ не впливали на кількість спожитої їжі (Рис. 3.10Б).

Подібна тенденція прослідковувалась при дослідженні плодючості самок. Самка контрольного генотипу  $esc^{ts}>+$  в середньому щоденно відкладала 14 яєць (Рис. 3.11А). За умов експресії  $inr-RNAi$  в  $esc$ -клітинах кількість відкладених яєць була на 74% нижчою, а при експресії  $pten-RNAi$  – вищою на 23%. Модуляція активності IS у  $suh$ -клітинах не впливала на плодючість трансгенних мух (Рис. 3.11Б).

Результати наших експериментів узгоджуються з результатами попередніх досліджень, які виявили визначальну роль IS у визначенні поведінки тварин, пов'язаної з живленням та плодючістю [65]. У ссавців активація IS знижує кількість споживання їжі [220], окрім того показана важлива роль IS у регуляції живлення у комах [52]. Також IS бере участь у встановленні функціонального взаємозв'язку між метаболічними процесами та живленням [52].



**Рис. 3.11.** Плодючість самок із нокдауном  $inr$  ( $inr-RNAi$ ) або  $pten$  ( $pten-RNAi$ ) у стовбурових та похідних клітинах ( $esc$ -клітини) (А) та ентеробластах ( $suh$ -клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=20$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи ( $esc^{ts}>+$ ,  $suh^{ts}>+$ ).

Clancy та колеги (2001) продемонстрували нижчий рівень плодючості, який супроводжується продовженою тривалістю життя плодової мушки, за умов інгібування IS. Старіння клітини супроводжується незворотною втратою здатності до поділу.

Відомо, що IS залучений у контролі функціонування стовбурових клітин шляхом регуляції їх старіння. Зниження активності IS у плодової мушки призводить до інгібування процесу проліферації стовбурових клітин статевій системи та, як наслідок, зниження плодючості самок [80]. Отже, мухи генотипу *esc<sup>ts</sup>>inr-RNAi* характеризувалися значно нижчим рівнем споживання їжі, плодючістю і помирали на другу експериментальну добу, що свідчить про критично важливу роль InR у відновленні та збереженні кількості СКК.

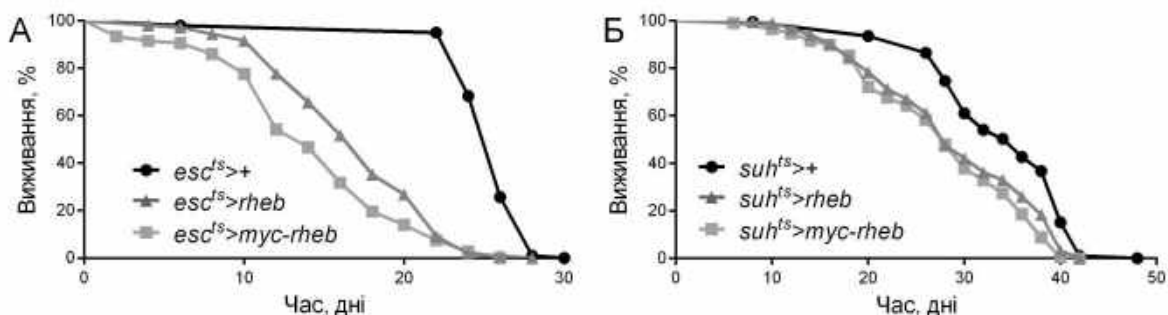
Результати наших досліджень підтверджують гіпотезу про те, що IS відіграє ключову роль у нормальному функціонуванні СКК. Оскільки IS відіграє різну роль у різних тканинах, ми припустили, що модуляція активності IS саме в СКК та ЕБ впливає на фізіологічні процеси в цілому організмі дрозозфіли. Модуляція IS у невеликій популяції СКК призводить до модуляції активності даного сигнального шляху в інших клітинах тіла плодової мушки. За умов нокдауну *inr*, СКК передають сигнал про критичне інгібування IS до інших клітин, таких як ентероцити та ентероендокринні клітини. У відповідь на такого виду сигнали, диференційовані клітини кишківника регулюють харчову поведінку (за допомогою ЦНС та DILP), репродуктивну активність та виживання організму.

### **3.3. Транскрипційний фактор Мус у стовбурових і похідних клітинах впливає на фізіологічні показники *D. melanogaster***

Дослідження проведені Парісі та колегами (2011) показали пряму залежність активності транскрипційного фактору Мус від ГТФази Rheb. Мус дрозозфіли бере участь у контролі клітинного росту під час розвитку [163] та разом з Rheb має проонкогенні властивості [135]. Окрім того, Мус залучений у регуляції проліферації та диференціації СКК незалежно від сигнального шляху

TOR. Rheb, як активатор сигнального шляху TOR, сприяє накопиченню білка Мус, однак інгібування TOR призводить до зворотного ефекту [157]. Нещодавні дослідження встановили взаємозалежність та спільні процеси-мішені для TOR та Мус [119]. Однак молекулярні механізми цих процесів все ще залишаються невідомими.

Як TOR, так і Мус беруть участь у регуляції клітинного росту, біогенезу рибосом, метаболізму, що у свою чергу впливає на тривалість життя [12]. Ми поставили за мету дослідити участь TOR та Мус у стовбурових та похідних клітинах кишківника плодової мушки на тривалість життя. Середня тривалість життя мух контрольної групи  $esc^{ts}>+$  була близько 25 днів за температури 29°C. Надекспресія Rheb у СКК призводила до скорочення тривалості життя на 33% порівняно з контрольними особинами (Рис. 3.12А). Мухи, у яких здійснювали надекспресія  $myc-rheb$  в  $esc$ -клітинах проявляли значно нижчу тривалість життя як порівняно з контрольною групою  $esc^{ts}>+$  (на 44%), так і з  $esc^{ts}>rheb$  (на 16%) (Рис. 3.12А; Табл. 3.3).



**Рис. 3.12.** Тривалість життя особин *D. melanogaster* із надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних (А) клітинах кишківника або ентеробластах (Б).

Відомо, що активація сигнального шляху TOR та транскрипційного фактору Мус може призвести до неконтрольованого росту та проліферації клітин [151]. Тобто, даний процес може спричинити утворення пухлин, які, в свою чергу, скорочують тривалість життя.

**Таблиця 3.3.** Аналіз даних тривалості життя особин *D. melanogaster* із надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах кишківника за допомогою тесту Log rank (Mantel-Cox).

		<i>esc<sup>ts</sup>&gt;+</i>	<i>esc<sup>ts</sup>&gt;rheb</i>	<i>esc<sup>ts</sup>&gt;myc-rheb</i>	<i>suh<sup>ts</sup>&gt;+</i>	<i>suh<sup>ts</sup>&gt;rheb</i>	<i>suh<sup>ts</sup>&gt;myc-rheb</i>
Тривалість життя (дні)	N	101	108	107	185	185	204
	M ± m	26±0,3	17±0,5	14±0,3	34±0,5	29±0,6	28±0,5
	Різниця,%		-33	-43		-15	-18
				-17			-4
	P		<0,0001	<0,0001		<0,0001	<0,0001
			0,003			0,06	
Недоїдання 1%С (дні)	N	60	46	76	46	29	46
	M ± m	6,56±0,22	7,88±0,21	6,20±0,21	6,65±0,19	6,03±0,25	5,82±0,24
	Різниця,%		+19	-3		-11	-13
				-19			-2
	P		<0,0001	0,33		0,03	0,002
			<0,0001			0,63	
Недоїдання 1%Д (дні)	N	58	45	73	61	63	75
	M ± m	9,04±0,55	12,0±0,62	8,12±0,26	7,62±0,62	8,33±0,44	6,09±0,27
	Різниця,%		+32	-16		+11	-18
				-38			-26
	P		<0,0001	0,34		0,19	0,01
			<0,0001			<0,0001	
Недоїдання 0,5%С-0,5%Д (дні)	N	55	59	60	42	43	60
	M ± m	20,4±0,87	19,4±0,72	11,5±0,51	21,5±1,20	18,6±1,01	10,0±0,63
	Різниця,%		-5	-42		-13	-55
				-49			-48
	P		0,06	<0,0001		0,0004	<0,0001
			<0,0001			<0,0001	
Стійкість до голодування (години)	N	56	68	64	59	59	58
	M ± m	83,8±2,22	73,8±2,19	64,0±1,62	117±2,62	106±2,91	98,4±2,64
	Різниця,%		-12	-23		-10	-16
				-13			-7
	P		0,02	<0,0001		0,004	<0,0001
			0,01			0,06	
Стійкість до оксидативного стресу (години)	N	44	46	23	48	47	46
	M ± m	101±3,88	71,9±4,22	77,4±3,72	58,3±4,76	52,3±2,93	53,0±3,87
	Різниця,%		-29	-23		10	7
				-7			3
	P		<0,0001	0,0001		0,62	0,09
			0,92			0,19	

M – середня тривалість життя; N – кількість мух.

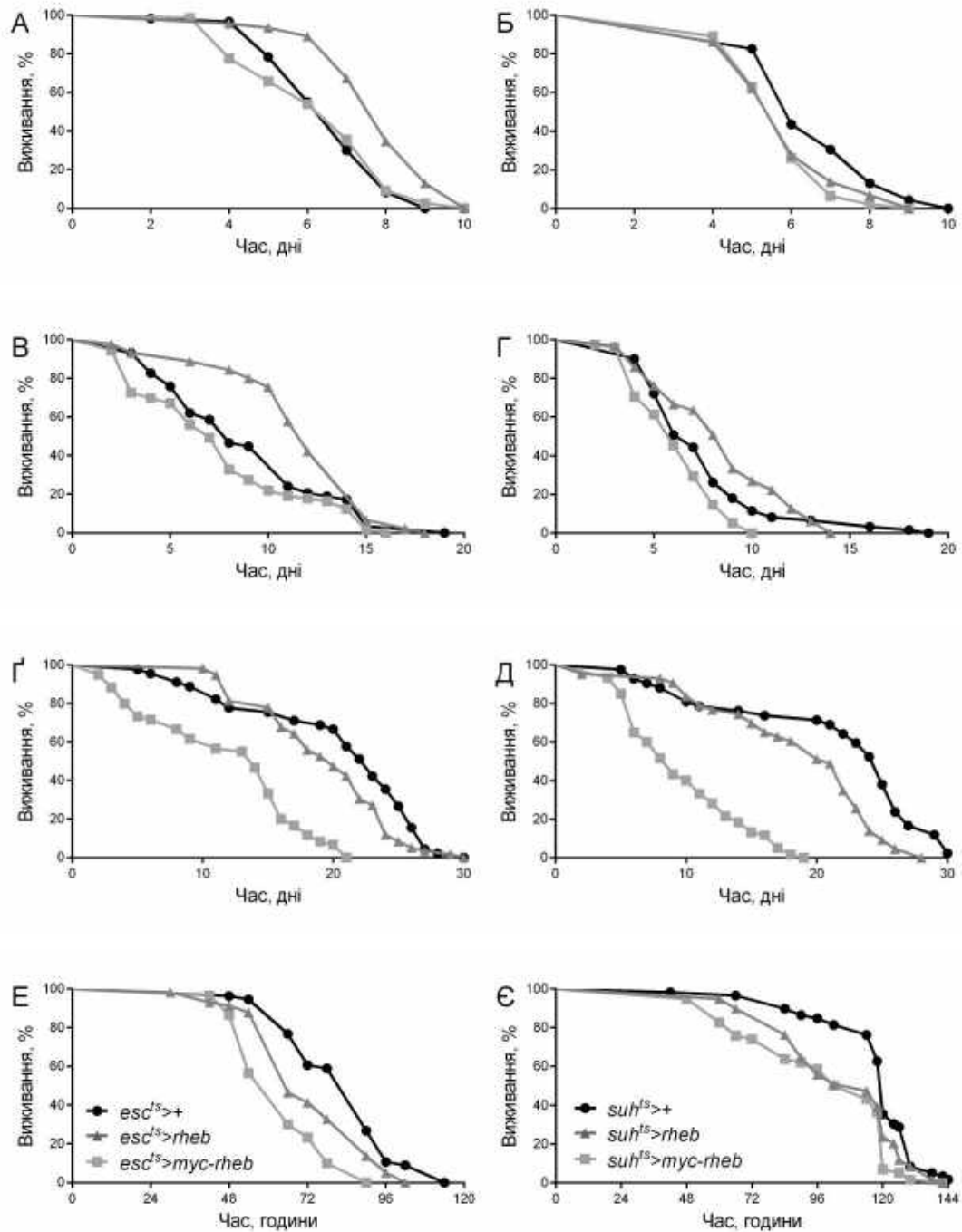
Надекспресія *rheb* та *myc-rheb* тільки в ентеробластах також знижувала середню тривалість життя мух на 15% та 18% відповідно (Рис. 3.12Б). Показано також, що інгібування сигнального шляху TOR в ЕБ дрозофіли

сприяє утворенню більшої кількості ентероендокринних клітин ніж ентероцитів [100]. Відповідно, активація TOR через надекспресію *rheb* може спричиняти зворотний ефект, що у свою чергу є причиною скорочення тривалості життя. Отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що дисбаланс між ЕЦ та ЕЕ через активацію TOR/Мус у СКК та ентеробластах призводить до скорочення тривалості життя плодової мушки. Амчеславський та колеги (2011) продемонстрували, що дисфункція туберозно-склерозних комплексів у СКК призводить до порушення поділу СКК і, як наслідок, до надмірного росту клітин. У зв'язку з тим, що туберозно-склерозні комплекси є інгібіторами сигнального шляху TOR, втрата їх функціональності у СКК призводить до тих же фенотипових ознак, що і надекспресія *rheb*. Дані маніпуляції з СКК потоншують епітелій кишківника [1], що, ймовірно, і є причиною скорочення тривалості життя дрозофіли.

Зважаючи на те, що стійкість до стресів є важливим показником старіння, нами були проведені визначення стійкості до оксидативного стресу, голодування, а також різного виду недоїдання особин з надекспресією *mus-rheb* у СКК та ЕБ.

Доступність поживних речовин є ключовим фактором у визначенні тривалості життя. Розведення поживного середовища часто використовується для обмеження калорійності харчового раціону (CR) дрозофіли. У випадку, коли муха споживає розведене поживне середовище, вона потребує більшого об'єму їжі для того, щоб компенсувати потребу калорій [33]. Недоїдання виникає тоді, коли концентрація поживних речовин у середовищі дуже низька і, зважаючи на фізіологічні особливості, мушка не може споживати великі об'єми їжі необхідні для компенсування потреб організму, і як наслідок, виникає часткове голодування [198]. Дослідження наших колег продемонстрували, що 0,5% та 1% концентрації як сахарози, так і дріжджів знижували тривалість життя *Drosophila* [126], тому ми обрали концентрації поживних речовин в такому діапазоні для створення умов недоїдання. Цікаво, що при споживанні їжі з низьким вмістом вуглеводу (1% сахароза)

підвищувалось виживання мух, у яких проводили надекспресію *rheb* в *esc*-клітинах (Рис. 3.13А). Надекспресія *rheb* у СКК та ЕБ також продовжувала тривалість життя за умов споживання 1% ДА на 32% (Рис. 3.13В; Табл. 3.3).



**Рис. 3.13.** Стійкість мух з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* до нестачі поживних речовин: споживання 1% сахарози (А – СКК та ЕБ; Б – ЕБ), 1% дріжджового автолізу (В – СКК та ЕБ; Г – ЕБ), 0,5% сахарози та 0,5% дріжджового автолізу (Г – СКК та ЕБ; Д – ЕБ), умови повного голодування (Е – СКК та ЕБ; Є – ЕБ).

Отримані результати є свідченням того, що активація сигнального шляху TOR може нівелювати дію нестачі поживних речовин як стресового фактору. Однак, надекспресія *tuc* у даному типі клітин не змінювала стійкості до недоїдання порівняно з контрольними самками. Цікаво, що як надекспресія *rheb*, так і *tuc-rheb* тільки в ентеробластах знижувала тривалість життя мух на 11-13% за умов споживання 1% С (Рис. 3.13Б). Ми спостерігали подібні ефекти на виживання мух при споживанні дієти з низьким вмістом білка (1% ДА) (Рис. 3.13Г). Активація TOR в ентеробластах не впливала на тривалість життя особин, але надекспресія *tuc* на 18% знижувала стійкість до недоїдання при споживанні 1% ДА (Рис. 3.13Б; Табл. 3.3). Показано, що дорослі особини *D. melanogaster*, які споживали їжу з низьким вмістом білка, характеризувались підвищеною кількістю ЕБ, а також нижчим рівнем проліферативної здатності СКК, що свідчить про вплив доступності поживних речовин на гомеостаз кишківника [154]. Подібно, Чої та колеги (2001) у своїх дослідженнях спостерігали значне зниження рівня проліферації ентероцитів у мух, які утримувались на дієті з низьким рівнем білка.

Цікаво, що надекспресія як *rheb*, так і *tuc-rheb* в обох типах клітин значно знижувала тривалість життя мух при споживанні збалансованої низькокалорійної їжі (0,5% С та 0,5% ДА) (Рис. 3.13Г, Д). Нестача поживних речовин як стресовий фактор впливає на клітинний ріст, що, в свою чергу, значно впливає на тривалість життя усіх еукаріотичних організмів. Окрім того, результати наших досліджень продемонстрували, що консервативний сигнальний шлях TOR є важливим медіатором між доступністю поживних речовин та тривалістю життя дрозофіли. Сигнальний шлях TOR опосередковує вплив поживних речовин на рівень транскрипції багатьох генів *Drosophila*, які кодують компоненти залучені в регуляції метаболізму [120]. Можемо припустити, що активація сигнального шляху TOR разом з коекспресією *tuc* призводить до дефектів росту СКК, що, в свою чергу, є причиною потоншення епітелію кишківника. В результаті цього мухи стають чутливішими до

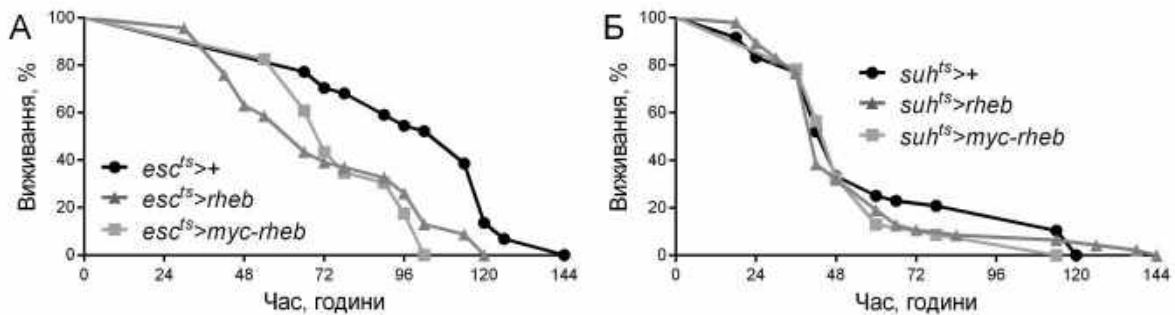
доступності та якості поживних речовин, що призводить до підвищеної їх смертності.

Ми також виявили значне скорочення тривалості життя за умов повного голодування (0,5% агароза) у мух з надекспресією *rheb* та *myc-rheb* в обох типах клітин (Рис. 3.13Е, Є; Табл. 3.3). Відомо, що голодування призводить до обмеження росту ЕЦ, а також продовження взаємодії між СКК та ЕБ [37]. Рівень проліферації та кількість СКК знижується за умов голодування дрозофіли [136]. Отже, дефекти росту СКК, спричинені активацією TOR/Мус, у поєднанні з голодуванням як стресовим чинником призводять до зниження тривалості життя. Тому стовбурові клітини діють як сенсори поживних речовин для встановлення координації між дієтою та збереженням гомеостазу кишківника.

Окрім стресу, який викликаний нестачею або відсутністю поживних речовин, було досліджено вплив прооксиданту на виживання *Drosophila*. Стійкість до голодування та менадіону залежить від білка 4EVP, який також є мішенню сигнального шляху TOR [210]. Тому, активація TOR/Мус у СКК може мати безпосередній вплив на стійкість плодової мушки до стресу. У відповідь на дію стресових факторів зростає проліферація СКК, які необхідні для відновлення та репарації пошкоджених клітин кишківника [1]. Саме такі особини, які піддаються дії стресових чинників, подібні за чутливістю до стресів до мух старшого віку. Показано, що паракват як агент, який викликає оксидативний стрес, збільшує кількість та активність СКК у мух старшого віку [15]. Для дослідження стійкості мух до оксидативного стресу, ми використовували розчин 20 мМ менадіону у 5% сахарозі. Раніше було показано, що менадіон генерує АФК в результаті окисно-відновних реакцій у клітині і таким чином викликає оксидативний стрес. Менадіон, який належить до класу поліциклічних ароматичних кетонів, функціонує як попередник у синтезі вітаміну К. Високі концентрації менадіону провокують оксидативний стрес, який супроводжується пошкодженням мітохондріальної ДНК, пошкодженням тканин та загибеллю клітин [39]. Результати наших досліджень показали, що



при утримуванні мух на 20 мМ менадіоні тривалість життя скорочувалась в особин всіх експериментальних когорт. Окрім того, за дії менадіону спостерігалася нижча середня тривалість життя у мух з надекспресією *rheb* в *esc*-клітинах на 29% (Рис. 3.14А; Табл. 3.3). Надекспресія *myc-rheb* у СКК та ЕБ знижувала резистентність до стресу на 29% (Рис. 3.14Б; Табл. 3.3). Однак, дані маніпуляції тільки в ЕБ не впливали на стійкість до дії менадіону (Рис. 3.14Б).



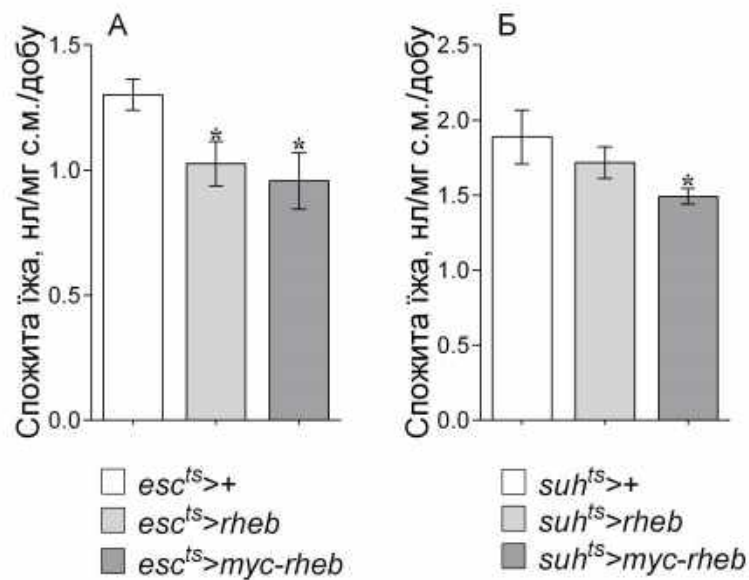
**Рис. 3.14.** Вживання особин з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних (А) клітинах кишківника або ентеробластах (Б) *D. melanogaster*, за дії оксидативного стресу.

Наведені результати демонструють існування координованої взаємодії між сигнальним шляхом TOR та транскрипційним фактором Мус. ГТФ-аза Rheb як безпосередній активатор TOR, також залучена в регуляції активності білка Мус. Відомо, що Мус є мішенню дії кінази S6, яка у свою чергу регулюється TOR [157]. Окрім того, доведено існування спільних процесів-мішеней для шляху TOR та білка Мус. Так, було показано, що як TOR, так і Мус контролюють рівень трансляції та метаболізм [12], що впливає на тривалість життя особин. Аналіз стійкості до стресів та тривалості життя загалом вказує на значну роль TOR/Мус взаємодії у СКК та ЕБ на фізіологічні процеси дрозофіли.

Важливою умовою збереження життєздатності мух є збалансоване споживання поживних речовин, що впливає на ріст, розвиток та вживання. Добре відомо, що сигнальний шлях TOR залучений у регуляції споживання основних нутрієнтів, а також контролює збереження балансу поживних

речовин [212]. Споживання їжі та плодючості взаємозалежні, оскільки підвищене споживання їжі самками дрозофіли супроводжується більшою кількістю відкладених яєць [8].

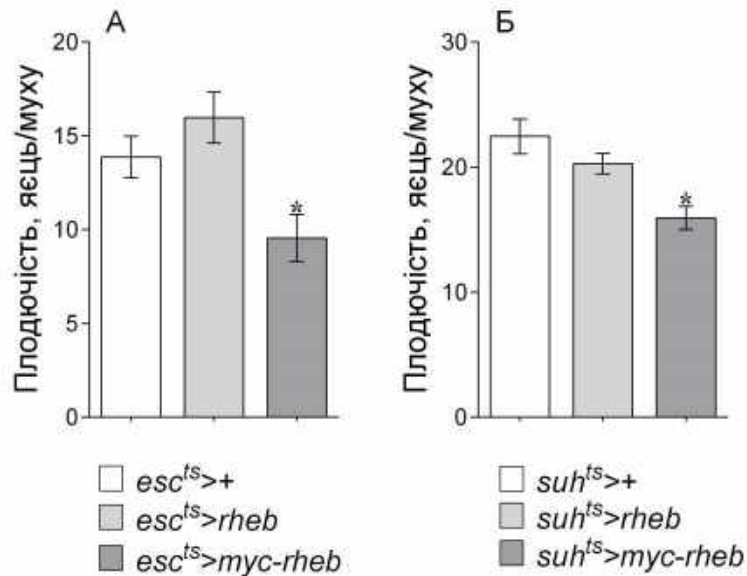
Мухи контрольної групи  $esc^{ts}>+$  споживали в середньому 1,3 мкл стандартного рідкого середовища за добу (Рис. 3.15А). Мухи із надекспресією  $rheb$  у СКК споживали на 17% менше середовища порівняно з контрольними особинами, а також надекспресія  $myc-rheb$  у даному типі клітин знижувала кількість спожитої їжі на 20%. Цікаво, що зниження кількості спожитої їжі корелює зі зниженим рівнем плодючості самок  $esc^{ts}>myc-rheb$  (Рис. 3.16А).



**Рис. 3.15.** Споживання стандартної рідкої їжі самками з надекспресією  $rheb$  або  $myc-rheb$  у стовбурових та похідних клітинах ( $esc$ -клітини) (А) та ентеробластах ( $suh$ -клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=10$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи ( $esc^{ts}>+$ ,  $suh^{ts}>+$ ).

Подібні тенденції спостерігали у випадку активації TOR/Мус тільки в ентеробластах. Надекспресія  $rheb$  в ЕБ не впливала на споживання їжі, однак надекспресія  $myc$  значно знижувала даний показник на 20% (Рис. 3.15Б). Водночас, не було виявлено різниці плодючості між особинами  $suh^{ts}>+$  та  $suh^{ts}>rheb$ , однак спостерігалася на 30% нижча плодючість самок генотипу  $suh^{ts}>myc-rheb$  порівняно з контролем (Рис. 3.16Б). Відомо, що сигнальний

шлях TOR контролює харчову поведінку еукаріотів [45], проте молекулярний механізм даної регуляції все ще до кінця незрозумілий. Кількість споживання їжі плодовою мушкою контролюється сигнальними шляхами з залученням молекул “sex peptide”, які, в свою чергу, залучені в регуляцію плодючості [8].



**Рис. 3.16.** Плодючість самок з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього, n=20. \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Представлені результати свідчать про те, що активація TOR/Мус як у СКК, так і ЕБ знижує кількість спожитої їжі кожною окремою мушкою. Одночасно, дана група самок характеризувалась нижчою плодючістю. Отримані дані підтверджують значну роль Мус у СКК та ЕБ у встановленні взаємозв'язку між харчуванням та плодючістю *Drosophila*.

### Висновки до розділу 3

1. Як інгібування, так і активація сигнального шляху TOR, IS та активація Мус у СКК та ЕБ скорочують тривалість життя та підвищують чутливість до дії менадіону та голодування.
2. Активація сигнального шляху TOR у СКК та ЕБ у поєднанні зі споживанням їжі з низьким вмістом дріжджів або сахарози продовжує

тривалість життя мух за даних умов. Окрім того, обмеження вмісту поживних речовин у харчовому раціоні продовжує тривалість життя мух з нокдауном *inr* у СКК та ЕБ.

3. Пригнічення інсулінового шляху призводило до зниження плодючості, тоді як його активація – до її збільшення. Подібним чином інсуліновий шлях впливав і на апетит особин: при активації – збільшував, при інгібуванні – пригнічував. Навпаки діяв TOR шлях: його активація не впливала на плодючість, але знижувала апетит, в той самий час, як інгібування не впливало на апетит, але призводило до підвищення плодючості.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

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).

## РОЗДІЛ 4

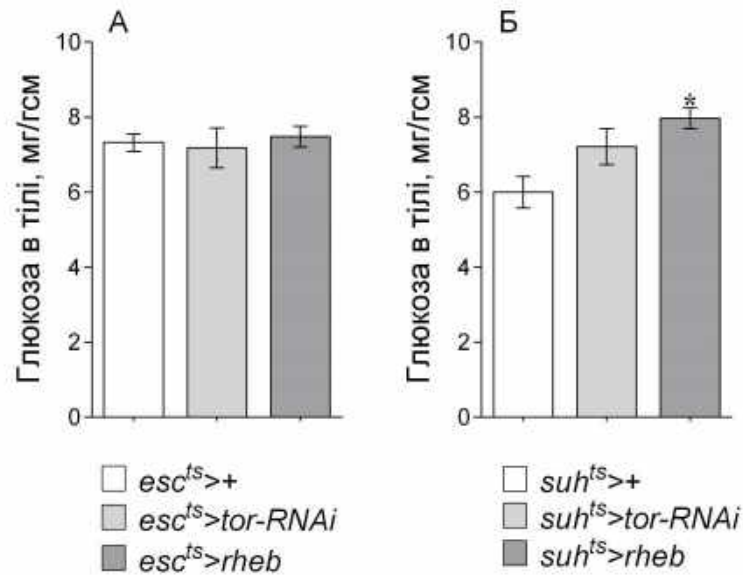
### РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ *DROSOPHILA* ШЛЯХОМ ЗМІНИ АКТИВНОСТІ TOR/IS ТА МУС У СТОВБУРОВИХ КЛІТИНАХ КИШКІВНИКА

#### 4.1. Вплив сигнального шляху TOR у стовбурових і похідних клітинах на метаболізм *D. melanogaster*

У плодової мушки *D. melanogaster* існують регуляторні механізми, які беруть участь у контролі вмісту вуглеводів та ліпідів у жировому тілі комахи, подібно до печінки людини [156]. Сигнальний шлях TOR у відповідь на дію зовнішніх факторів регулює метаболічні процеси [98; 112]. Відомо, що mTORC1 підвищує синтез АТФ та метаболізм клітини, зокрема він впливає на інтенсивність гліколізу через активацію транскрипції та синтезу HIF-1 $\alpha$  [26], який підвищує рівень експресії багатьох гліколітичних генів [112]. mTORC2 контролює кілька членів родини кіназ AGC таких як Akt, SGK1 та протеїнкіназу С- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ), які беруть участь у регуляції метаболічних процесів [112]. У розділі 4.1 представлені результати щодо вмісту метаболітів у тілі та гемолімфі експериментальних особин *D. melanogaster*.

При активації сигнального шляху TOR у *esc*-клітинах спостерігалась на 25% вища концентрація глюкози в гемолімфі (Рис. 4.2А), однак модуляція активності сигнального шляху TOR не впливала на вміст глюкози в тілі (Рис. 4.1А). Подібно, вищий вміст глюкози в тілі на 33% спостерігали у самок *suh<sup>ts</sup>>rheb* (Рис. 4.1Б), а самки генотипу *suh<sup>ts</sup>>tor-RNAi* характеризувались на 30% нижчою концентрацією глюкози в гемолімфі (Рис. 4.2Б). Це підтверджує попередні припущення про те, що зниження активності TOR супроводжується зниженням рівня глюкози в тілі [222]. Цікаво, що зниження активності сигнального шляху TOR перешкоджає інсуліновій резистентності та виникненню метаболічного синдрому і супроводжується підвищенням активності транскрипційного фактору dFOXO [78]. Таким чином, регуляція

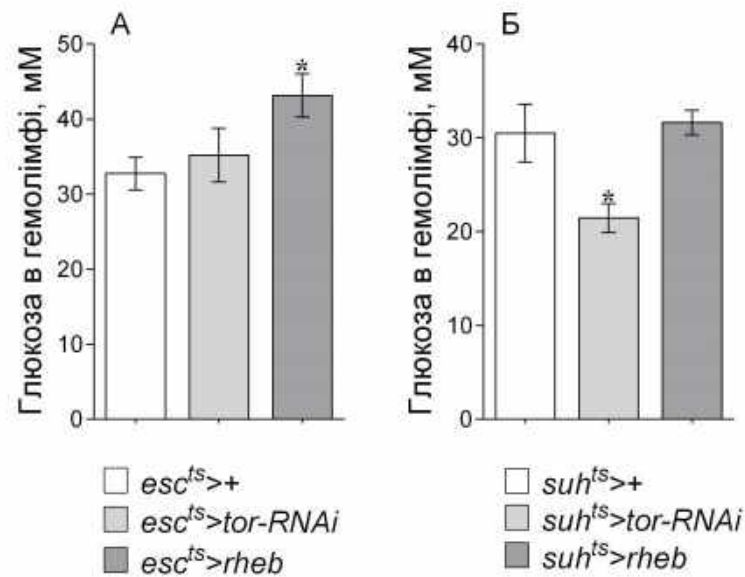
активності TOR може бути ключовим моментом у контролі перебігу метаболічних процесів.



**Рис. 4.1.** Вміст глюкози в тілі мух з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього, n=4. \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Регуляція рівня глюкози, а також запасання вуглеводів в організмі *Drosophila* реалізується через секрецію інсуліноподібних пептидів (DILP – *Drosophila insulin-like peptide*) [190]. Окрім DILP, відомий механізм регуляції запасання вуглеводів за участю сигнального шляху TOR. Контроль експресії генів, які беруть участь у контролі біосинтезу глікогену реалізується за участю транскрипційних факторів DHR38 та Mef2 [41; 184]. Mef2 активує синтез глікогену шляхом підвищення експресії генів, які залучені у запасанні вуглеводів [41]. Цікаво, що Mef2 активується шляхом фосфорилування кіназою S6K, яка є компонентом сигнального шляху TOR [41; 134]. Результати наших експериментів добре узгоджуються з цими дослідженнями, оскільки ми спостерігали, що інгібування сигнального шляху TOR через експресію *tor-RNAi* в *esc*-клітинах призводило до нижчого вмісту глікогену в тілі експериментальних самок на 25% (Рис. 4.3А). Однак експресія даного

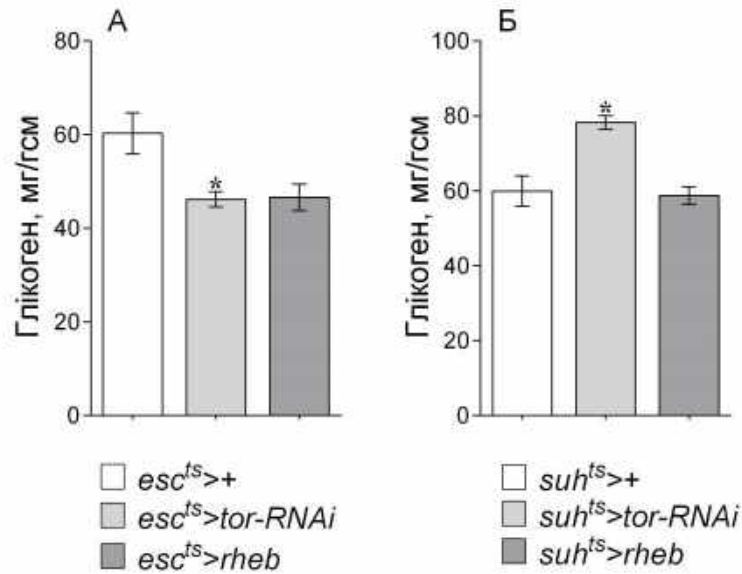
конструкту у *suh*-клітинах підвищувала рівень глікогену на 25% (Рис. 4.3Б). Подібна тенденція спостерігається і при визначенні вмісту резервних ліпідів у тілі *Drosophila*.



**Рис. 4.2.** Концентрація глюкози в гемолімфі мух з нокадауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

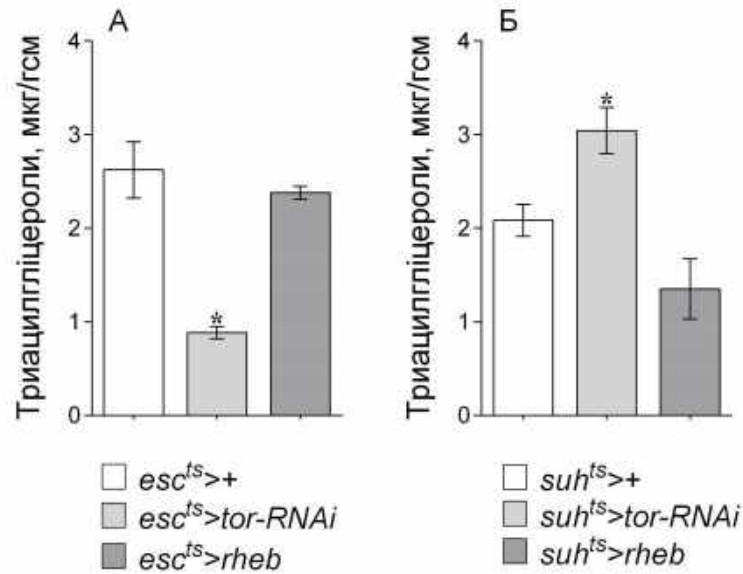
Сигнальний шлях TOR також регулює активність білка SREBP (sterol regulatory element binding protein) дрозофіли, який бере участь у контролі росту клітин [164]. Одночасно TOR залучений у регуляцію метаболізму триацилгліцеролів (ТАГ), оскільки інгібування TOR призводить до зниження рівня запасних ліпідів у тілі мушки [222]. Отримані результати продемонстрували, що при інгібуванні сигнального шляху TOR через експресію інтерференційних РНК до гена *tor* в *esc*-клітинах спостерігається зниження вмісту ТАГ в тілі на 35% (Рис. 4.4А). Експресія *tor-RNAi* тільки в ЕБ (*suh*-клітини) призводила до підвищення вмісту ТАГ (Рис. 4.4Б). Раніше було показано, що у мутантів за компонентами TOR шляху спостерігається вищий рівень ТАГ [228] і рапаміцин сприяє підвищенню запасів жирів, а також стійкості до голодування.





**Рис. 4.3.** Вміст глікогену в тілі мух з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Це, в основному, залежить від транскрипційного фактору 4EВР. Особини, у яких надекспресується 4EВР, накопичували більше жирів [207]. Зниженню активності TOR сприяє переміщення нефосфорильованого білка FOXO у ядро, що призводить до підвищення активності 4EВР, який бере участь у запасанні резервних жирів та вуглеводів [207]. Ці два протилежні за висновками дослідження суперечать одне одному в тому, як сигнальний шлях TOR регулює метаболізм жирів. Ймовірно, повне розуміння цих процесів виникне шляхом вимірювання інтенсивностей процесів синтезу та розпаду ліпідів, на противагу вимірюванню рівня ліпідів у тілі. Отже, наші дослідження – це ще один доказ того, що сигнальний шлях TOR впливає на метаболізм жирів, однак молекулярні механізми цих процесів, а також їх вплив на тривалість життя плодової мушки все ще залишаються не до кінця зрозумілими.



**Рис. 4.4.** Вміст триацилгліцеролів в тілі мух з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Різниця у показниках при маніпуляціях у різних досліджуваних клітинах ймовірно, спричинена різною активністю сигнального шляху TOR у СКК та ЕБ. Так, показана значно нижча активність сигнального шляху TOR у СКК порівняно з ЕБ. Сигнальний шлях Notch інгібує TSC2 (інгібітор TOR) в ЕБ, таким чином активуючи TOR [100]. Однак детальні механізми участі TOR у забезпеченні метаболічного гомеостазу все ще залишаються невідомими.

Окрім того, що сигнальний шлях TOR є основним регулятором метаболічних процесів, в нашій роботі ми також встановили, що активність СКК також впливає на інтенсивність метаболізму. Оскільки, кишківник плодової мушки бере участь у процесах травлення та всмоктування поживних речовин, він також функціонує як сенсор енергетичного стану [143] та, таким чином, може регулювати вміст основних метаболітів у тілі. Тому, окрім активності TOR, ще одним потенційним механізмом регуляції вмісту метаболітів може бути порушення гомеостазу кишківника.

Кишківник часто розглядають як важливий регуляторний орган. Відомо, що кишківник плодової мушки у відповідь на надходження поживних речовин створює ендокринні сигнали до центральної нервової системи (ЦНС) для збереження енергетичного гомеостазу та регуляції харчової поведінки [143]. Дана сигнальна функція реалізується за участю регуляції секреції інсуліноподібних пептидів клітинами мозку – DILP2, 3, 5 [96]. Саме DILP з адипокінетичним гормоном (АКГ), створюють подібну людській системі інсулін-глюкагон, яка регулює гомеостаз глюкози та старіння організму [106]. DILP та АКГ регулюють експресію цілої низки генів, які залучені в регуляції метаболізму вуглеводів і ліпідів, частково за участю транскрипційного фактору FOXO. Окрім передачі сигналу від кишківника до ЦНС, існує передача сигналу від кишківника до жирового тіла *Drosophila*, яка реалізується через DILP6 [96].

У ссавців споживання поживних речовин призводить до вивільнення інсуліну у циркуляторне русло та активації інсулінового рецептору клітин [168]. Подальша активація компонентів інсулінового та TOR сигнальних шляхів сприяє утилізації поживних речовин та запускає процеси синтезу білків та ліпідів [98]. Відомо, що інсулін регулює рівень глюкози в крові. У ссавців, панкреатичні  $\beta$ -клітини вивільняють інсулін у відповідь на високий рівень глюкози, в результаті чого вона поглинається периферичними клітинами, знижуючи при цьому концентрацію глюкози. За умов низького рівня глюкози в крові панкреатичні  $\alpha$ -клітини ссавців вивільняють глюкагон, який запускає процеси глюконеогенезу та глікогенолізу [104]. У плодової мушки механізми регуляції рівня глюкози є консервативними, що робить її зручним модельним організмом для досліджень метаболічних процесів. Відомо, що інсуліноподібні пептиди DILPs регулюють метаболізм вуглеводів плодової мушки та за умов доступності поживних речовин гени *dilp2*, *dilp3*, *dilp5* експресуються нейросекреторними клітинами мозку [24; 84]. У відповідь на обмеження вмісту вуглеводів у харчовому раціоні експресія *dilp3* і *dilp5* знижується, що свідчить про специфічність інсулін-продукуючих клітин (ІПК) [84]. В роботі ми визначали відносний рівень мРНК генів, які кодують компоненти залучені у

регуляції метаболізму (Табл. 4.1). Зміни рівня транскриптів даних генів не обов'язково вказують про рівень секреції відповідних білків, а свідчать про реакцію організму, які проявляються змінами фізіологічного стану.

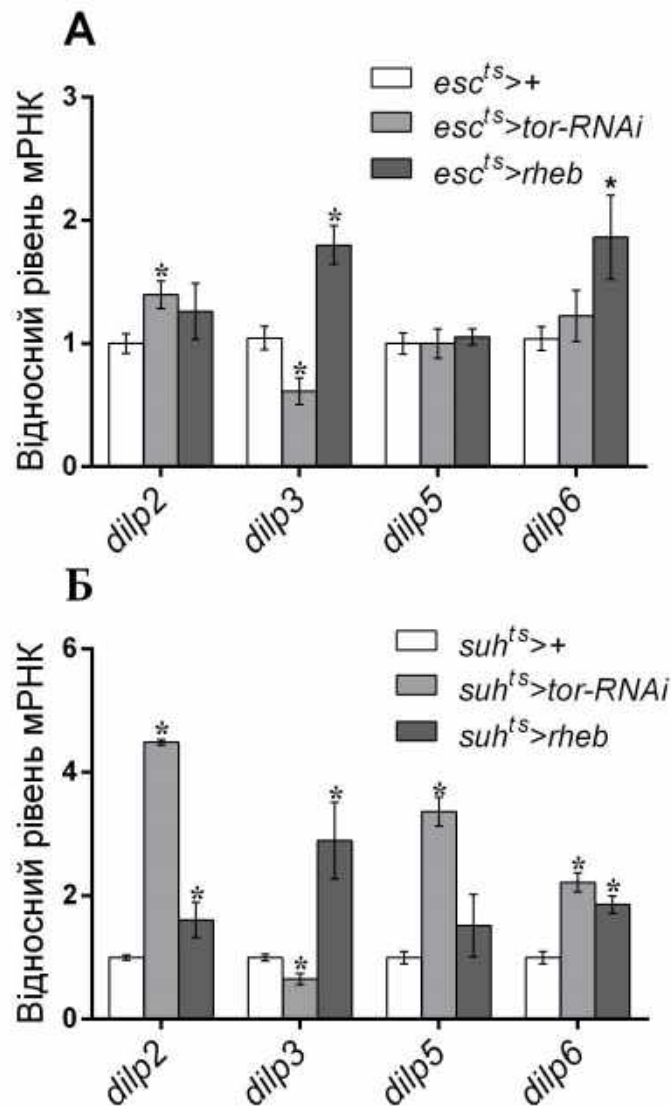
**Таблиця 4.1.** Функції досліджуваних генів.

Гени	Локалізація експресії	Білки, які вони кодують	Функції
<i>dilp2</i> , <i>dilp3</i> , <i>dilp5</i>	інсулін-продукуючі клітини мозку	Інсулін-подібні пептиди ( <i>Drosophila</i> insulin-like peptides) DILP2, DILP3, DILP5	Регуляція харчової поведінки, плодючості, контроль рівня глюкози (зниження вмісту).
<i>dilp6</i>	клітини жирового тіла	DILP6	Запасання глікогену та ліпідів, стійкість до стресів.
<i>akh</i>	corpora cardiaca кільцевої залози	Адипокінетичний гормон	Регуляція метаболізму вуглеводів та ліпідів, контроль рівня глюкози (підвищення вмісту).
<i>tobi</i>	клітини жирового тіла	$\alpha$ -глюкозидаза	Гідроліз глікогену
<i>perck</i>	клітини всього тіла	Фосфоенолпіруват карбоксикіназа	Підвищення запасання ТАГ через контроль гліцерогенезу, підвищення вмісту глюкози – глюконеогенез.
<i>bmm</i>	клітини жирового тіла	Ліпаза Brummer	Розщеплення ТАГ, регуляція запасання ліпідів
<i>4ebp</i>	клітини всього тіла	4E-BP (4E binding protein) – білок-інгібітор початку трансляції	Інгібування синтезу білка, участь у метаболізмі вуглеводів та ліпідів

Наші дослідження демонструють залежність експресії *dilps* від активності сигнального шляху TOR у стовбурових та похідних клітинах (Рис. 4.5). Тому можна припустити, що TOR регулює метаболізм клітини за участю генів системи *dilp-akh*. Справді, раніше був встановлений взаємозв'язок між сигнальними шляхом TOR та рівнем DILP [25; 72].

Слід зауважити, що тенденція до підвищення чи зниження рівня відносної експресії за умов інгібування чи активації сигнального шляху подібна між двома типами клітин. Зокрема, вищий рівень транскриптів *dilp2*

спостерігається при інгібуванні TOR шляхом експресії *tor-RNAi* як в *esc*- (Рис. 4.5А), так і у *suh*-клітинах (Рис. 4.5Б).



**Рис. 4.5.** Рівень мРНК *dilp2*, *dilp3*, *dilp5*, *dilp6* у мух з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи ( $esc^{ts}>+$ ,  $suh^{ts}>+$ ).

Активація сигнального шляху TOR тільки в ентеробластах призводила до вищого рівня транскриптів *dilp2*. Раніше було показано, що підвищення експресії *dilp2* у дорослих особин *Drosophila* призводить до продовження тривалості життя [6]. Потенційним механізмом продовження тривалості життя

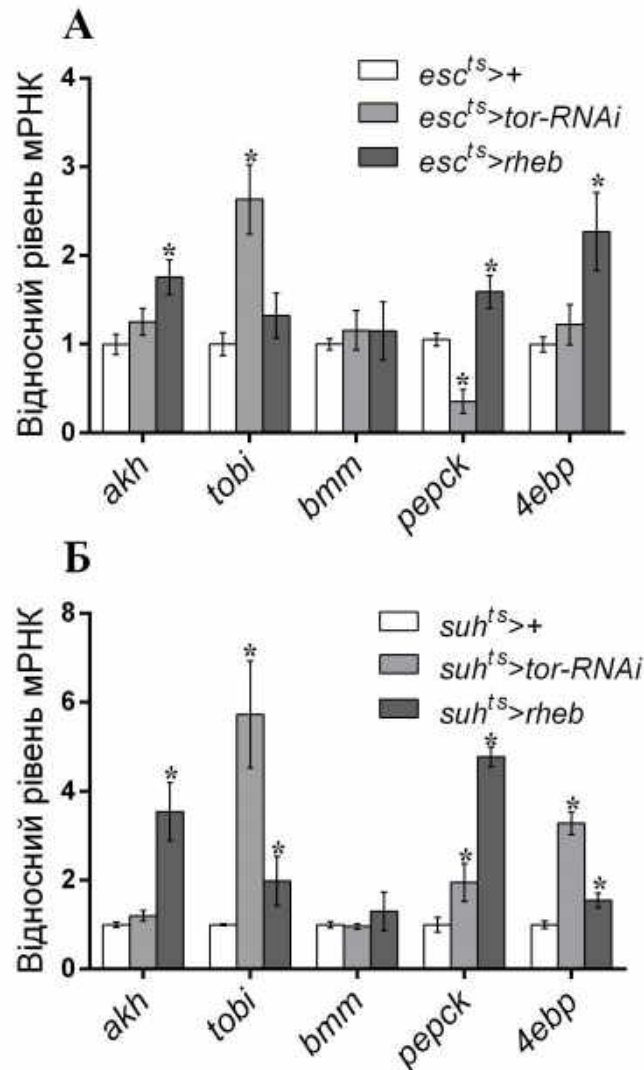
через надекспресію *dilp2* є контроль фосфорилування глікогенфосфорилази GSK (неактивна у фосфорильованому стані), [165], а також регуляція рівня глікогену.

Зниження мРНК *dilp3* при інгібуванні сигнального шляху TOR в обох типах клітин, та її підвищення при активації (Рис. 4.5) ще раз свідчить про взаємозв'язок між TOR та IS. Показано, що DILP3 залучений в активації сигнального шляху TOR за участю вуглеводів [104]. Окрім того, DILP3 пригнічує процес автофагії [104], що може бути причиною скорочення тривалості життя. Ще однією важливою функцією DILP3 є регуляція метаболізму ліпідів [96].

Відносний рівень транскриптів *dilp5* не залежав від модуляції TOR в СКК та ЕБ (Рис. 4.5А), однак була в 3,5 рази вищою в особин, з експресією *tor-RNAi* в ентоблестах (Рис. 4.5Б). Також активація TOR в обох типах клітин призводила до підвищення мРНК *dilp6* (Рис. 4.5). Такі подібні тенденції підтверджують генетичну аналогію між СКК та ЕБ. Отже, аналізуючи відносну експресію пептидів, можна пояснити отримані результати по рівні глюкози в тілі та гемолімфі плодової мушки. ІПК функціонують подібно до  $\beta$ -клітин ссавців, які вивільняють пептиди у гемолімфу, де регулюють рівень циркулюючих вуглеводів [185]. Окрім того, показано, що видалення ІПК призводить до підвищення рівня глюкози та трегалози, а також ліпідів [25; 185].

Подібно до глюкагону ссавців, який продукується  $\alpha$ -клітинами панкреатичної залози, адипокінетичний гормон (АКГ) комах є антагоністом інсуліну та активує глікогенфосфорилазу [7]. АКГ експресується клітинами кардіальних тіл (*corpora cardiaca*), які є основним ендокринним органом комах [115]. Глікогенфосфорилаза знижує рівень запасного полісахариду глікогену в жировому тілі комах, підвищуючи, таким чином, концентрацію циркуляційних вуглеводів [115; 185]. Аналіз рівня мРНК *akh* дозволяє пояснити отримані результати щодо рівня глюкози та вмісту глікогену у мух. Як видно з Рис. 4.6, активація сигнального шляху TOR через надекспресію *rheb* як в *esc-* (у 1,8

рази), так і у *suh*-клітинах (у 3,6 рази), призводить до вищого показника відносної експресії гена *akh*.



**Рис. 4.6.** Рівень мРНК генів *akh*, *tobi*, *bmm*, *perck*, *4ebp* у мух з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) та надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Така подібність ефектів ще раз доводить генетичну спорідненість даних клітин. Оскільки АКГ підвищує вивільнення глюкози, то це узгоджується з результатами попередніх досліджень, які мали вищий рівень глюкози в тілі (при активації сигнального шляху у *suh*-клітинах), та гемолімфі (в *esc*-клітинах). При

цьому не спостерігається відмінностей у вмісті глікогену між особинами з надекспресією *rheb* та контрольними.

Ген *tobi* (target of brain insulin) кодує  $\alpha$ -глюкозидазу, яка є еволюційно консервативною у багатоклітинних еукаріотів [30]. Показано, що мухи, у яких низький рівень експресії *tobi*, є більш життєздатні ніж стандартні лабораторні лінії [30]. Надекспресія даного гена призводить до дефектів процесу росту та зниження вмісту глікогену в тілі плодової мушки [30]. Цікаво, що експресія гена *tobi* залежить від вмісту поживних речовин у харчовому раціоні. Так, експресія підвищується при споживанні білка, та знижується при споживанні вуглеводів [30]. Це свідчить про вплив інсулінового та TOR сигнальних шляхів на експресію гена *tobi*. Окрім того, транскрипційна регуляція  $\alpha$ -глюкозидази реалізується через контроль активності DILP та АКГ [30], які також залежать від вмісту вуглеводів та білка в харчовому раціоні. Варто зазначити, що надекспресія *tobi* має летальний ефект, але й зниження активності не призводить до продовження тривалості життя [30]. На рис. 4.6 показаний відносний рівень мРНК *tobi* в експериментальних особин *D. melanogaster*. Нокдаун гена *tor* в *esc*-клітинах призводив до значного підвищення транскриптів *tobi* (у 2,3 рази). Також вищий рівень транскриптів спостерігався як при інгібуванні (майже у 6 разів), так і при активації (у два рази) сигнального шляху TOR у *suh*-клітинах (Рис. 4.6Б). Тому, ймовірно, регуляція вмісту глюкози та глікогену в тілі мух, а також їх виживання при модуляції активності сигнального шляху TOR відбувається за участю взаємодії генів *dilp-akh-tobi*.

Окрім глюконеогенезу, АКГ бере участь у регуляції метаболізму ліпідів, незалежно від ліпази триацилгліцеридів (ТАГ) *Brummer (Bmm)* [71]. Ген *bmm* кодує триацилгліцеридліпазу, яка бере участь у мобілізації ТАГ з депо жирового тіла мушки та є консервативною до людини [70]. Підвищення рівня транскриптів *bmm* супроводжується нижчим вмістом запасних ліпідів у тілі *D. melanogaster* [70]. Результати наших досліджень не виявили впливу активності сигнального шляху TOR у СКК та ЕБ на відносну експресію *bmm* (Рис. 4.6), однак, ми раніше описували нижчий вміст ТАГ при інгібуванні TOR у СКК та



ЕБ (Рис. 4.4), що може пояснюватися двома потенційними механізмами. Перший, регуляція вмісту резервних ТАГ здійснюється іншими генами (*dilp3*, *akh*, *perck*). Другий, мухи генотипу *esc<sup>ts</sup>>tor-RNAi*, які характеризуються зниженим вмістом ТАГ, використовують резервні ліпіди як джерело енергії, необхідне у додатковій кількості для процесів проліферації стовбурових клітин. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що сигнальний шлях TOR у стовбурових та похідних клітинах є важливим регулятором гомеостазу ліпідів у плодової мушки.

Як у ссавців, так і у дрозифіли фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (PEPCK) залучена у регуляції процесів глюконеогенезу та гліцерогенезу [155]. Показано, що ген, який кодує цитозольну форму PEPCK, у відповідь на дію гормонів та склад їжі змінює інтенсивність синтезу даного ферменту [76]. Глюкокортикоїди, цАМФ та тиреотропні гормони є основними факторами, які підвищують експресію *perck* [76]. PEPCK каталізує першу обхідну реакцію глюконеогенезу, яка є лімітувальним етапом даного процесу. Було показано, що PEPCK також бере участь у гліцеронеогенезі, таким чином підтримуючи гомеостаз ліпідів [225]. Рівень транскрипції *perck* підвищується дією глюкагону, та знижується під дією інсуліну [152]. Наші експериментальні дані вказують на залежність рівня мРНК *perck* від активності сигнального шляху TOR у стовбурових та похідних клітинах (Рис. 4.6). Інгібування TOR в *esc*-клітинах вдвічі знижувало рівень *perck* транскриптів, а його активація значно підвищувала його (Рис. 4.6А). Подібний ефект спостерігався і при активації сигнального шляху у *suh*-клітинах, при якій спостерігалось п'ятикратне підвищення відносного рівня мРНК *perck* (Рис. 4.6Б). Ймовірно, саме експресія *perck* є причиною зниження вмісту глюкози та ТАГ при інгібуванні TOR, та їх підвищення – при активації.

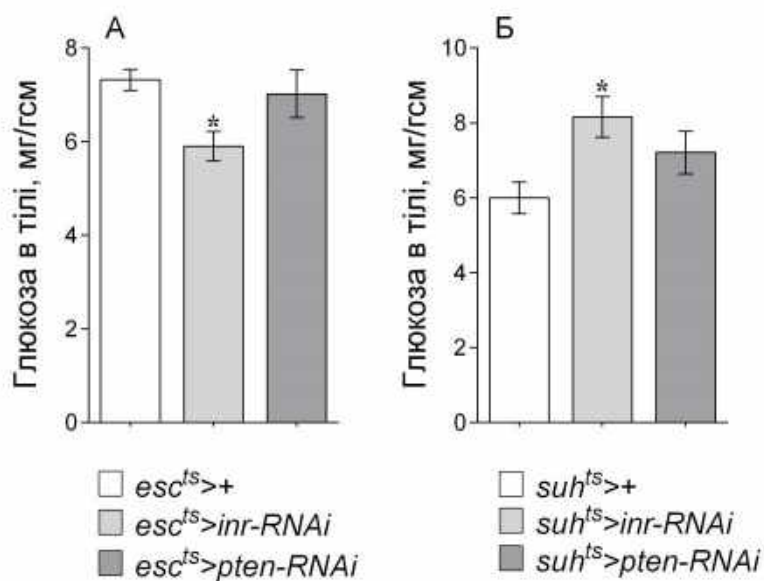
Як бачимо з Рис. 4.6, активація сигнального шляху TOR в *esc*-клітинах підвищує відносний рівень транскриптів *4ebp* у 2,2 рази, однак його інгібування не впливало на даний показник. Подібний ефект спостерігається і при активації TOR у *suh*-клітинах (на 30%), хоча експресія *tor-RNAi* також призводила до

підвищення відносного рівня транскриптів *4ebp* приблизно в 3,3 рази. Оскільки відомо, що 4E-VP бере участь у регуляції стійкості до голодування та оксидативного стресу *D. melanogaster* [210], ймовірно, зниження виживання мух пов'язане з підвищенням відносного рівня мРНК *4ebp*. А також підвищення відносного рівня транскриптів *4ebp* може свідчити також про розвиток певного стресового стану при інгібуванні/активації сигнального шляху TOR у СКК та ЕБ.

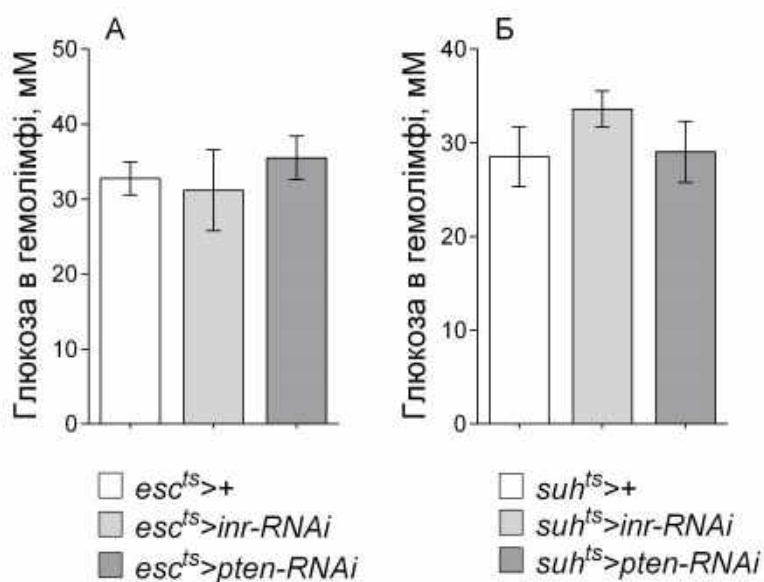
#### 4.2. Вплив інсулінового сигнального шляху у стовбурових і похідних клітинах на метаболізм *D. melanogaster*

Відомо, що IS залучений у підтриманні гомеостазу метаболічних процесів. IS, який наявний у всіх багатоклітинних організмів, відіграє ключову роль у регуляції метаболізму вуглеводів [134]. Broughton та колеги (2005) продемонстрували, що видалення нейросекреторних клітин мозку *Drosophila*, які синтезують DILP, призводить до підвищення концентрації глюкози у гемолімфі та запасних вуглеводів, що є характерною особливістю діабету.

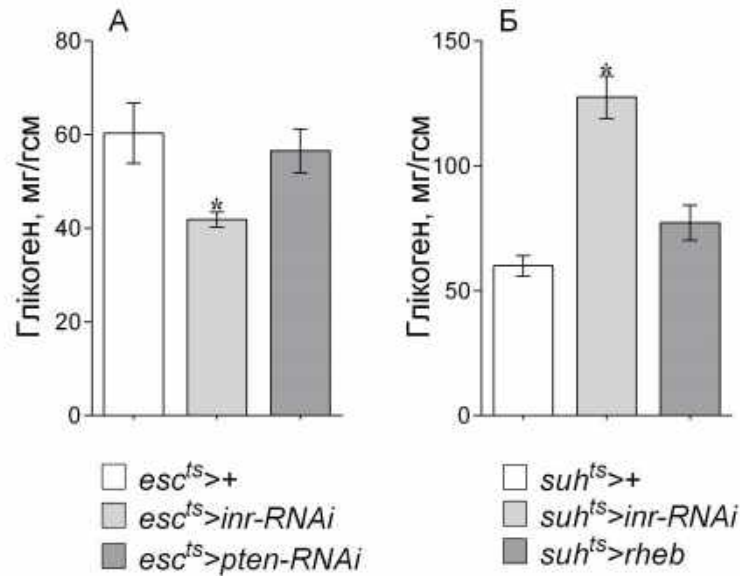
Для встановлення ролі IS у СКК та ЕБ у регуляції метаболізму вуглеводів, ми проаналізували вміст основних метаболітів, які є індикаторами інтенсивності перебігу метаболічних процесів. Вміст глюкози в тілі самок *esc<sup>ts</sup>>inr-RNAi* був нижчим на 19% порівняно з контрольними особинами (Рис. 4.7А). Також при інгібуванні IS в *esc*-клітинах спостерігався нижчий вміст глікогену на 40% (Рис. 4.9А). Активація IS шляхом експресії *pten-RNAi* в *esc*-клітинах не впливала на вміст глюкози та глікогену у тілі мух. Протилежна тенденція спостерігалась при модуляції IS тільки в ЕБ плодової мушки. Так, експресія *inr-RNAi* в ЕБ призводила до підвищення вмісту глюкози в тілі на 36% (Рис. 4.7Б) та глікогену у 2,1 рази порівняно з мухами контрольного генотипу *suh<sup>ts</sup>>+* (Рис. 4.9Б). Цікаво, що як і у випадку експресії в *esc*-клітинах, експресія *pten-RNAi* у *suh*-клітинах не впливала на вміст глюкози (Рис. 4.7) та глікогену (Рис. 4.9) у тілі самок. Навіть більше, результати наших досліджень показали, що модуляція IS в обох типах клітин не змінювала концентрацію глюкози у гемолімфі (Рис. 4.8) та вміст запасних ТАГ (Рис. 4.10).



**Рис. 4.7.** Вміст глюкози в тілі мух з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

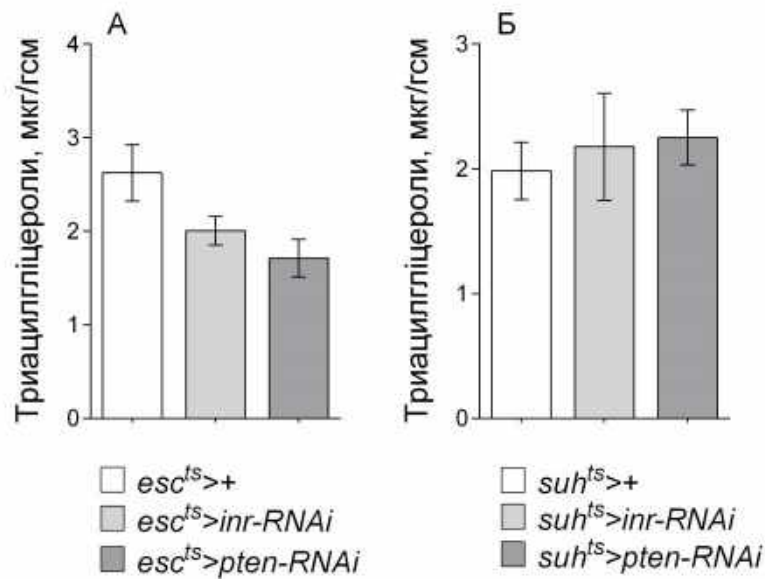


**Рис. 4.8.** Концентрація глюкози в гемолімфі мух з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).



**Рис. 4.9.** Вміст глікогену в тілі мух з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього, n=4. \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Відомо, що IS контролює вміст вуглеводів у тілі комах за участю інсуліноподібних пептидів (DILP) [148]. Зниження відносного рівня транскриптів *dilp2*, *3*, *5* на личинковій стадії призводить до підвищення вмісту глюкози в гемолімфі, глікогену та ліпідів [25; 72; 82]. Таким чином ми припускаємо, що кишківник дрозоділи у відповідь на зміну активності IS у СКК та ЕБ, сигналізує до ЦНС. При цьому, змінюється інтенсивність синтезу DILP 2, 3, 5 в ПК, що, в свою чергу, модулює перебіг всього метаболізму *Drosophila*. DILP також залучені у підтримання балансу між рівнем циркулятивних вуглеводів та рівнем глікогену [190]. Саме DILP2 та DILP7 залучені в регуляції рівня запасного глікогену в тілі плодової мушки [190].

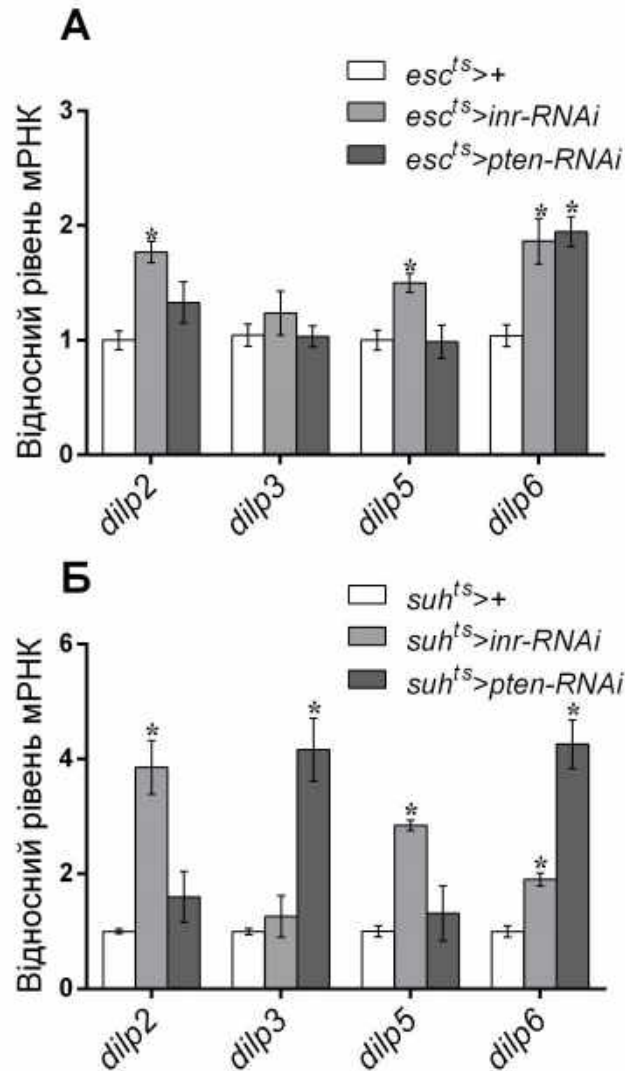


**Рис. 4.10.** Вміст триацилгліцеролів в тілі мух з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього, n=4. \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Варто зазначити, що подібне збільшення кількості глікогену спостерігається і при інгібуванні/активації сигнального шляху TOR (Рис. 4.4). Так, ми спостерігали нижчий вміст вуглеводу при інгібуванні TOR *esc*-клітинах, та значно вищий – при інгібуванні сигнального шляху у *suh*-клітинах. Це свідчить про аналогічні механізми регуляції запасання глікогену при модуляції TOR та IS. Ймовірно, таким механізмом може бути спільна регуляція активності кінази глікогенсинтази GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase  $\beta$ ), яка, як відомо, регулюється кіназою Akt [49].

Висновок про те, що інтенсивність синтезу DILP може змінюватись у відповідь на модуляцію активності IS шляхом зворотного зв'язку, узгоджується з кількостями мРНК генів, які відповідають за регуляцію метаболізму. Так, рівень транскриптів генів *dilp2*, *dilp5* та *dilp6* був вищим у 1,5-2,0 рази при експресії *inr-RNAi* в *esc*-клітинах (Рис. 4.11А). Подібний ефект спостерігався і при інгібуванні IS тільки в ентеробластах. Так, при надекспресії *inr-RNAi* у *suh*-клітинах відносна експресія *dilp2*, *dilp5* та *dilp6* була вищою у 4, 3, 2 рази

відповідно (Рис. 4.11Б). Цікаво, що активація IS в *esc*-клітинах не впливала на рівень мРНК генів *dilp2*, *dilp3*, *dilp5*, однак підвищував рівень транскриптів *dilp6* у 2 рази у порівнянні з контролем. Також активація IS у *suh*-клітинах підвищувала тільки рівень транскриптів *dilp3* та *dilp6* у 4 рази порівняно з контролем.



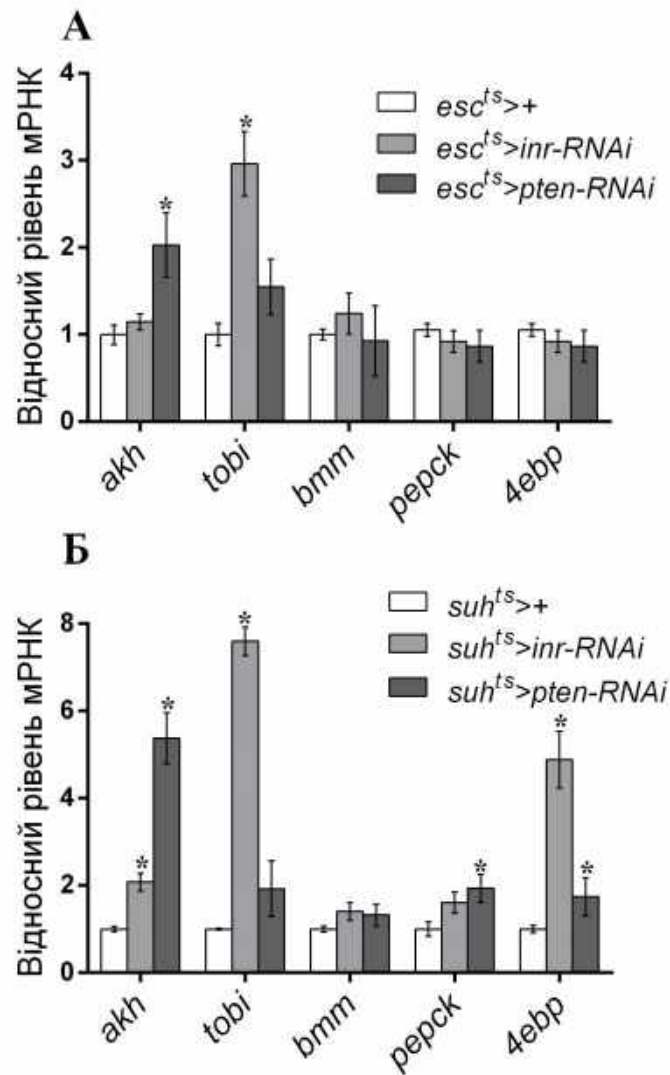
**Рис. 4.11.** Рівень мРНК генів *dilp2*, *dilp3*, *dilp5* і *dilp6* у мух з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Результати наших досліджень доповнює гіпотезу про те, що кишківник є важливим сигнальним органом, який регулює поведінку, метаболізм та тривалість життя. У нашому випадку інгібування/активація IS, впливає на функціонування СКК та на активність таких процесів у кишківнику як травлення і всмоктування поживних речовин. Стан гомеостазу кишківника впливає на ЦНС, а саме на інтенсивність експресії *dilp* у НСК мозку. Про що і свідчать отримані результати по дослідженні експресії генів *dilp*.

АКГ разом з DILP функціонують скоординовано у складі ендокринної сигнальної системи, яка регулює ріст та метаболізм клітини [149]. Аналіз експресії генів, які кодують АКГ, показали вищу експресію *akh* при активації IS як в *esc*-клітинах (у два рази), так і у *suh*-клітинах (у 5,2 рази) (Рис. 4.12). Окрім того, у 2,1 рази вищий рівень транскриптів *akh* спостерігався і при інгібуванні IS тільки в ЕБ, що може слугувати потенційним поясненням отриманих результатів, які показали вищий вміст глюкози в тілі мух генотипу *suh<sup>ts</sup>>inr-RNAi* (Рис. 4.12Б).

Аналіз рівня мРНК гена *tobi*, який залежить від активності DILP та АКГ (Рис. 4.5), говорить про інтенсивність IS у периферійних тканинах дрозофіли. За умов експресії *inr-RNAi* в *esc*-клітинах (у 3 рази) (Рис. 4.12А) та у *suh*-клітинах (у 7,8 рази) (Рис. 4.12Б) рівень транскриптів *tobi* був вищим. Це може свідчити про активацію інсулінового сигнального шляху у периферійних тканинах плодової мушки при інгібуванні IS у СКК та ЕБ. Отже, наші результати ще раз підтвердили існування взаємозв'язку *dilp-akh-tobi*, які залучені у регуляції метаболічних процесів *Drosophila*, а також встановили залежність їх експресії від інтенсивності IS у СКК та ЕБ.

Встановлена участь PERСК дрозофіли у регуляції процесів глюконеогенезу та гліцерогенезу [155]. Тому, рівень вуглеводів та триацилгліцеридів, ймовірно, залежить від рівня мРНК *perck*. Модуляція активності IS у СКК та ЕБ не впливала на відносний рівень транскриптів *perck*, однак активація сигнального шляху тільки в ЕБ призводила до підвищення рівня мРНК *perck* майже у 2 рази (Рис. 4.12).



**Рис. 4.12.** Рівень мРНК *akh*, *tobi*, *bmm*, *perck*, *4ebp* у мух з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Відомо, що ліпаза *Wgutter* бере участь у процесі ліполізу ТАГ [71; 115]. Відносний рівень мРНК гена *bmm* не відрізнялася між мухами контрольних і експериментальних генотипів (Рис. 4.12), що пояснює отримані результати, які показали, що будь-які модуляції IS в обох типах клітин, які досліджували, не впливали на вміст ТАГ. Наші висновки узгоджуються з результатами



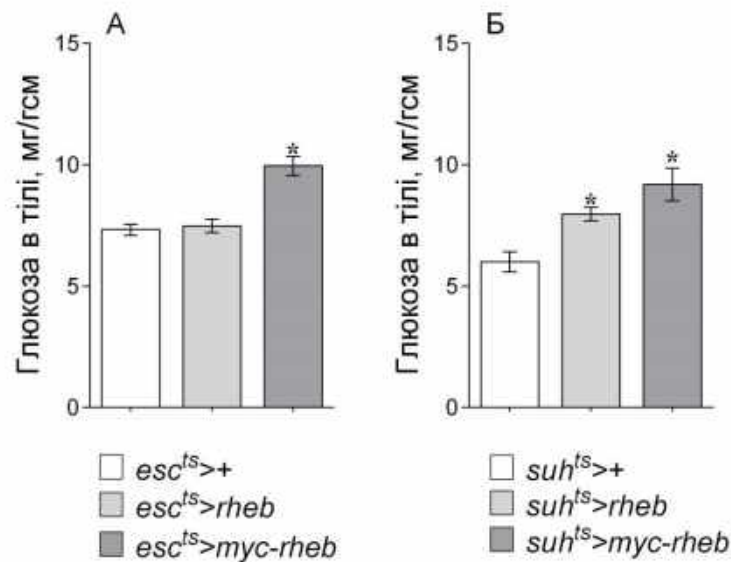
попередніх дослідженнями, які не продемонстрували змін у вмісті ТАГ у мутантів *bmm/akh* [71].

Маніпуляції IS в *esc*-клітинах не впливали на рівень транскриптів *4ebp* (Рис. 4.12А). Цікаво, що експресія *inr-RNAi* (у 4,8 рази) та *pten-RNAi* (у 1,7 рази) у *suh*-клітинах підвищувала даний показник у порівнянні з контрольними мухами (Рис. 4.12Б). Отже, отримані результати свідчать про те, що регуляція вуглеводного та ліпідного обміну на рівні транскрипції генів перебуває під впливом IS у невеликій популяції стовбурових клітин. Модуляція активності IS, яка впливає на функціонування СКК та їх подальшу диференціацію, регулює експресію генів *dilp* у НСК мозку. Надалі DILP впливає на транскрипцію цілої низки метаболічних генів та вміст циркулюючих та запасних вуглеводів та ліпідів у тілі плодової мушки.

### **4.3. Вплив транскрипційного фактору Мус у стовбурових і похідних клітинах на метаболізм *D. melanogaster***

Вміст глюкози, глікогену та триацилгліцеролів визначають для оцінки обміну вуглеводів та ліпідів [209]. Ми визначали вміст даних метаболітів у тілі особин *Drosophila*, у яких попередньо проводили активацію сигнального шляху TOR, а також при надекспресії Мус у СКК та ЕБ. Отримані результати продемонстрували не тільки важливу роль TOR у СКК та ЕБ, а також Мус у контролі рівня глюкози та запасних глікогену та триацилгліцеролів у тілі плодової мушки. За умов активації сигнального шляху TOR/Мус шляхом надекспресії *mus-rheb* у СКК та ЕБ вміст глюкози в тілі мух був на 36% вищим порівняно з контрольними самками (Рис. 4.13А).

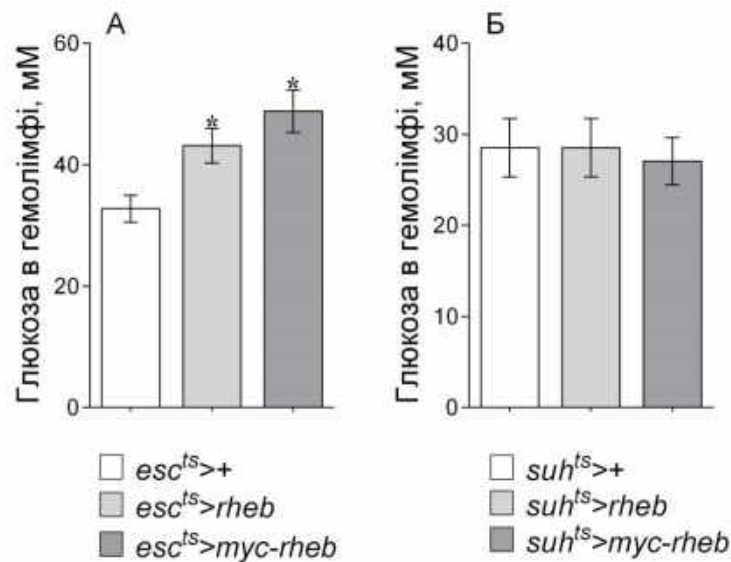
Концентрація глюкози в гемолімфі також була на 50% вищою у мух з надекспресією *mus-rheb*, однак надекспресія *rheb* також підвищувала даний показник на 30% (Рис. 4.14А). Наші дані добре узгоджуються з попередніми дослідженнями, у яких було показано, що надекспресія *c-мус* у клітинах печінки хребетних сприяє інтенсифікації процесу гліколізу, що супроводжується підвищеною концентрацією глюкози в крові [178].



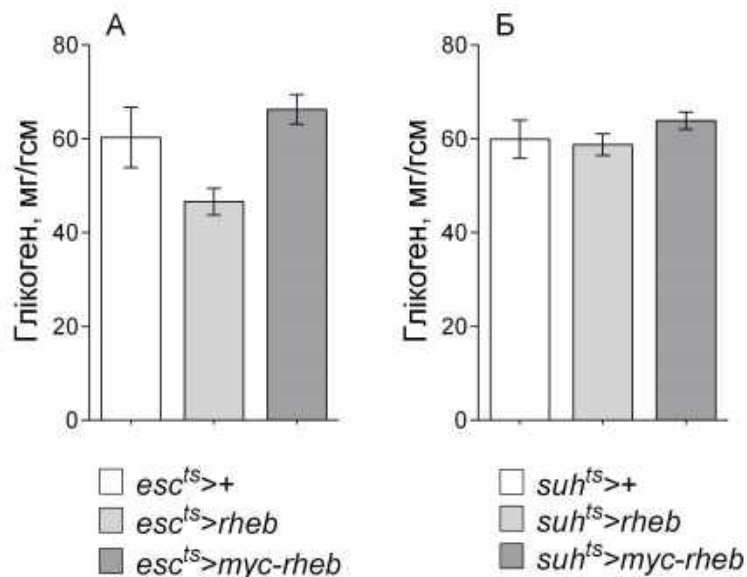
**Рис. 4.13.** Вміст глюкози в тілі мух з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Таким чином, інтенсифікація гліколізу повинна супроводжуватись зниженим вмістом глікогену. Однак, цікаво, що при надекспресії *myc-rheb* у СКК та ЕБ ми спостерігали на 16% вищий вміст глікогену у тілі мух (Рис. 4.15А).

Транскрипційний фактор Мус регулює близько 10-15% всіх генів як дрозофіли, так і людини [157]. У цьому числі гени, які кодують білки, що відповідають за метаболізм глюкози, а саме транспортер глюкози, гексокіназу II, лактатдегідрогеназу А, енолазу А [118]. Цікаво, що результати наших досліджень виявили залежність метаболізму вуглеводів і від активації TOR/Мус тільки в ентеробластах. Як показано на рисунку 4.13Б, надекспресія *rheb* у ЕБ призводить до вищого вмісту глюкози на 32% порівняно з контролем. Цікаво, що коекспресія *myc* більшою мірою підвищує даний показник на 45% у порівнянні із *suh<sup>ts</sup>>+* (Рис. 4.13Б). Таким чином, отримані дані підтверджують участь транскрипційного фактору Мус у регуляції метаболізму вуглеводів.

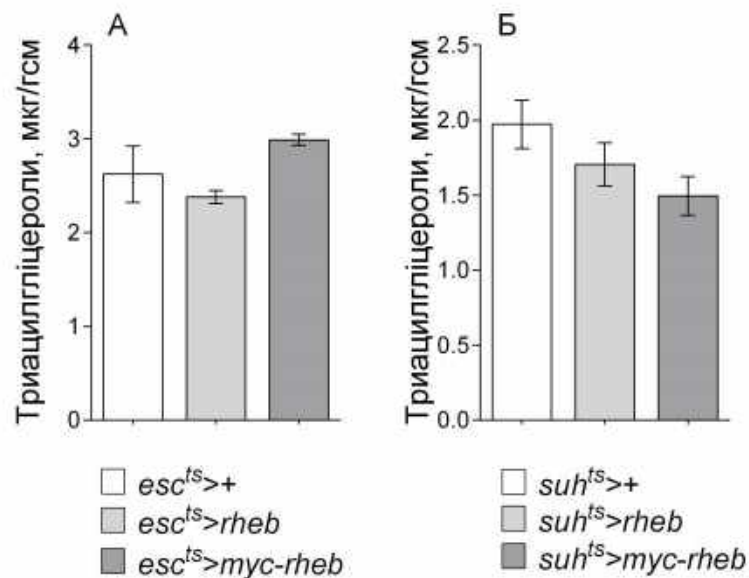


**Рис. 4.14.** Концентрація глюкози в гемолімфі мух з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).



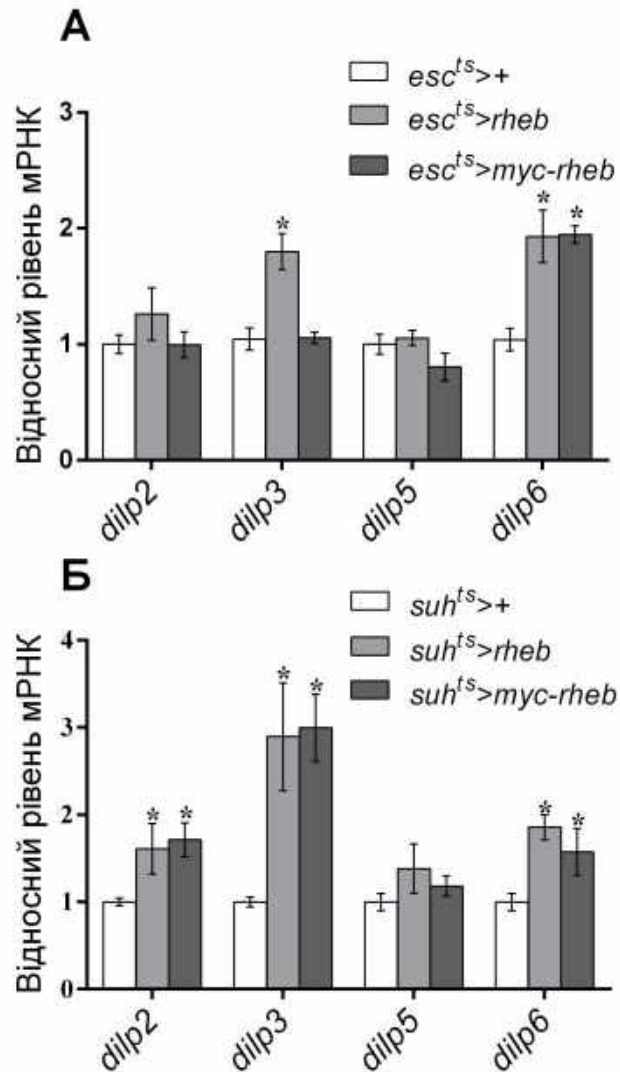
**Рис. 4.15.** Вміст глікогену в тілі мух з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Було показано, що зміни метаболізму у ракових клітинах (ефект Варбурга), які, як відомо, можуть бути спричинені активацією транскрипційного фактору Мус, супроводжується вищим рівнем поглинання глюкози клітинами та вищою інтенсивністю гліколізу [68]. Навіть більше, підвищений вміст вуглеводів в тілі трансгенних мух можна пояснити змінами в експресії генів *dilp*, *akh*, *perck*, *tobi*, що буде продемонстровано нижче. Однак, активація TOR/Мус в ентеробластах не впливала на концентрацію глюкози в гемолімфі та вміст глікогену, а також на рівень запасання ТАГ (Рис. 4.14, 4.15, 4.16).



**Рис. 4.16.** Вміст триацилгліцеролів у тілі мух з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Оскільки вміст метаболітів регулюється через експресією метаболічних генів, частина яких перебуває під контролем транскрипційного фактору Мус [118], ми визначали рівень транскриптів *dilp2*, *dilp3*, *dilp5*, *dilp6*, *akh*, *tobi* та *perck*. Дані гени регулюють метаболізм вуглеводів, ліпідів та низку фізіологічних процесів шляхом координованої взаємодії. З рисунку 4.17 видно, що активація TOR/Мус в *esc*-клітинах не впливала на відносний рівень мРНК *dilp2* та *dilp5*.



**Рис. 4.17.** Рівень мРНК *dilp2*, *dilp3*, *dilp5*, *dilp6* у мух з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього, n=4. \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи ( $esc^{ts}>+$ ,  $suh^{ts}>+$ ).

Однак, надекспресія *rheb* у даному типі клітин підвищувала рівень транскриптів генів *dilp3* та *dilp6* вдвічі порівняно з контролем (Рис. 4.17А). Також слід зазначити вищий рівень експресії *dilp6* за умов коекспресії *myc* у СКК та ЕБ.

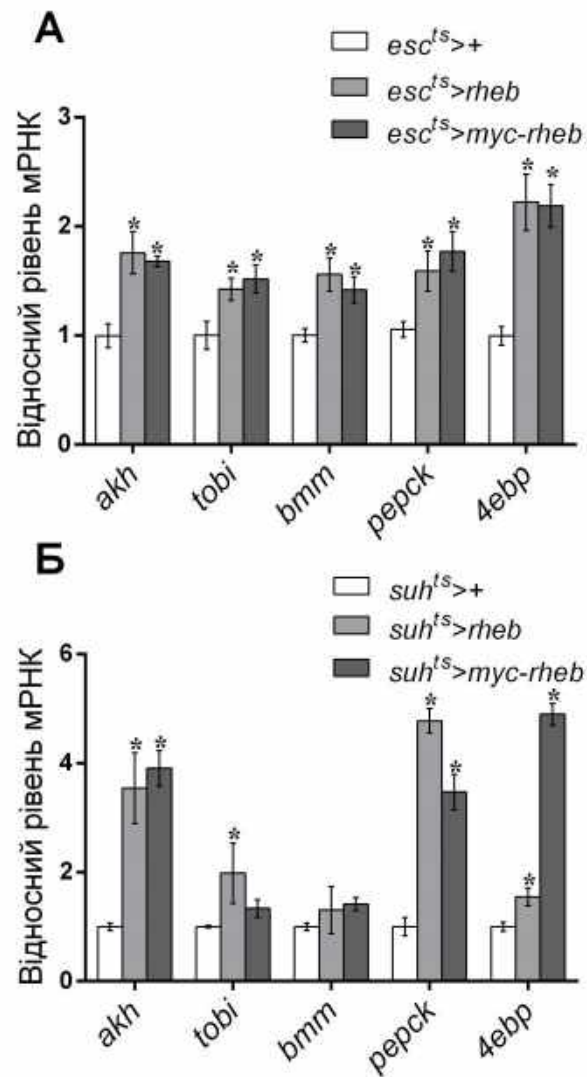
На рисунку 4.17Б представлені результати відносного рівня транскриптів *dilp* за умов активації TOR/Мус тільки в ЕБ. Активація сигнального шляху TOR

шляхом надекспресії *rheb* в екнтеробластах кишківника призводила до підвищення рівня транскриптів *dilp2*, *dilp3*, *dilp6* у 1,5, 3 та 2 рази відповідно (Рис. 4.17Б). Також цікаво зазначити, що спостерігався вищий рівень мРНК *dilp2* та *dilp3* в 1,7 та 3 рази у мух генотипу *suh<sup>ts</sup>>myc-rheb*.

Часто контроль вмісту глюкози в тілі мухи пов'язують з активністю глюкагон-подібного пептиду АКГ [106]. Як видно з даних представлених на рисунку 4.18, за умов активації сигнальної системи TOR/Мус як в *esc*-клітинах (на 1,7 рази), так і у *suh*-клітинах (3,5 рази), відносний рівень мРНК *akh* був вищим порівняно з контролем. Таким чином, TOR/Мус впливає на *akh* на рівні регуляції транскрипції, що пояснює вищий вміст глюкози в тілі мух з надекспресією *rheb* та *myc-rheb* в обох типах клітин.

АКГ та DILP разом впливають на експресію гена *tobi* [30]. Рівень транскриптів *tobi* був вищим у мух з надекспресією *rheb* (у 1,5-2 рази) в обох типах клітин (Рис. 4.18). Однак, даний показник був вищим тільки самок генотипу *esc<sup>ts</sup>>myc-rheb*, що свідчить про те, що СКК відіграють більш вагому роль у регуляції метаболічних процесів у порівнянні із їх недиференційованими похідними. Навіть більше, підвищена експресія гена *tobi* свідчить про активацію інсулінового сигнального шляху у периферичних тканинах дрозофіли [8]. Ймовірно, причиною підвищеної експресії генів *dilp*, *akh*, *tobi* є інтенсифікація метаболізму, яка супроводжується вищим рівнем синтезу та вивільнення даних пептидів. Таким чином, наші результати підтвердили існування взаємозв'язку між підвищеною транскрипцією *akh*, *tobi* та *dilp*, а також встановили функціональну залежність між даними генами та активністю сигнальної системи TOR/Мус у СКК та ЕБ плодової мушки.

У 2010 році Лапланте та Сабатіні встановили взаємозв'язок між інтенсивністю глюконеогенезу та активністю сигнального шляху TOR [112]. Одним із ключових ферментів глюконеогенезу є фосфоенолпіруват карбоксикіназа PEPCK, яка в процесі декарбоксилювання та фосфорилування перетворює оксалоацетат у фосфоенолпіруват [225].



**Рис. 4.18.** Рівень мРНК *akh*, *tobi*, *bmm*, *perck*, *4ebp* у мух з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього, n=4. \*Значення вірогідно відмінне від контрольної групи (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*) ( $P<0,05$ , критерій Стьюдента).

З рисунку 4.18 видно, що за умов активації сигнальної системи TOR/Мус як в *esc*-клітинах (у 2 рази), так і *suh*-клітинах (3,5-3,8 рази) відносний рівень транскриптів *perck* був вищим. Цікаво зазначити, що вищий рівень транскриптів гена *perck* чітко корелює з вищим вмістом глюкози в тілі мух з надекспресією *rheb* та *myc-rheb* в обох типах клітин. Хоча існує багато даних, які підтверджують наші припущення та висновки [225], однак деякі дослідники

припускають, що PERCK не впливає на рівень глюкози у плазмі крові мишей [192]. Відомо, що функціональний комплекс TORC1 через свою мішень кіназу S6 інгібує субстрат інсулінового рецептору (IRS), який, в свою чергу активує Akt [102]. Кіназа Akt інгібує транскрипційний фактор FOXO, який задіяний в активації *perck* [171]. Оскільки, транскрипційний фактор Muc є мішенню кінази S6, то можна зробити висновок, що Muc бере участь у регуляції метаболізму вуглеводів та ліпідів за умов контролю експресії гена *perck*.

Ще одним можливим доказом участі сигнальної системи TOR/Muc у регуляції метаболізму ліпідів є зміна відносного рівня мРНК гена *bmm*. Ліпаза Brummer (*bmm*) залучена у мобілізації ТАГ з жирових депо комах [70]. Окрім того, що наші результати продемонстрували, що коекспресія транскрипційного фактору *muc* у СКК та ЕБ не впливав на вміст ТАГ у тілі мух, також Muc не впливав і на відносний рівень експресії *bmm* (Рис. 4.18А). Однак, за умов надекспресії як *rheb*, так і *muc-rheb* тільки в ентеробластах експресія була у 1,5 рази вищою порівняно з контролем (Рис. 4.18Б), але вміст ТАГ у тілі мух не відрізнявся від такого у контрольних. Ймовірно, деякі інші механізми були залучені у регуляції процесів запасання ліпідів.

Отримані нами результати вказують на участь транскрипційного фактору Muc у регуляції відносної експресії гена *4ebp*, яка була вищою у 2,3 рази у мух генотипів *esc<sup>ts</sup>>rheb* та *esc<sup>ts</sup>>muc-rheb* порівняно з контролем (Рис. 4.18А). Надекспресія *rheb* тільки в ентеробластах підвищувала рівень транскриптів *4ebp* у 1,5 рази, а надекспресія *muc-rheb* підвищувала даний показник у 5 разів (Рис. 4.18Б). Окрім регуляції синтезу білка, ген *4ebp* бере участь у регуляції відповіді організму на дію оксидантів та голодування. Так, ми спостерігали зниження стійкості до голодування та оксидативного стресу самок генотипів *esc<sup>ts</sup>>rheb* та *esc<sup>ts</sup>>muc-rheb* порівняно з контрольними.

#### **Висновки до розділу 4**

1. Інгібування TOR та IS у СКК та ЕБ призводить до зниження вмісту глюкози в тілі та гемолімфі мух, а активація – підвищує його. Окрім того, інгібування TOR через експресію *tor-RNAi* в *esc*-клітинах призводить до



нижчого рівня глікогену та ТАГ, а у *suH*-клітинах – до зростання рівня резервних вуглеводів та ліпідів. Зміни у вмісті енергетичних метаболітів у тілі та гемолімфі мух зумовлені змінами рівня мРНК генів системи *dilp-akh*.

2. Інгібування інсулінового і TOR шляхів у стовбурових клітинах кишківника призводить до зниження рівня триацигліцеролів та глікогену. В той же час, інгібування цих шляхів у ентеробластах призводить до підвищення вмісту вказаних метаболітів у всьому тілі плодової мушки.

3. Активація Мус у СКК та ЕБ підвищувала рівень глюкози в тілі та гемолімфі, а також рівень експресії генів системи *dilp-akh*.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

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).

## РОЗДІЛ 5

### РОЛЬ TOR/IS/МУС У СТОВБУРОВИХ КЛІТИНАХ У РЕГУЛЯЦІЇ ГОМЕОСТАЗУ КИШКІВНИКА *DROSOPHILA*

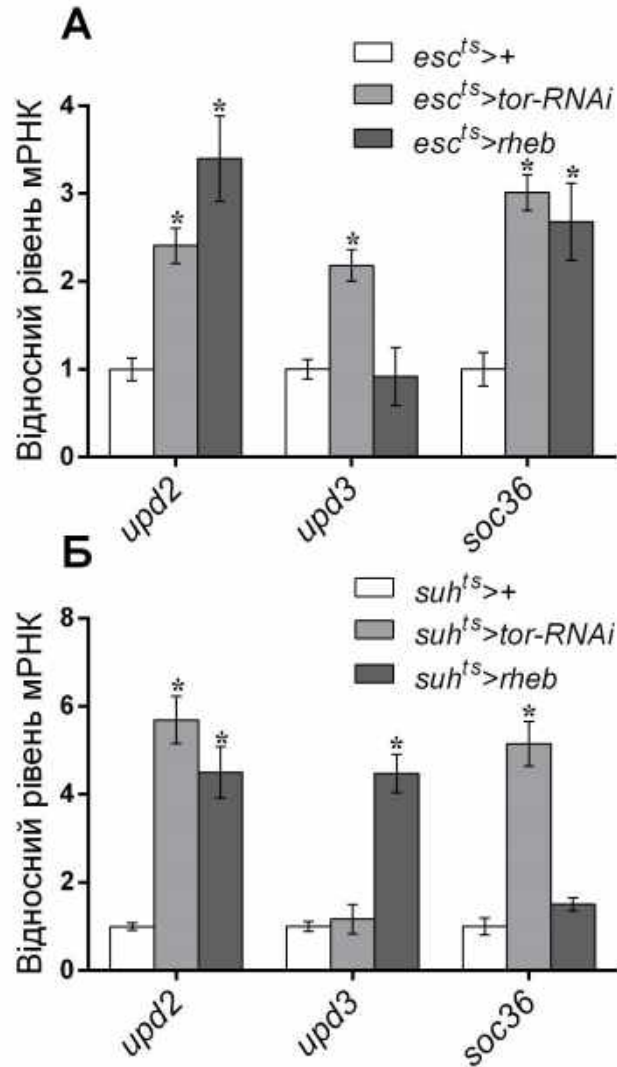
#### 5.1. Локальна регуляція транскрипції генів, які кодують компоненти JAK/STAT, EGFR, JNK у кишківнику *D. melanogaster* за участі сигнального шляху TOR

Окрім сигнального шляху Notch, який є ключовим у регуляції процесів проліферації СКК та диференціації ЕБ, показано, що дані процеси контролюються також EGFR, Wingless, Decapentaplegic [16; 91; 92; 121]. Окрім того, сигнальні шляхи IS, JAK/STAT та Hippo є критично важливими у контролі проліферації СКК для забезпечення гомеостазу та за дії патогенів [2; 10; 92]. Тому на наступному етапі нашого дослідження ми вивчали вплив інгібування/активації сигнального шляху TOR у СКК та ЕБ *Drosophila* на рівень мРНК генів, які кодують компоненти JAK/STAT (*upd2*, *upd3*, *soc36*), EGFR (*spi*, *krn*, *vn*), IS (*dilp3*) та JNK (*puc*) і, таким чином, регулюють гомеостаз кишківника та його цілісність. Використовували методику оцінки цілісності кишківника методом «Смурф» [176], а також вимірювання рівня мРНК генів у кишківнику плодової мушки.

Цілісність кишківника є важливим показником старіння, оскільки ми спостерігали, що мухи фенотипу «Смурф», які характеризувались поширенням синього нерозчинного барвника по всьому тілі, помирали приблизно на 2-3 добу після виявлення. Тому можна зробити висновок, що збереження цілісності кишківника є критично важливими факторами для виживання мух. Однак, ми не спостерігали достовірної відмінності у кількості мух фенотипу «Смурф» між мухами різних генотипів, оскільки виявляли тільки поодинокі випадки даного фенотипу кожні 5 діб протягом 30 днів (Додаток 3).

Наші дослідження виявили залежність рівня мРНК генів, які кодують компоненти сигнальних шляхів JAK/STAT, EGFR, IS та залучені у регуляції

кишківникового гомеостазу, від інтенсивності сигнального шляху TOR. Відносний рівень танскриптів *upd2*, *upd3*, *soc36* (Рис. 5.1А) був приблизно у 2-3 рази вищим у самок генотипу *esc<sup>ts</sup>>tor-RNAi*.



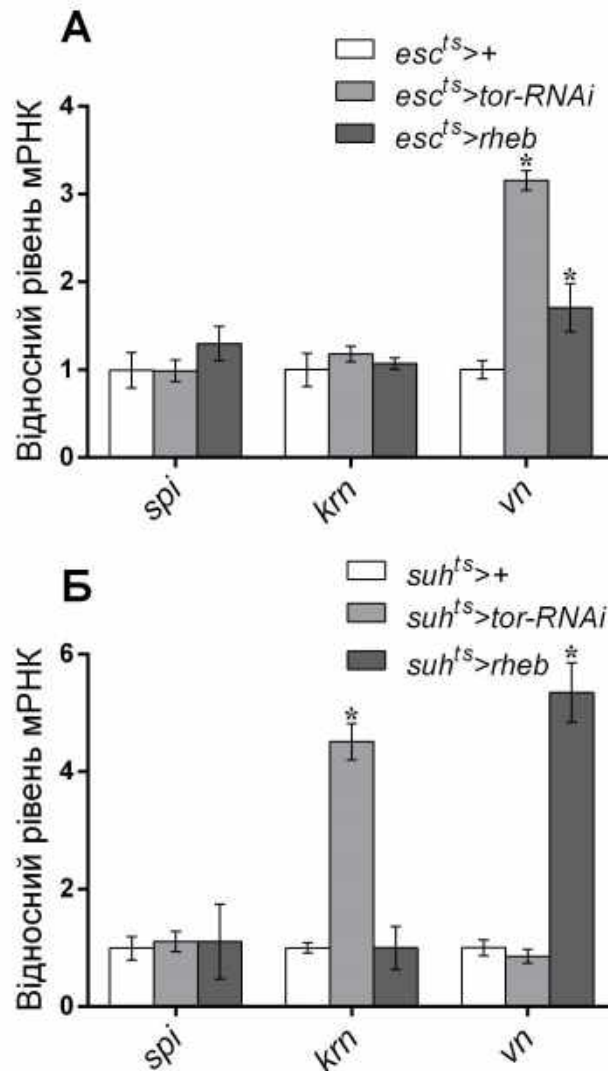
**Рис. 5.1.** Рівень мРНК *upd2*, *upd3* та *soc36* у кишківнику мух з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) або надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Подібно, мухи генотипу *suh<sup>ts</sup>>tor-RNAi* характеризувалися у 5-5,5 рази вищим рівнем мРНК генів *upd2* та *soc36* (Рис. 5.1Б). Мухи генотипу *esc<sup>ts</sup>>rheb*, у яких відбувається активація TOR у СКК та ЕБ, проявляли вищий рівень

транскриптів *upd2* та *soc36* (Рис. 5.1А). Також підвищення рівня транскриптів *upd2* та *upd3* (Рис. 5.1Б) спостерігалось і при активації TOR тільки в ентеробластах. Отже, назагал як активація, так і інгібування сигнального шляху TOR, призводили до підвищення транскрипції генів, які кодують компоненти JAK/STAT, який залучений у регуляції проліферації СКК та диференціації ЕБ. Амчеславский та колеги (2011) продемонстрували, що втрата функціональної здатності туберозно-склерозних комплексів, яка викликає активацію сигнального шляху TOR, призводить до потоншення епітелію кишківника дрозофіли. Це також підтверджує визначальну роль сигнального шляху TOR у регуляції гомеостазу кишківника. Відомо, що сигнальні шляхи TOR та JAK/STAT є консервативними від *Drosophila* до людини, та було продемонстровано, що TORC1 регулює експресію генів *upd* і, як результат, контролює активність сигнального шляху JAK/STAT при розвитку очей плодової мушки [219].

Сигнальний шлях EGFR у кишківнику дорослих особин *Drosophila* активується сигнальними лігандами Spitz (Spi), Keren (Krn) та Vein (Vn) [31]. Окрім того, була показана тісна взаємодія сигнального шляху TOR та EGFR [137]. Дана взаємодія реалізується шляхом модуляції експресії генів-мішеней EGFR сигнальним шляхом TOR [137]. Наші результати продемонстрували, що TOR також впливає на рівень транскрипції генів, які кодують сигнальні ліганди для EGFR. Було встановлено різнонаправлені ефекти при модуляції сигнального шляху TOR у СКК та ЕБ на рівень транскриптів *spi*, *krn* і *vn*. Такий ефект може бути зумовлений різними типами клітин, в яких експресуються дані гени. Spi експресується у ентеробластах, Krn – у ентероцитах, а Vn – у клітинах вісцерального м'язу [31; 223]. Інгібування TOR тільки в ЕБ шляхом експресії *tor-RNAi* підвищувало рівень мРНК *krn* у 4,5 рази (Рис. 5.2Б). Цікаво, що підвищення транскриптів *vn* у кишківнику *Drosophila* спостерігалось при експресії *tor-RNAi* у *esc*-клітинах (у 3,2 рази). Будь-які зміни активності сигнального шляху TOR не впливали на відносну експресію гена *spi* (Рис. 5.2).

Подібно, модуляція активності TOR в *esc*-клітинах *Drosophila* не впливала на рівень транскриптів *krn* (Рис. 5.2А).



**Рис. 5.2.** Рівень мРНК *spi*, *krn* та *vn* у кишківнику мух з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) або надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Активація сигнального шляху TOR через надекспресії *rheb* в *esc*-клітинах також призводила до підвищення рівня мРНК *vn* (у 1,7 рази) (Рис. 5.2А). П'ятиразове підвищення транскриптів *vn* спостерігалось також при надекспресії *rheb* тільки в ЕБ (Рис. 5.2Б). Отже, будь-які порушення гомеостазу у

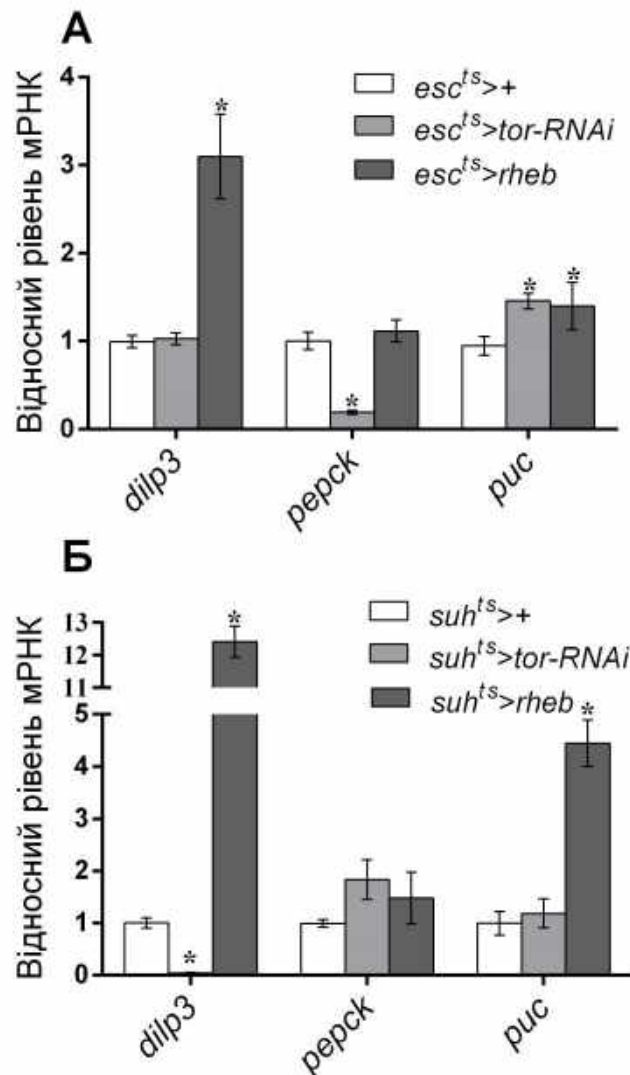
кишківнику зумовлені зміною функціонування СКК та ЕБ через зміну активності сигнального шляху TOR, що призводить до активації EGFR у СКК *Drosophila* на рівні експресії генів, які кодують відповідні ліганди.

Важлива роль у регуляції гомеостазу кишківника належить сигнальному пептиду DILP3, який експресується у клітинах вісцеральних м'язів кишківника. Зростання кількості ЕЕ клітин призводить до активації проліферації СКК через модуляцію експресії гена *dilp3* у клітинах кишківника [3]. DILP3 синтезується у клітинах вісцерального м'язу середньої та задньої частини кишківника [213] та бере безпосередню участь у підвищенні інтенсивності процесів диференціації та проліферації стовбурових клітин шляхом активації симетричного та асиметричного поділу [153]. Експресія *tor-RNAi* у *suh*-клітинах призводить до практично відсутності транскриптів *dilp3* у вісцеральних м'язах кишківника (Рис. 5.3Б). Цікаво, що й активація сигнального шляху TOR через надекспресію *rheb* як в *esc*-клітинах так і у *suh*-клітинах призводить до вищого рівня мРНК *dilp3* у 3 і 12 разів, відповідно (Рис. 5.3А і Б). Інгібування сигнального шляху TOR в *esc*-клітинах шляхом експресії *tor-RNAi* не впливала на рівень мРНК гена *dilp3*. Отже, отримані дані можуть свідчити про те, що сигнальний шлях TOR контролює гомеостаз СКК плодової мушки за участю сигнального ліганду DILP3. Окрім того, наші дані продемонстрували, що модуляція TOR у СКК та ЕБ впливає на вісцеральні м'язи, які експресують *dilp3* і, таким чином, функціонують як ніша СКК.

Рівня мРНК гена *perck* був нижчим на 81% при інгібуванні сигнального шляху TOR в *esc*-клітинах *Drosophila* через експресію *tor-RNAi* (Рис. 5.4А). Активація сигнального шляху в обох типах клітин не впливала на рівень транскриптів даного гена (Рис. 5.4А, Б). Таким чином, сигнальний шлях TOR у СКК та ЕБ може впливати на інтенсивність метаболізму у клітинах кишківника плодової мушки через зміну рівня мРНК *perck*.

Ми також визначали рівень мРНК *puckered* (*puc*), який кодує фосфатазу JUN, яка залучена в активації захисних механізмів за дії оксидантів [177]. Окрім того, *puc* контролює рівень експресії *dpp* (Decapentaplegic), який, у свою

чергу, бере участь у регуляції інтенсивності процесів диференціації та проліферації СКК [133], а також рівень експресії *upd3* [92].



**Рис. 5.3.** Рівень мРНК *dilp3*, *perck* та *ruc* у кишківнику мух з нокдауном *tor* (*tor-RNAi*) або надекспресією *rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Активація сигнального шляху TOR через надекспресію *rheb* у СКК та ЕБ достовірно підвищувала рівень транскриптів *ruc* у кишківнику плодової мушки (в *esc*-клітинах – на 50%, у *suh*-клітинах – у 5 разів) (Рис. 5.5А, Б). Окрім того, спостерігалось підвищення відносного рівня мРНК гена *ruc* також і при



інгібуванні TOR через експресію конструкції *tor-RNAi* в *esc*-клітинах (на 50%) (Рис. 5.5А). Отримані результати підтверджують існування впливу сигнального шляху TOR на функціонування СКК та ЕБ через модуляцію активності сигнальних шляхів на транскрипційному рівні, які залучені у регуляції інтенсивності диференціації та проліферації клітин кишківника.

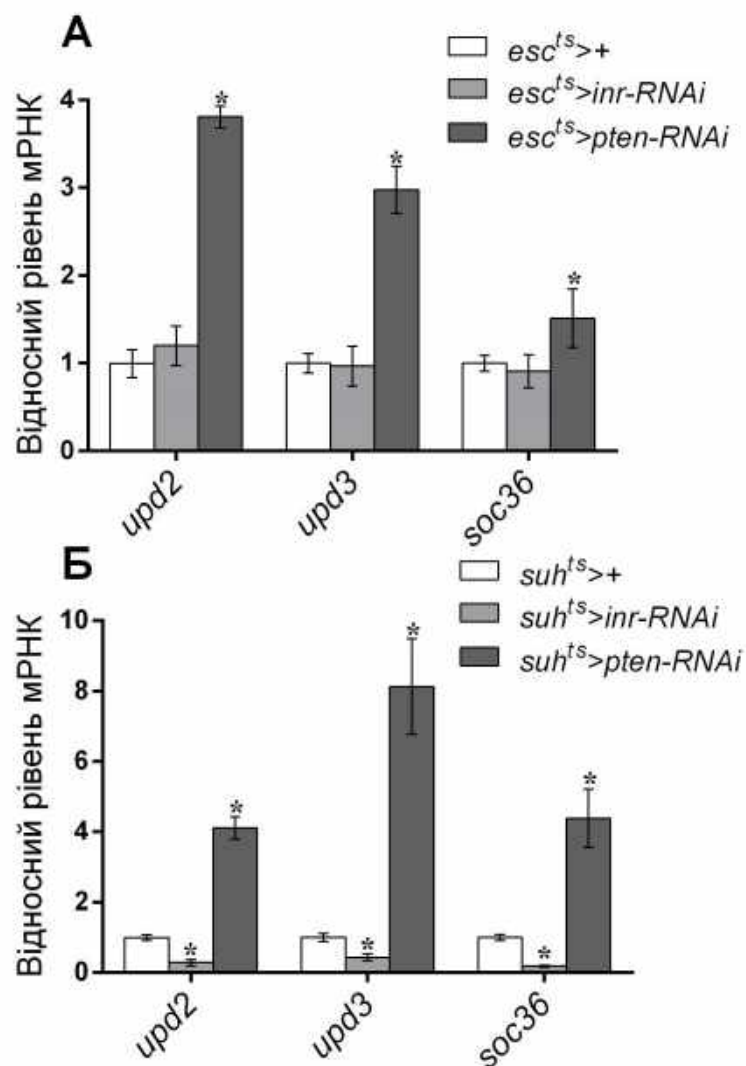
Отже, рівні експресії генів кишківника, які залучені у підтримання гомеостазу кишківника, показали, що функціонування СКК необхідне для підтримання цілісності шлункового тракту за нормальних умов та при пошкодженнях. Відомо, що подібні регуляторні процеси характеризуються певною подібністю у *Drosophila* та людини. В даному розділі обговорюються механізми регуляції функціонування СКК клітинами ніші через консервативні сигнальні шляхи. Також представлені докази значущості взаємодії сигнальних шляхів JAK/STAT, EGFR, JNK та інсулінового шляху для забезпечення системності та функціонування СКК. Також доведено центральну роль сигнального шляху TOR, який контролює інтенсивність JAK/STAT, EGFR, JNK та інсулінового шляху на рівні експресії генів, які кодують сигнальні ліганди. Подальші дослідження в даній області допоможуть зрозуміти як належна регуляція диференціації СКК може сприяти забезпеченню цілісності кишківника.

## **5.2. Локальна регуляція транскрипції генів, які кодують компоненти JAK/STAT, EGFR, JNK у кишківнику *D. melanogaster* за участі інсулінового сигнального шляху**

Велика увага приділяється дослідженню молекулярних регуляторних шляхів, які залучені в регуляції гомеостазу кишківника. Голодування призводить до зменшення розмірів кишківника шляхом інгібування активності IS у стовбурових клітинах кишківника [153], що демонструє ключову роль сигнального шляху у підтриманні гомеостазу кишківника. Також показано, що IS інтенсифікує процеси проліферації та диференціації СКК при старінні та відновленні організму [2; 34]. IS бере участь у контролі функціонування СКК

шляхом утворення системи сигнальних шляхів. Так, відомо, що IS реалізує свій вплив на диференціацію та проліферацію СКК у тандемі з сигнальними шляхами JAK/STAT та EGFR [37].

Регуляція функціонування СКК за участі сигнального шляху JAK/STAT зберігається від дрозофіли до людини. Сигнальні ліганди для рецептору JAK – Upd2 та Upd3 активують сигнальний шлях JAK/STAT, який, у свою чергу, активує поділ СКК [10]. Інгібування IS через нокдаун гена *inr* у СКК та ЕБ не впливав на відносний рівень мРНК *upd2*, *upd3* та гена-мішені *soc36* (Рис. 5.4А).



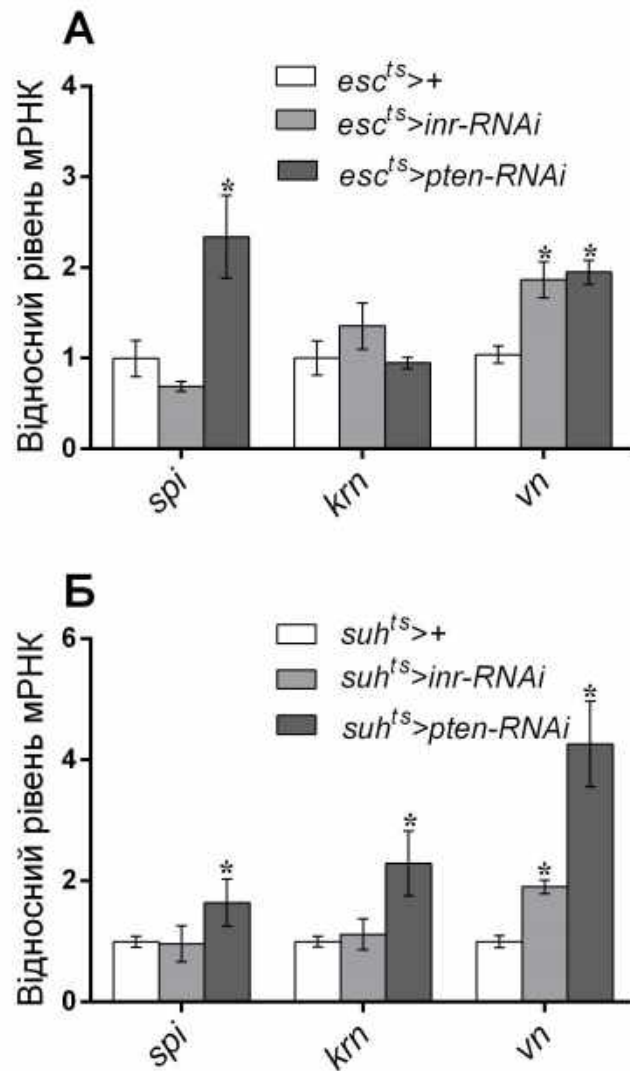
**Рис. 5.4.** Рівень мРНК *upd2*, *upd3* та *soc36* у кишківнику мух з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього, n=4. \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Однак, експресія *inr-RNAi* тільки в ЕБ плодової мушки знижувала рівень транскриптів *upd2*, *upd3* та *soc36* (Рис. 5.4Б). Рисунок 5.4 демонструє значно вищий рівень транскриптів *upd2*, *upd3* та *soc36* за умов активації IS (експресія *pten-RNAi*), як в *esc*- так і у *suh*-клітинах. Отримані результати дозволяють припустити, що IS у СКК та ЕБ активує сигнальний шлях JAK/STAT на рівні експресії генів сигнальних лігандів. Показано, що надекспресія *upd2* та *upd3* у ЕЦ, ЕБ або СКК *Drosophila* призводить до підвищення проліферації, що, в свою чергу, спричиняє гіперплазію [123]. Отже, активація IS у СКК та ЕБ може підвищувати кількість диференційованих клітин кишківника. При цьому порушується гомеостаз кишківника, що в свою чергу негативно впливає на фізіологічні процеси та скорочує тривалість життя. Окрім того, інгібування сигнального шляху JAK/STAT у клітинах ніші СКК призводить до зменшення розмірів та кількості клітин, що призводить до атрофії кишківника [92]. Дані процеси також супроводжуються втратою гомеостазу кишківника, що також негативно позначається на фізіологічних показниках та тривалості життя *Drosophila*.

JAK/STAT активує процеси проліферації та диференціації СКК шляхом активації сигнального шляху EGFR [110]. Таким чином, ключовими регуляторами проліферації та диференціації СКК є сигнальні шляхи JAK/STAT та EGFR [123]. Встановлена необхідність функціонування EGFR для процесу проліферації СКК [16]. У *Drosophila* синтезуються три сигнальні ліганди *Sp1* (*Spitz*), *Krn* (*Keren*), *Vn* (*Vein*) та один рецептор EGF [123]. З результаті представлених на рисунку 5.5 видно підвищення рівня мРНК гена *spi* (у 1,6-2,2 рази) при експресії *pten-RNAi* в обох типах клітин.

Цікаво, що інгібування IS в *esc*-клітинах також призводило до вищого рівня транскрипту гена *vn* у 2 рази (Рис. 5.5А). Такі різнонаправлені ефекти від активації та інгібуванні IS у різних типах клітин можуть бути зумовлені тим, що гени, які кодують дані сигнальні ліганди, експресуються у різних типах клітин ніші СКК. Однак, підсумовуючи отримані результати, назагал можна

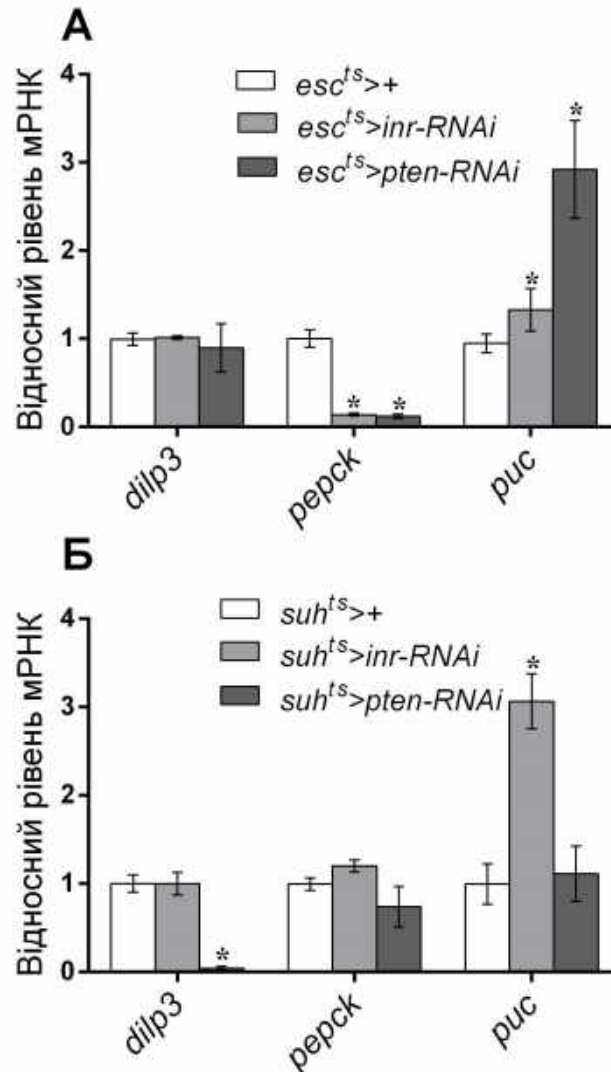
припустити, що активація IS у СКК та ЕБ активізує сигнальний шлях EGFR на рівні транскрипції генів для сигнальних лігандів.



**Рис. 5.5.** Рівень мРНК *spi*, *krn* та *vn* у кишківнику мух з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього, n=4. \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Вісцеральний м'яз кишківника як ніша для СКК продукує DILP3 для активації проліферації та диференціації СКК за умов надходження поживних речовин, регенерації тканин кишківника або при старінні [2; 16; 37]. Проте точний механізм регуляції функціонування СКК за участі інсулінового

сигнального шляху все ще залишається недостатньо вивченим. Модуляція активності IS у СКК та ЕБ не впливала на рівень мРНК гена *dilp3* (Рис. 5.6А).



**Рис. 5.6.** Відносний рівень мРНК *dilp3*, *perck* та *risc* у кишківнику мух з нокдауном *inr* (*inr-RNAi*) або *pten* (*pten-RNAi*) у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Активація IS через експресію *pten-RNAi* тільки в ентеробластах значно знижувала рівень транскрипту гена *dilp3* у кишківнику (Рис. 5.6Б). Зниження рівня мРНК гена *dilp3* свідчить про можливе інгібування процесів проліферації у кишківниках, та про зниження кількості ЕБ клітин [3]. Це свідчить про те, що

ЕЕ клітини можуть функціонувати як сенсори поживних речовин для регуляції проліферації СКК через експресію *dilp3* [3]. У нашому випадку спостерігалась активація JAK/STAT та EGFR у мух генотипу *suh<sup>ts</sup>>pten-RNAi*, що може свідчити про підвищення рівня проліферації СКК. Ймовірно, ентероендокринні клітини якимось чином реагують на підвищену активність JAK/STAT та EGFR та передають сигнал до клітин вісцерального м'язу, які інгібують експресію *dilp3* для запобігання гіперпроліферації СКК та підтримання гомеостазу. Так, раніше було встановлено, що IS бере участь у встановленні балансу між самовідновленням СКК та їх диференціацією, що критично важливе для збереження гомеостазу тканини [56].

Згідно бази FlyBase, роль гена *perck* у біологічних процесах полягає у регуляції стійкості до голодування, клітинній відповіді на надходження глюкози, регуляція синтезу гліцеролу з пірувату і глюконеогенезу. Наші дослідження продемонстрували, що як інгібування, так і активація IS у СКК та ЕБ, значно знижують рівень мРНК гена *perck* на 90% (Рис. 5.6А). Однак модуляція сигнального шляху тільки в ентеробластах не впливала на рівень транскрипту гена *perck* (Рис. 5.6Б).

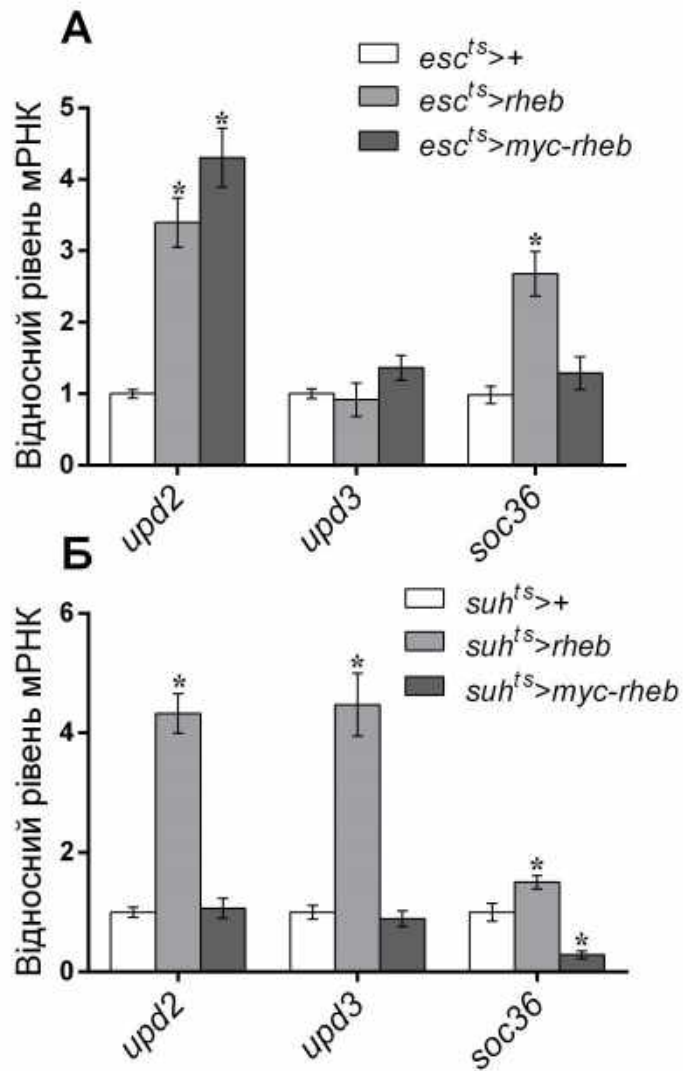
Ми спостерігали відмінні результати при визначенні експресії гена *ric* при модуляції IS в *esc*- та *suh*-клітинах. Так, у 3 рази вища експресія *ric* спостерігалася при активації IS в *esc*-клітинах (Рис. 5.6А), та при інгібуванні у *suh*-клітинах (Рис. 5.6Б). Підвищена експресія *ric*, а також підвищена активність фосфатази JNK призводить до інгібування сигнального шляху JNK. Відомо про важливу роль сигнального шляху JNK у підвищенні стійкості до дії оксидантів та продовження тривалості життя у мух [218]. Результати наших досліджень добре узгоджуються з такими висновками, оскільки мухи генотипу *esc<sup>ts</sup>>pten-RNAi* та *suh<sup>ts</sup>>inr-RNAi*, які характеризувались вищим рівнем транскриптів *ric* були чутливішими до дії оксидативного стресу та жили менше порівняно з контрольними.

### 1.3. Локальна регуляція транскрипції генів, які кодують компоненти JAK/STAT, EGFR, JNK у кишківнику *D. melanogaster* за участі транскрипційного фактору Мус

Кишківник дрозопіли часто піддається впливу токсинів, які продукуються бактеріями, або можуть потрапляти в тіло при споживанні їжі. При цьому може порушуватись гомеостаз кишківника і, як наслідок, втрачається цілісність кишківника. Гомеостаз СКК контролюється Notch, JAK/STAT, EGFR, Hippo, інсуліновим та Wnt сигнальними шляхами [91]. Ми вимірювали рівень транскриптів для генів *spi*, *krrn* та *vn*, які кодують білки для сигнального шляху EGFR, а також ліганди *upd2*, *upd3* для JAK/STAT та його ген-мішень *soc36*.

Аналіз цілісності кишківника методом виявлення фенотипу “Смурф” серед мух не виявив порушень цілісності кишківника при активації сигнальної системи TOR/Мус у СКК та ЕБ (Додаток 3). Ми спостерігали поодинокі випадки особин фенотипу “Смурф” серед усіх когорт мух протягом 30 днів. При цьому не виявлено чіткої тенденції чи залежності даного показника від активації TOR/Мус. Однак, мали змогу спостерігати відмінності відносного рівня мРНК генів кишківника, які кодують білки JAK/STAT, EGFR, JNK та інсулінового сигнального шляхів за умов активації TOR/Мус. Рисунок 5.7 демонструє, що транскрипційний фактор Мус в обох типах клітин впливає на рівень транскриптів *upd2*, *upd3*, *soc36* у клітинах кишківника. Відомо, що сигнальний шлях JAK/STAT бере участь у збереженні СКК, а також сприяє диференціації ентеробластів [10]. Сигнальні ліганди Upd2 та Upd3 активують JAK/STAT та запускають мітоз СКК [10]. Рівень транскриптів гена *upd2* був вищим у 3-4 рази порівняно з контролем за умов надекспресії як *rheb*, так і *mus-rheb* в *esc*-клітинах. Секреція Upd2 клітинами кишківника регулюється Мус [174]. Однак, активація TOR/Мус в *esc*-клітинах не впливала на відносну експресію *upd3* (Рис. 5.7А). Цікаво, що рівень транскрипту гена *soc36*, який є мішенню для JAK/STAT, був вищим у 3 рази за умов надекспресії *rheb*, але надекспресія *mus-rheb* не впливала на даний показник. Це може свідчити про те, що транскрипційний фактор Мус у СКК та ЕБ може впливати на активність

ЖАК/СТАТ на рівні транскрипції. Ще одним доказом даної гіпотези є результати досліджень відносного рівня транскриптів генів *upd2*, *upd3*, *soc36* за умов активації TOR/Мус тільки в ентеробластах.



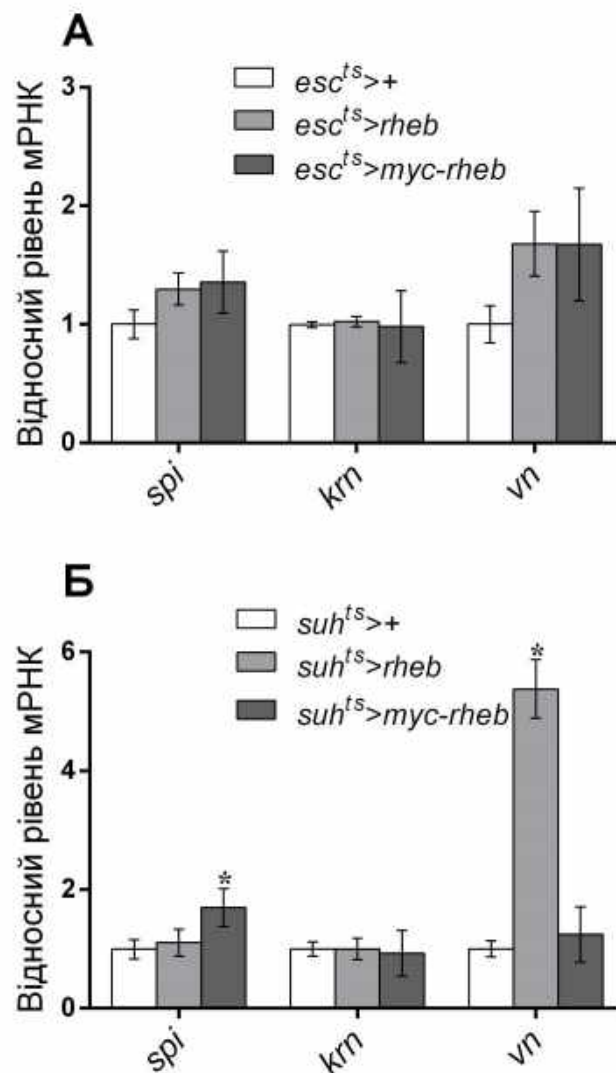
**Рис. 5.7.** Рівень мРНК *upd2*, *upd3* та *soc36* у кишківнику мух з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє ± похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Як видно з рисунку 5.7 рівень мРНК *upd2*, *upd3* та *soc36* був вищим при надекспресії *rheb* в ЕБ. При цьому експресія *myc-rheb* не впливала на рівень транскриптів даних генів (Рис. 5.7), що свідчить про те, що Мус знижує



активність сигнального шляху JAK/STAT шляхом зниження експресії генів які кодують його компоненти.

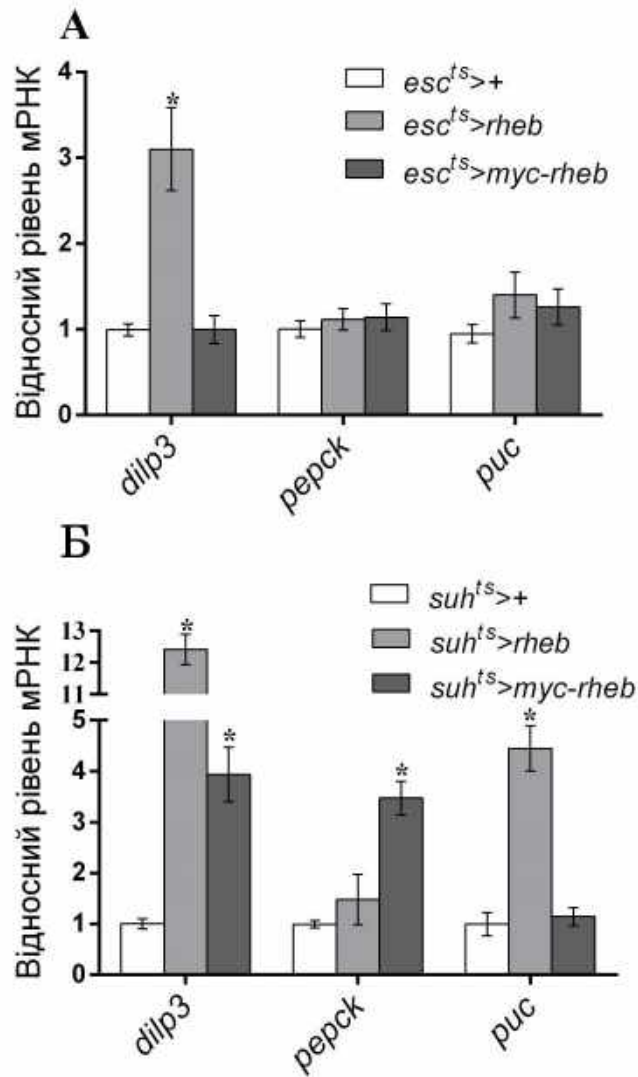
Рівень транскриптів *vn* був у 5 разів вишим порівняно з контролем при надекспресії *rheb* тільки в ЕБ, але коекспресія *myc-rheb* не впливала на даний показник (Рис. 5.8Б), що свідчить про те, що Мус знижує рівень транскриптів *vn*. Цікаво, що коекспресія *myc* тільки в ентеробластах підвищувала рівень транскрипту гена *Spi* у 2 рази порівняно з контролем (Рис. 5.8Б).



**Рис. 5.8.** Рівень мРНК *spi*, *krn* та *vn* у кишківнику мух з надекспресією *rheb* або *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середне  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Інсуліновий сигнальний шлях активує проліферацію та диференціацію СКК [2]. Клітини кишківника синтезують два види інсуліноподібних пептидів DILP3 та DILP7 [213]. На рисунку 5.9 показаний відносний рівень мРНК гена *dilp3*, який експресується у м'язах переднього та середнього кишківника [213]. DILP3 діє безпосередньо через рецептор інсуліну (InR), активуючи таким чином процеси проліферації та росту кишківника шляхом симетричного та асиметричного поділу СКК [153]. При надекспресії *rheb* в *esc*-клітинах рівень транскрипту *dilp3* був у 3 рази вищим порівняно з контролем (Рис. 5.9А). Однак при надекспресії *mus-rheb* не спостерігалось різниці порівняно з контролем, що може свідчити про те, що Мус може інгібувати експресію *dilp3*. Подібні ефекти виявлено і при активації TOR/Мус тільки в ЕБ. Так, 12-кратне підвищення транскриптів *dilp3* спостерігалось при надекспресії *rheb* у *suh*-клітинах, а коекспресія *mus* підвищувала даний показник тільки у 4 рази порівняно з контролем. Таким чином, експресія *mus-rheb* знижувала рівень мРНК *dilp3* у 8 разів порівняно з мухами *suh<sup>ts</sup>>rheb*. Активація TOR/Мус в *esc*-клітинах не впливала на рівень мРНК гена *perck*, який кодує ключовий фермент глюконеогенезу фосфоенолпіруват карбоксикіназу. Однак, надекспресія *mus-rheb* тільки в ЕБ плодової мушки підвищувала рівень транскрипту для *perck* у 3,5 рази (Рис. 5.9Б). Отримані дані можуть свідчити про те, що транскрипційний фактор Мус в ентеробластах впливає на перебіг метаболічних процесів у клітинах кишківника через активацію синтезу ключового ферменту метаболічних шляхів.

Рисунок 5.9 демонструє вплив сигнальної системи TOR/Мус на рівень мРНК гена *ric* у клітинах кишківника. Активація TOR/Мус в *esc*-клітинах не впливала на рівень транскриптів *Ruckered* (Рис. 5.9А). Однак, у 4,5 рази вищий рівень мРНК спостерігали за умов надекспресії *rheb* тільки в ентеробластах (Рис. 5.15Б). Однак, при коекспресії *mus-rheb* у *suh*-клітинах відносна експресія гена *ric* достовірно не відрізнялася від контролю (Рис. 5.9Б). Це свідчить про те, що Мус може знижувати експресію *ric* у клітинах кишківника.



**Рис. 5.9.** Рівень мРНК *dilp3*, *perck* та *rus* у кишківнику мух з надекспресією *rheb* та надекспресією *myc-rheb* у стовбурових та похідних клітинах (*esc*-клітини) (А) та ентеробластах (*suh*-клітини) (Б). Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення (*esc<sup>ts</sup>>+*, *suh<sup>ts</sup>>+*).

Наявні літературні дані та отримані нами результати дозволяють припустити існування щонайменше кількох механізмів, відповідальних за збереження тканинного гомеостазу кишківника дрозофіли. Ключовим аспектом нашого дослідження є виявлена роль транскрипційного фактору Мус у СКК та ЕБ плодової мушки у регуляції функціонування сигнальних шляхів, які залучені у проліферації та диференціації СКК. Назагал, активація

транскрипційного фактору Мус в ЕБ знижувала інтенсивність JAK/STAT, EGFR, інсулінового сигнальних шляхів та JNK у кишківнику *Drosophila* на рівні транскрипції генів їх основних компонентів.

### Висновки до розділу 5

1. Як інгібування, так і активація сигнальних шляхів TOR/IS та Мус не впливала на цілісність кишківника експериментальних мух.
2. Система сигнальних шляхів TOR/IS/Мус впливає на інтенсивність JAK/STAT, EGFR, JNK та інсулінового сигналінгу у клітинах кишківника плодової мушки на рівні регуляції транскрипції генів їх основних компонентів. Інгібування IS в ЕБ пригнічує активність JAK/STAT, через зниження відносної експресії *upd2*, *upd3* і *soc36*. Активація TOR та IS підвищує інтенсивність сигнальних шляхів JAK/STAT, EGFR, які, в свою чергу, активують процеси проліферації стовбурових клітин та диференціації ентеробластів, через підвищення рівня транскриптів генів *upd2*, *upd3*, *soc36*.
3. Надекспресія транскрипційного фактору Мус в ЕБ знижувала рівень транскрипції генів основних компонентів сигнальних шляхів JAK/STAT, EGFR, JNK та інсулінового сигнальних шляхів у кишківнику *Drosophila*.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

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).*

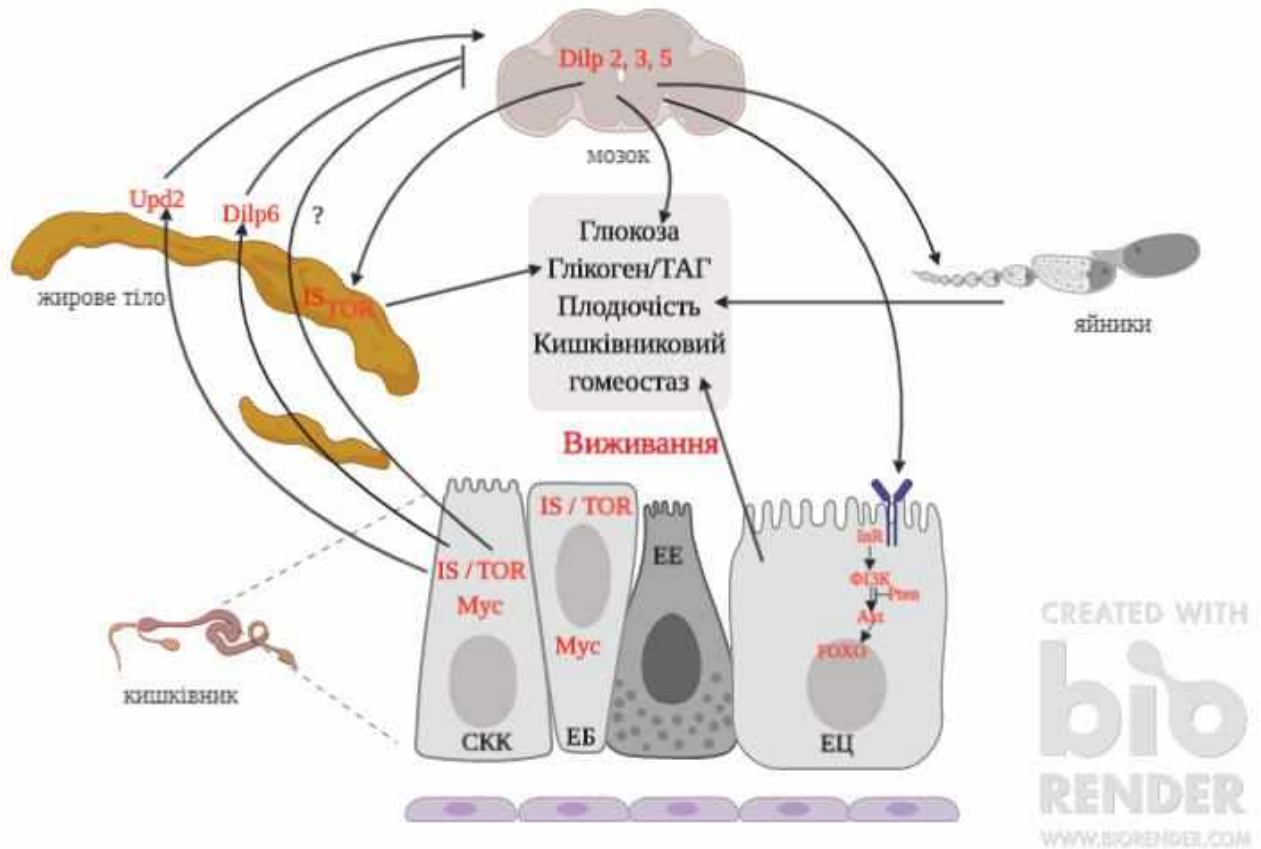
4. **Strilbytska O.M.**, Semaniuk U.V., Storey K.B., Yurkevych I.S., Lushchak O. Insulin signaling in intestinal stem and progenitor cells as an important determinant of physiological and metabolic traits in *Drosophila*. *Cells*, 2020; 9(4): 803. *(Частина експериментальної роботи, статистична обробка даних, написання рукопису та підготовка матеріалів до друку здійснені дисертанткою).*

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

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

Як у *Drosophila*, так і у вищих хребетних, існують регуляторні механізми, які забезпечують адаптацію до змін довкілля. Відносно проста та добре збалансована інтегральна система внутрішніх органів плодової мушки бере участь у контролі та підтриманні енергетичного гомеостазу (Рис. 5.10). Основний висновок нашої роботи – кишківник *Drosophila* важливий орган задіяний у регуляції фізіологічних та метаболічних процесів. Про зміну активності сигнальних шляхів TOR/IS/Мус, клітини кишківника сигналізують до жирового тіла, мозку та яйників. Так, активація IS в клітинах кишківника сприяє секреції цитокіну Upd2 з жирового тіла комахи, який через рецептор Dome активує JAK/STAT у нейронах у ЦНС та інгібує продукування  $\gamma$ -амінобутиратної кислоти GABA (Gamma-aminobutyric acid) [173]. Далі, GABA контролює секрецію DILP2, 3, 5 інсулін-продукуючими клітинами [51]. Відомо, що модуляція активності цілої системи TOR/IS/Мус впливає на секрецію DILP6 клітинами жирового тіла *Drosophila*, який, в свою чергу, регулює рівень ТАГ та виживання. Надекспресія DILP6 у жировому тілі знижує експресію генів *dilp2*, 3, 5 у мозку комахи [6]. DILP2, 3, 5 регулюють багато фізіологічних процесів таких, як спожитої їжі, плодючість, глікемію та виживання організму за умов недоїдання або голодування. Окрім того, DILP2, 3, 5 впливають на активність TOR/IS/Мус у жировому тілі, які контролюють процеси відкладання глікогену та ТАГ у жировому тілі. Цікаво, що DILP взаємодіючи з InR ентероцитів, регулюють рівень проліферації СКК за участі інсулінового сигнального шляху.

Також DILP у взаємодії з АКГ, через транскрипційний фактор FOXO регулюють рівень транскриптів генів *tobi*, *bmm*, *4ebp*, *perck*, які залучені в регуляції вуглеводного та ліпідного обмінів.



**Рисунок 5.10.** Механізми регуляції фізіологічних та метаболічних процесів за умов модуляції TOR/IS/Мус у СКК та ЕБ.

Результати роботи вказують не те, що регуляція кожного фізіологічного чи метаболічного показника реалізується не якимось одним геном чи чинником, а їх сукупністю та взаємодією. Для прикладу, за регуляцію стійкості до стресів відповідає 4EBP [210], DILP6 [6], JNK [146]. Харчова поведінка та плодючість регулюються DILP2, 3, 5, і 6 [6], “sex peptide” [8] та власне активністю TOR та IS [197]. Встановлено, що рівень транскрипції генів системи *dilp-akh* залежить від інтенсивності сигнальних шляхів TOR/IS/Мус у СКК та ЕБ. Також взаємодії представлені на рисунку 5.10 наводять на висновок про те, що модуляція сигнальних шляхів TOR/IS та Мус тільки у СКК та ЕБ призводить до змін активності даної системи у клітинах жирового тіла, диференційованих клітинах

кишківника та яйників. Зміна активності сигнальних шляхів TOR/IS та Muc у клітинах всього тіла дрозофіли, як відомо, впливає на виживання організму. Однак, тривалість життя – це комплексний показник, який регулюється не тільки активністю сигнальних шляхів, а й залежить від цілої низки показників як на рівні експресії генів, функціонування білків, перебігу метаболічних процесів, так і на рівні збереження гомеостазу кишківника.

Вивчення взаємозв'язку між активністю TOR/IS та Muc у СКК та ЕБ та виживанням *Drosophila* показало, що як активація, так і інгібування сигнальних шляхів призводило до скорочення тривалості життя та зниження стійкості до менадіону та голодування. Дані ефекти, ймовірно, пов'язані з порушенням гомеостазу кишківника. Ми також припустили, що порушення гомеостазу кишківника може проявлятися у втраті цілісності кишківника. Однак аналіз “Смурф” не виявив статистичної відмінності даного показника між дослідними та контрольними групами мух. Тому, про стан гомеостазу кишківника ми можемо робити висновки аналізуючи дані рівня мРНК генів, які кодують компоненти JAK/STAT (*upd2*, *upd3*, *soc36*), EGFR (*spi*, *krm*, *vn*), IS (*dilp3*) та MAPK (*pus*) і, таким чином, регулюють гомеостаз СКК та цілісність кишківника [92]. На рисунку 5.11 показано, як досліджувані показники змінювались у відповідь на активність TOR та IS у СКК та ЕБ. Ми припустили, що залежність тривалості та якості життя від активності сигнальних шляхів TOR/IS у СКК та ЕБ має дзвоноподібний характер. Аналіз отриманих результатів виявив спільні 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*. Про пошкодження клітин, та, як наслідок, виникнення внутрішнього стресу свідчить підвищена експресія гена *pus*. Також ми спостерігали зниження рівня мРНК генів, які кодують компоненти 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 та порушенням гомеостазу кишківника. 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, порушенням гомеостазу кишківника та скороченням тривалості життя.



**Рисунок 5.11.** Фізіологічні та метаболічні ефекти залежно від інгібування/активації TOR/IS/Мус у СКК та ЕБ.

Аналіз літературних джерел чітко вказує на те, що інгібування сигнального шляху TOR [98; 159] та IS [159] продовжує тривалість життя у багатьох модельних організмів. Відповідно до запропонованої моделі (Рис. 5.11), оптимальний рівень інгібування сигнального шляху TOR та IS у СКК та ЕБ, ймовірно, призводитиме до покращення процесів самооновлення СКК,

кишківникового гомеостазу під час старіння, корисних змін в обміні речовин і, як наслідок, продовження тривалості та якості життя.

Таким чином, подальші дослідження в даній області дозволять виявити оптимальний рівень інгібування сигнальної системи TOR/IS/Myc у різних популяціях СКК *Drosophila*, що, ймовірно, сприятливо впливатиме на стан здоров'я цілого організму. Навіть більше, ми припускаємо, що активація TOR/IS/Myc під час старіння *Drosophila*, яке основним чином характеризується втратою здатності СКК до поділу, також буде мати позитивний вплив на фізіологічні та метаболічні параметри. Оскільки існує високий ступінь гомології між генами, сигнальними шляхами та механізмами збереження кишківникового гомеостазу між *Drosophila* і ссавцями, більш детальне дослідження може допомогти розробити терапії стовбурових клітин різноманітних клінічних проявів у людей.

## ВИСНОВКИ

Представлені результати дозволяють сформулювати фундаментальне уявлення про особливості регуляції метаболізму, стійкості до стресів, плодючості, споживання їжі та тривалості життя шляхом інгібування/активації сигнальних шляхів TOR/IS та Мус 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/Мус, гомеостазом у кишківнику та тривалістю та якістю життя показало, що:

1. Інгібування/активація TOR, IS та коекспресія *mus* 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 мух. Активація сигнального шляху TOR підвищує стійкість до нестачі поживних речовин. Також зниження доступності харчових компонентів продовжує тривалість життя мух із інгібуванням 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. Зміни у вмісті основних метаболітів у тілі та гемолімфі експериментальних мух пов'язані із змінами рівня відносної експресії генів DILP-AKH системи.

5. Інгібування/активація сигнальних шляхів TOR/IS та Мус не впливає на цілісність кишківника мух, однак впливає на рівень мРНК генів клітин кишківника, які кодуєть 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 використаних джерел

1. Amcheslavsky A, Ito N, Jiang J, Ip YT. Tuberosus sclerosis complex and Myc coordinate the growth and division of *Drosophila* intestinal stem cells. *The Journal of Cell Biology*. 2011; 193(4): 695-710.
2. Amcheslavsky A, Jiang J, Ip YT. Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell*. 2009; 4(1): 49-61.
3. Amcheslavsky A, Song W, Li Q, Nie Y, Bragatto I, Ferrandon D, Perrimon N, Ip YT. Enteroendocrine cells support intestinal stem-cell-mediated homeostasis in *Drosophila*. *Cell Reports*. 2014; 9(1): 32-39.
4. Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, Ortiz-Vega S, Yonezawa K. Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene*. 2006; 25: 6361-6372.
5. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003; 67(4): 657-685.
6. Bai H, Kang P, Tatar M. *Drosophila* insulin-like peptide-6 (dilp6) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell*. 2012; 11(6): 978-85.
7. Baker KD, Thummel C S. Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell Metabolism*. 2007; 6(4): 257-266.
8. Barnes AI, Wigby S, Boone JM, Partridge L, Chapman T. Feeding, fecundity and lifespan in female *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2008; 275(1643): 1675-1683.
9. Barthel A, Schmoll D, Kruger KD, Bahrenberg G, Walther R, Roth RA, Joost HG. Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001; 285: 897-902.

10. Beebe K, Lee W, Micchelli CA. JAK/STAT signaling coordinates stem cell proliferation and multilineage differentiation in the *Drosophila* intestinal stem cell lineage. *Developmental Biology*. 2010; 338: 28-37.
11. Bellosta P, Hulf T, Balla Diop S, Usseglio F, Pradel J, Aragnol D, Gallant P. Myc interacts genetically with Tip48/Reptin and Tip49/Pontin to control growth and proliferation during *Drosophila* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2005; 102(33): 11799-11804.
12. Bellosta P, Gallant P. Myc Function in *Drosophila*. *Genes Cancer*. 2010; 1(6): 542-546.
13. Benassayag C, Montero L, Colombié N, Gallant P, Cribbs D, Morello D. Human c-Myc isoforms differentially regulate cell growth and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25(22): 9897-9909.
14. Bernal A, Kimbrell DA. *Drosophila* Thor participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97: 6019-6024.
15. Biteau B, Karpac J, Supoyo S, Degennaro M, Lehmann R, Jasper H. Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLOS Genetics*. 2010; 6(10): e1001159.
16. Biteau B, Jasper H. EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development*. 2011; 138(6): 1045-1055.
17. Biteau B. Aging of intestinal stem cells in *Drosophila melanogaster*. *Stem Cell Aging: Mechanisms, Consequences, Rejuvenation*. 2015.
18. Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metabolism*. 2010; 11(1): 35-46.
19. Blüher M, Kahn BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*. 2003; 299(5606): 572-574.
20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.

21. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993; 118(2): 401-415.
22. Britton JS, Edgar BA. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development*. 1998; 125: 2149-2158.
23. Britton JS, Lockwood WK, Li L, Cohen SM, Edgar BA. *Drosophila's* insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Developmental Cell*. 2002; 2(2): 239-249.
24. Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology*. 2001; 11(4): 213-321.
25. Broughton SJ, Piper MD, Ikeya T, Bass TM, Jacobson J, Drieger Y, Martinez P, Hafen E, Withers DJ, Leivers SJ, Partridge L. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2005; 102(8): 3105-3110.
26. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Development*. 2004; 18: 2893-2904.
27. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999; 96(6): 857-868.
28. Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence Jr JC, Abraham RT. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*. 1997; 277: 99-101.
29. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1998; 95: 1432-1437.

30. Buch S, Melcher C, Bauer M, Katzenberger J, Pankratz MJ. Opposing effects of dietary protein and sugar regulate a transcriptional target of *Drosophila* insulin-like peptide signaling. *Cell Metabolism*. 2008; 7(4): 321-332.
31. Buchon N, Broderick NA, Kuraishi T, Lemaitre B. *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biology*. 2010; 8: 152.
32. Caron A, Richard D, Laplante M. The roles of mTOR complexes in lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 2015; 35: 321-348.
33. Carvalho GB, Kapahi P, Anderson DJ, Benzer S. Allocrine modulation of feeding behaviour by the sex peptide of *Drosophila*. *Current Biology*. 2006; 16: 692-696.
34. Casali A, Batlle E. Intestinal stem cells in mammals and *Drosophila*. *Cell Stem Cell*. 2009; 4(2): 124-127.
35. Cerletti M, Jang YC, Finley LW, Haigis MC, Wagers AJ. Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function. *Cell Stem Cell*. 2012; 10: 515-519.
36. Chen C, Jack J, Garofalo RS. The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology*. 1996; 137: 846-856.
37. Choi NH, Lucchetta E, Ohlstein B. Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2011; 108(46): 18702-18707.
38. Choudhury AR, Ju Z, Djojotubroto MW, Schienke A, Lechel A, Schaetzlein S, Jiang H, Stepczynska A, Wang C, Buer J, Lee HW, von Zglinicki T, Ganser A, Schirmacher P, Nakauchi H, Rudolph KL. *Cdkn1a* deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nature Genetics*. 2007; 39(1): 99-105.
39. Chuang YY, Chen Y, Gadisetti, Chandramouli VR, Cook JA, Coffin D, Tsai MH, DeGraff W, Yan H, Zhao S, Russo A, Liu ET, Mitchell JB. Gene expression after treatment with hydrogen peroxide, menadione, or t-butyl hydroperoxide in breast cancer cells. *Cancer Research*. 2002; 62(21): 6246-6254.



40. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science*. 2001; 292(5514): 104-106.
41. Clark RI, Tan SW, Péan CB, Roostalu U, Vivancos V, Bronda K, Pilátová M, Fu J, Walker DW, Berdeaux R, Geissmann F, Dionne MS. MEF2 is an in vivo immune-metabolic switch. *Cell*. 2013; 155(2): 435-447.
42. Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2000; 97(7): 3260-3265.
43. Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J, Léopold P. A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell*. 2003; 114(6): 739-749.
44. Corl AB, Rodan AR, Heberlein U. Insulin signaling in the nervous system regulates ethanol intoxication in *Drosophila melanogaster*. *Nature Neuroscience*. 2005; 8(1): 18-19.
45. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*. 2006; 312(5775): 927-930.
46. Dan HC, Sun M, Yang L, Feldman RI, Sui XM, Ou CC, Nellist M, Yeung RS, Halley DJ, Nicosia SV, Pledger WJ, Cheng JQ. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 35364-35370.
47. Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science*. 2001; 294(5544): 1102-1105.
48. DePinho RA, Schreiber-Agus N, Alt F. W. myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Advances in Cancer Research*. 1991; 57: 1-46.
49. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science*. 2003; 116: 1175-1186.

50. Edgar BA. How flies get their size: genetics meets physiology. *Nature Reviews Genetics*. 2006; 7: 907-916.
51. Enell LE, Kapan N, Söderberg JA, Kahsai L, Nässel DR. Insulin signaling, lifespan and stress resistance are modulated by metabotropic GABA receptors on insulin producing cells in the brain of *Drosophila*. *PLoS One*. 2010; 5(12): e15780.
52. Erion R, Sehgal A. Regulation of insect behavior via the insulin-signaling pathway. *Frontiers in Physiology*. 2013; 4: 353.
53. Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*. 2001; 292(5515): 288-290.
54. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102: 8204-8209.
55. Fernandez R, Tabarini D, Azpiazu N, Frasch M, Schlessinger J. The *Drosophila* insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. *EMBO J*. 1995; 14(14): 3373-3384.
56. Foronda D, Weng R, Verma P, Chen YW, Cohen SM. Coordination of insulin and Notch pathway activities by microRNA miR-305 mediates adaptive homeostasis in the intestinal stem cells of the *Drosophila* gut. *Genes & Development*. 2014; 28(21): 2421-2431.
57. Galletti M, Riccardo S, Parisi F, Lora C, Saqcena MK, Rivas L, Wong B, Serra A, Serras F, Grifoni D, Pelicci P, Jiang J, Bellosta P. Identification of domains responsible for ubiquitin-dependent degradation of dMyc by glycogen synthase kinase 3beta and casein kinase 1 kinases. *Molecular and Cellular Biology*. 2009; 29(12): 3424-3434.
58. Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D. Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nature Cell Biology*. 2002; 4: 699-704.
59. Gao X, Pan D. TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes & Development*. 2001; 15: 1383-1392.

60. Gao X, Neufeld TP, Pan D. *Drosophila* PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Developmental Biology*. 2000; 221(2): 404-418.
61. Gallant P, Shio Y, Cheng PF, Parkhurst SM, Eisenman RN. Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science*. 1996; 274(5292): 1523-1527.
62. Gallant P. Myc function in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013; 3(10): a014324.
63. Gartner LP. The fine structural morphology of the midgut of adult *Drosophila*: a morphometric analysis. *Tissue Cell*. 1985; 17: 883-888.
64. Géminard C, Arquier N, Layalle S, Bourouis M, Slaidina M, Delanoue R, Bjordal M, Ohanna M, Ma M, Colombani J, Léopold P. Control of metabolism and growth through insulin-like peptides in *Drosophila*. *Diabetes*. 2006; 55(2): 5-8.
65. Gerozissis K. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2003; 23(1): 1-25.
66. Giannakou ME, Partridge L. Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007; 32(4): 180-188.
67. Giannakou ME, Goss M, Jünger MA, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science*. 2004; 305(5682): 361.
68. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*. 2007; 12(2): 108-113.
69. Grewal SS, Li L, Orian A, Eisenman RN, Edgar BA. Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nature Cell Biology*. 2005; 7(3): 295-302.
70. Grönke S, Mildner A, Fellert S, Tennagels N, Petry S, Müller G, Jäckle H, Kühnlein RP. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metabolism*. 2005; 1(5): 323-330.

71. Grönke S, Müller G, Hirsch J, Fellert S, Andreou A, Haase T, Jäckle H, Kühnlein RP. Dual lipolytic control of body fat storage and mobilization in *Drosophila*. PLoS Biology. 2007; 5(6): e137.
72. Grönke S, Clarke DF, Broughton S, Andrews TD, Partridge L. Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. PLOS Genetics. 2010; 6(2): e1000857.
73. Haghighat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: Competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. EMBO J. 1995; 14: 5701-5709.
74. Haller S, Kapuria S, Riley RR, O'Leary MN, Schreiber KH, Andersen JK, Melov S, Que J, Rando TA, Rock J, Kennedy BK, Rodgers JT, Jasper H. mTORC1 activation during repeated regeneration impairs somatic stem cell maintenance. Cell Stem Cell. 2017; 21(6): 806-818.
75. Hansen M, Chandra A, Mitic LL, Onken B, Driscoll M, Kenyon C. A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. PLoS Genetics. 2008; 4: 24.
76. Hanson RW, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. Annual Review of Biochemistry. 1997; 66: 581-611.
77. Haruta T, Uno T, Kawahara J, Takano A, Egawa K, Sharma PM, Olefsky JM, Kobayashi M. A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. Molecular Endocrinology. 2000; 14(6): 783-794.
78. Hay N. Interplay between FOXO, TOR, and Akt. Biochim Biophys Acta. 2011; 1813(11): 1965-1970.
79. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nature. 2003; 421(6919): 182-187.
80. Hsu HJ, Drummond-Barbosa D. Insulin levels control female germline stem cell maintenance via the niche in *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2009; 106(4): 1117-1121.

81. Hulf T, Bellosta P, Furrer M, Steiger D, Svensson D, Barbour A, Gallant P. Whole-genome analysis reveals a strong positional bias of conserved dMyc-dependent E-boxes. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25(9): 3401-3410.
82. Hwangbo DS, Gershman B, Tu MP, Palmer M, Tatar M. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*. 2004; 429(6991): 562-566.
83. Ikeya T, Galic M, Belawat P, Nairz K, Hafen E. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Current Biology*. 2002; 12(15): 1293-300.
84. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*. 2002; 4: 648-657.
85. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003; 115: 577-590.
86. Iritani BM, Eisenman RN. c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1999; 96(23): 13180-13185.
87. Ja WW, Carvalho GB, Mak EM, de la Rosa NN, Fang AY, Liong JC, Brummel T, Benzer S. Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007; 104(20): 8253-82536.
88. Jaeschke A, Hartkamp J, Saitoh M, Roworth W, Nobukuni T, Hodges A, Sampson J, Thomas G, Lamb R. Tuberous sclerosis complex tumor suppressor-mediated S6 kinase inhibition by phosphatidylinositide-3-OH kinase is mTOR independent. *The Journal of Cell Biology*. 2002; 159(2): 217-224.
89. Jacinto E, Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003; 4(2): 117-126.
90. Jasper H, Jones DL. Metabolic regulation of stem cell behavior and implications for aging. *Cell Metabolism*. 2010; 12(6): 561-565.
91. Jiang H, Edgar BA. EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development*. 2009; 136: 483-493.

92. Jiang H, Patel PH, Kohlmaier A, Grenley MO, McEwen DG, Edgar BA. Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell*. 2009; 137: 1343-1355.
93. Jiang H, Bower KE, Beuscher AE, Zhou B, Bobkov AA, Olson AJ, Vogt PK. Stabilizers of the Max homodimer identified in virtual ligand screening inhibit Myc function. *Molecular Pharmacology*. 2009; 76(3): 491-502.
94. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell*. 2009; 20: 1992-2003.
95. Jünger MA, Rintelen F, Stocker H, Wasserman JD, Vegh M, Radimerski T, Greenberg ME, Hafen E. The *Drosophila* Forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *Journal of Biology*. 2003; 2: 20.
96. Kannan K, Fridell YW. Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. *Frontiers in Physiology*. 2013; 16: 288.
97. Karpac J, Younger A, Jasper H. Dynamic coordination of innate immune signaling and insulin signaling regulates systemic responses to localized DNA damage. *Developmental Cell*. 2011; 20(6): 841-854.
98. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current Biology*. 2004; 14: 885-890.
99. Kapahi P, Chen D, Rogers AN, Katewa SD, Li PW, Thomas EL, Kockel L. With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient sensing TOR pathway in aging. *Cell Metabolism*. 2010; 11: 453-465.
100. Kapuria S, Karpac J, Biteau B, Hwangbo D, Jasper H. Notch-mediated suppression of TSC2 expression regulates cell differentiation in the *Drosophila* intestinal stem cell lineage. *PLOS Genetics*. 2012; 8(11): e1003045.
101. Katewa SD, Demontis F, Kolipinski M, Hubbard A, Gill MS, Perrimon N, Melov S, Kapahi P. Intramyocellular fatty-acid metabolism plays a critical role in

mediating responses to dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. *Cell Metabolism*. 2012; 16(1): 97-103.

102. Kennedy BK, Lamming DW. The mechanistic target of rapamycin: the grand conductor of metabolism and aging. *Cell Metabolism*. 2016; 23(6): 990-1003.

103. Kim J, Guan KL. Regulation of the autophagy initiating kinase ULK1 by nutrients: roles of mTORC1 and AMPK. *Cell Cycle*. 2011; 10(9): 1337-1338.

104. Kim J, Neufeld TP. Dietary sugar promotes systemic TOR activation in *Drosophila* through AKH-dependent selective secretion of Dilp3. *Nature Communications*. 2015; 6: 6846.

105. Kim D, Rossi J. RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*. 2008; 44(5): 613-616.

106. Kim SK, Rulifson EJ. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells. *Nature*. 2004; 431(7006): 316-320.

107. Kim MS, Pak YK, Jang PG, Namkoong C, Choi YS, Won JC, Kim KS, Kim SW, Kim HS, Park JY, Kim YB, Lee KU. Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Nature Neuroscience*. 2006; 9(7): 901-906.

108. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 2002; 419(6904): 316-321.

109. Kuo Y, Huang H, Cai T, Wang T. Target of Rapamycin Complex 2 regulates cell growth via Myc in *Drosophila*. *Scientific Reports*. 2015; 5: 10339.

110. Kux K, Pitsouli C. Tissue communication in regenerative inflammatory signaling: lessons from the fly gut. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2014; 4: 49.

111. Lambertsson A. The minute genes in *Drosophila* and their molecular functions. *Advances in Genetics*. 1998; 38: 69-134.

112. Laplante M, Sabatini DM. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Current Biology*. 2009; 19: 1046-1052.

113. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012; 149: 274-293.
114. Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP. Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2000; 15: 99-108.
115. Lee G, Park JH. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2004; 167(1): 311-323.
116. Lemaitre B, Miguel-Aliaga I. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Genetics*. 2013; 47: 377-404.
117. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*. 2004; 6: 463-477.
118. Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim JW, Yustein JT, Lee LA, Dang CV. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25: 6225-6234.
119. Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2010; 107: 3441-3446.
120. Li L, Edgar BA, Grewal SS. Nutritional control of gene expression in *Drosophila* larvae via TOR, Myc and a novel cis-regulatory element. *BMC Cell Biology*. 2010; 11: 7.
121. Lin G, Xu N, Xi R. Paracrine Wntless signalling controls self-renewal of *Drosophila* intestinal stem cells. *Nature*. 2008; 455: 1119-1123.
122. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current Biology*. 2005; 15: 702-713.
123. Lucchetta EM, Ohlstein B. The *Drosophila* midgut: a model for stem cell driven tissue regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2012; 1(5): 781-788.



124. Lushchak OV, Carlsson MA, Nässel DR. Food odors trigger an endocrine response that affects food ingestion and metabolism. *Cell Mol. Life Sci.* 2015; 72: 3143-3155.
125. Lushchak OV, Gospodaryov DV, Rovenko BM, Glovyak AD, Yurkevych IS, Klyuba VP, Shcherbij MV, Lushchak VI. Balance between macronutrients affects life span and functional senescence in fruit fly *Drosophila melanogaster*. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences.* 2012; 67(2): 118-125.
126. Lushchak OV, Gospodaryov DV, Rovenko BM, Yurkevych IS, Perkhulyan NV, Lushchak VI. Specific dietary carbohydrates differentially influence the life span and fecundity of *Drosophila melanogaster*. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences.* 2014; 69(1): 3-12.
127. Lushchak O, Strilbytska OM, Yurkevych I, Vaiserman AM, Storey KB. Implications of amino acid sensing and dietary protein to the aging process. *Experimental Gerontology.* 2019; 115: 69-78.
128. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2009; 10(5): 307-318.
129. Mair W, McLeod CJ, Wang L, Jones DL. Dietary restriction enhances germline stem cell maintenance. *Aging Cell.* 2010; 9: 916-918.
130. Mayntz D, Raubenheimer D, Salomon M, Toft S, Simpson SJ. Nutrient-specific foraging in invertebrate predators. *Science.* 2005; 307(5706): 111-113.
131. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular Cell.* 2002; 10: 151-162.
132. Markaki M, Tavernarakis N. Metabolic control by TOR and autophagy during ageing. *Gerontology.* 2013; 59: 340-348.
133. Martín-Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, Tolkovsky AM, Martinez-Arias A. puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes & Development.* 1998; 12(4): 557-570.

134. Mattila J, Hietakangas V. Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2017; 207(4): 1231-1253.
135. Mavrakis KJ, Zhu H, Silva RL, Mills JR, Teruya-Feldstein J, Lowe SW, Tam W, Pelletier J, Wendel HG. Tumorigenic activity and therapeutic inhibition of Rheb GTPase. *Genes & Development*. 2008; 22(16): 2178-2188.
136. McLeod CJ, Wang L, Wong C, Jones DL. Stem cell dynamics in response to nutrient availability. *Current Biology*. 2010; 20: 2100-2105.
137. McNeill H, Craig GM, Bateman JM. Regulation of neurogenesis and epidermal growth factor receptor signaling by the insulin receptor/target of rapamycin pathway in *Drosophila*. *Genetics*. 2008; 179(2): 843-853.
138. Meyuhas O, Dreazen A. Ribosomal protein S6 kinase: from TOP mRNAs to cell size. *Progress in molecular biology and translational science*. 2009; 90: 109-153.
139. Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*. 2000; 404(6779): 782-787.
140. Medvedik O, Lamming DW, Kim KD, Sinclair DA. MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Biology*. 2007; 5(10): e261.
141. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer*. 2008; 8: 976-990.
142. Micchelli CA, Perrimon N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature*. 2006; 439: 475-479.
143. Miguel-Aliaga I, Jasper H, Lemaitre B. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2018; 210(2): 357-396.
144. Miron M, Verdu J, Lachance PE, Birnbaum MJ, Lasko PF, Sonenberg N. The translational inhibitor 4EBP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nature Cell Biology*. 2001; 3: 596-601.
145. Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G. *Drosophila* S6 kinase: A regulator of cell size. *Science*. 1999; 285: 2126-2129.

146. Mundorf J, Donohoe CD, McClure CD, Southall TD, Uhlirova M. Ets21c governs tissue renewal, stress tolerance, and aging in the *Drosophila* intestine. *Cell Reports*. 2019; 27(10): 3019-3033.
147. Nakagoshi H. Functional specification in the *Drosophila* endoderm. *Development Growth & Differentiation*. 2005; 47: 383-92.
148. Nässel DR, Winther AM. *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in Neurobiology*. 2010; 92(1): 42-104.
149. Nässel DR, Pauls D, Huetteroth W. Neuropeptides in modulation of *Drosophila* behavior: how to get a grip on their pleiotropic actions. *Current Opinion in Insect Science*. 2019; 36: 1-8.
150. Nelson DW, Padgett RW. Insulin worms its way into the spotlight. *Genes & Development*. 2003; 17(7): 813-818.
151. Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*. 1999; 18(19): 3004-3016.
152. O'Brien RM, Granner DK. Regulation of gene expression by insulin. *Biochemical Journal*. 1991; 278: 609-619.
153. O'Brien LE, Soliman SS, Li X, Bilder D. Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell*. 2011; 147: 603-614.
154. Ohlstein B, Spradling A. Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science*. 2007; 315: 988-992.
155. Okamura T, Shimizu H, Nagao T, Ueda R, Ishii S. ATF-2 regulates fat metabolism in *Drosophila*. *Molecular Biology of the Cell*. 2007; 18(4): 1519-1529.
156. Palanker L, Tennessen JM, Lam G, Thummel CS. *Drosophila* HNF4 regulates lipid mobilization and beta-oxidation. *Cell Metabolism*. 2009; 9(3): 228-239.
157. Parisi F, Riccardo S, Daniel M, Saqcena M, Kundu N, Pession A, Grifoni D, Stocker H, Tabak E, Bellosta P. *Drosophila* insulin and target of rapamycin (TOR) pathways regulate GSK3 beta activity to control Myc stability and determine Myc expression in vivo. *BMC Biology*. 2011; 9: 65.

158. Park MS, Takeda M. Starvation suppresses cell proliferation that rebounds after refeeding in the midgut of the *American cockroach*, *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Physiology*. 2008; 54(2): 386-392.
159. Partridge L, Alic N, Bjedov I, Piper MD. Ageing in *Drosophila*: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network. *Experimental Gerontology*. 2011; 46(5): 376-381.
160. Patel PH, Tamanoi F. Increased Rheb-TOR signaling enhances sensitivity of the whole organism to oxidative stress. *Journal of Cell Science*. 2006; 119: 4285-4292.
161. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009; 137: 873-886.
162. Piper MD, Partridge L. Dietary restriction in *Drosophila*: delayed aging or experimental artefact? *PLOS Genetics*. 2007; 3(4): e57.
163. Pierce SB, Yost C, Britton JS, Loo LW, Flynn EM, Edgar BA, Eisenman RN. dMyc is required for larval growth and endoreplication in *Drosophila*. *Development*. 2004; 131(10): 2317-2327.
164. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metabolism*. 2008; 8(3): 224-236.
165. Post S, Karashchuk G, Wade JD, Sajid W, De Meyts P, Tatar M. *Drosophila* insulin-like peptides DILP2 and DILP5 differentially stimulate cell signaling and glycogen phosphorylase to regulate longevity. *Frontiers in Endocrinology*. 2018; 9: 245.
166. Potter CJ, Huang H, Xu T. *Drosophila* Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell*. 2001; 105: 357-368.
167. Powers RW, Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes & Development*. 2006; 20(2): 174-184.

168. Prentki M, Matschinsky FM, Madiraju SR. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metabolism*. 2013; 18(2): 162-185.
169. Prochownik EV, Vogt PK. Therapeutic targeting of Myc. *Genes Cancer*. 2010; 1(6): 650-659.
170. Puig O, Tjian R. Nutrient availability and growth: regulation of insulin signaling by dFOXO/FOXO1. *Cell Cycle*. 2006; 5(5): 503-505.
171. Quinn PG, Yeagley D. Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. *Current Drug Targets. Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*. 2005; 5(4): 423-437.
172. Radimerski T, Montagne J, Hemmings-Mieszczak M, Thomas G. Lethality of *Drosophila* lacking TSC tumor suppressor function rescued by reducing dS6K signaling. *Genes & Development*. 2002; 16(20): 2627-2632.
173. Rajan A, Perrimon N. *Drosophila* cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion. *Cell*. 2012; 151(1): 123-137.
174. Ren F, Shi Q, Chen Y, Jiang A, Ip YT, Jiang H, Jiang J. *Drosophila* Myc integrates multiple signaling pathways to regulate intestinal stem cell proliferation during midgut regeneration. *Cell Research*. 2013; 23(9): 1133-1146.
175. Ren F, Wang B, Yue T, Yun E Y, Ip YT, Jiang J. Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107: 21064-21069.
176. Rera M, Clark RI, Walker DW. Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2012; 109(52): 21528-21533.
177. Ring JM, Martinez Arias A. puckered, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the *Drosophila* larva. *Developmental Suppl*. 1993; 251-259.
178. Riu E, Bosch F, Valera A. Prevention of diabetic alterations in transgenic mice overexpressing Myc in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996; 93(5): 2198-2202.

179. Rogina B, Helfand S L, Frankel S. Longevity regulation by *Drosophila* Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science*. 2002; 298(5599): 1745.
180. Rose MR, Vu LN, Park SU, Graves JL Jr. Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*. 1992; 27(2): 241-250.
181. Rose MR, Archer MA. Genetic analysis of mechanisms of aging. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1996; 6(3): 366-370.
182. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 2007; 447(7145): 725-729.
183. Roth SW, Bitterman MD, Birnbaum MJ, Bland ML. Innate immune signaling in *Drosophila* blocks insulin signaling by uncoupling PI(3,4,5)P3 production and Akt activation. *Cell Reports*. 2018; 22(10): 2550-2556.
184. Ruaud AF, Lam G, Thummel CS. The *Drosophila* NR4A nuclear receptor DHR38 regulates carbohydrate metabolism and glycogen storage. *Molecular Endocrinology*. 2011; 25(1): 83-91.
185. Rulifson EJ, Kim SK, Nusse R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science*. 2002; 296(5570): 1118-1120.
186. Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature*. 2010; 464(7288): 520-528.
187. Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nature Cell Biology*. 2003; 5: 566-571.
188. Sears RC, Nevins JR. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(14): 11617-11620.
189. Shamji AF, Nghiem P, Schreiber SL. Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Molecular Cell*. 2003; 12: 271-280.
190. Semaniuk UV, Gospodaryov DV, Feden'ko KM, Yurkevych IS, Vaiserman AM, Storey KB, Simpson SJ, Lushchak O. Insulin-like peptides regulate feeding preference and metabolism in *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*. 2018; 9: 1083.

191. Shaw RL, Kohlmaier A, Polesello C, Veelken C, Edgar BA, Tapon N. The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during *Drosophila* adult midgut regeneration. *Development*. 2010; 137: 4147-4158.
192. She P, Shiota M, Shelton KD, Chalkley R, Postic C, Magnuson MA. Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Molecular and Cellular Biology*. 2000; 20: 6508-6517.
193. Sheiness D, Bishop JM. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *Journal of Virology*. 1979; 31(2): 514-521.
194. Sheaffer KL, Updike DL, Mango SE. The Target of Rapamycin pathway antagonizes pha-4/FoxA to control development and aging. *Current Biology*. 2008; № 18(18): 1355-1364.
195. Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, Kozma SC. Disruption of the p70S6k/p85S6k gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J*. 1998; 17: 6649-6659.
196. Signer RA, Morrison SJ. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell*. 2013; 12(2): 152-165.
197. Smykal V, Raikhel AS. Nutritional control of insect reproduction. *Current Opinion in Insect Science*. 2015; 11: 31-38.
198. Soh JW, Hotic S, Arking R. Dietary restriction in *Drosophila* is dependent on mitochondrial efficiency and constrained by pre-existing extended longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2007; 128(11-12): 581-593.
199. Takahara T, Maeda T. Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Molecular Cell*. 2012; 47(2): 242-252.
200. Takashima S, Adams KL, Ortiz PA, Ying CT, Moridzadeh R, Younossi-Hartenstein A, Hartenstein V. Development of the *Drosophila* enteroendocrine lineage and its specification by the Notch signaling pathway. *Developmental Biology*. 2011; 353: 161-172.

201. Takashima S, Hartenstein V. Genetic control of intestinal stem cell specification and development: a comparative view. *Stem Cell Review*. 2012; 8: 597-608.
202. Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*. 2001; 292(5514): 107-110.
203. Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science*. 2003; 299(5611): 1346-1351.
204. Tatar M, Post S, Yu K. Nutrient control of *Drosophila* longevity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2014; 25: 509- 517.
205. Tapon N, Ito N, Dickson BJ, Treisman JE, Hariharan IK. The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell*. 2001; 105(3): 345-355.
206. Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99: 13571-13576.
207. Teleman AA, Chen YW, Cohen SM. 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes & Development*. 2005; 19(16): 1844-1888.
208. Teleman AA, Hietakangas V, Sayadian AC, Cohen SM. Nutritional control of protein biosynthetic capacity by insulin via Myc in *Drosophila*. *Cell Metabolism*. 2008; 7(1): 21-32.
209. Tennessen JM, Barry WE, Cox J, Thummel CS. Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods*. 2014; 68(1): 105-115.
210. Tettweiler G, Miron M, Jenkins M, Sonenberg N, Lasko PF. Starvation and oxidative stress resistance in *Drosophila* are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP. *Genes & Development*. 2005; 19(16): 1840-1843.



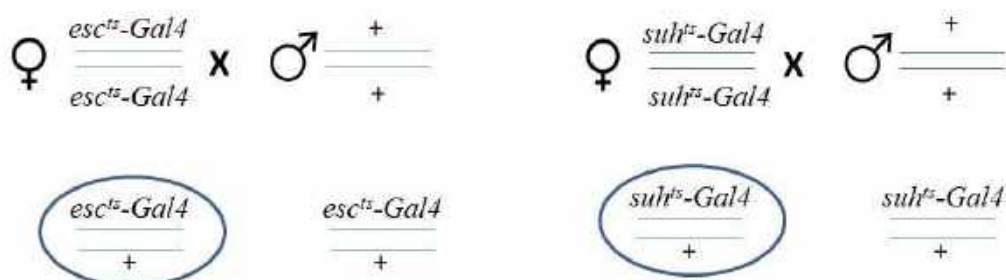
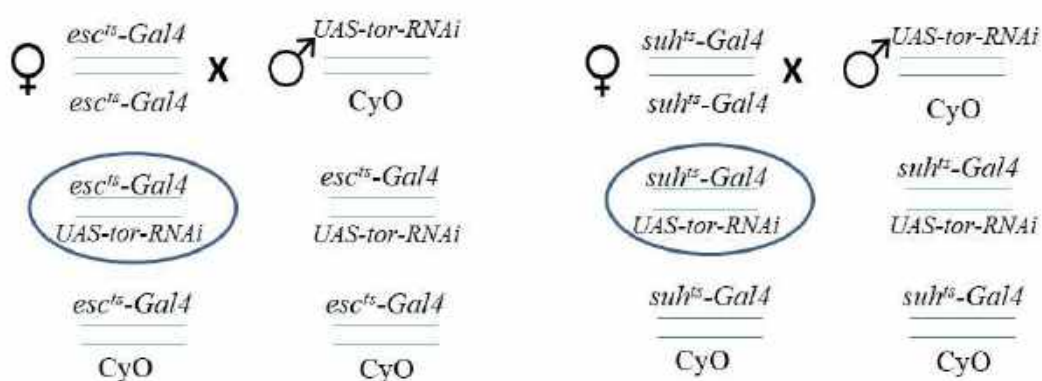
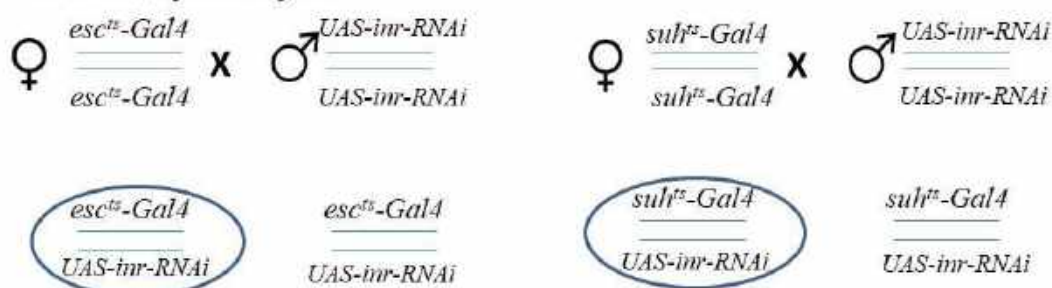
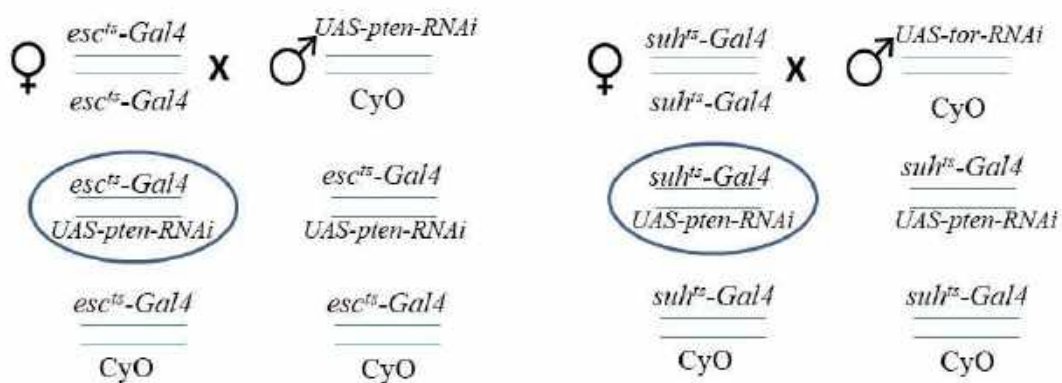
211. Trumpp A, Refaeli Y, Oskarsson T, Gasser S, Murphy M, Martin GR, Bishop JM. c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature*. 2001; 414(6865): 768-773.
212. Vargas MA, Luo N, Yamaguchi A, Kapahi P. A role for S6 kinase and serotonin in postmating dietary switch and balance of nutrients in *D. melanogaster*. *Current Biology*. 2010; 20(11): 1006-1011.
213. Veenstra JA, Agricola HJ, Sellami A. Regulatory peptides in fruit fly midgut. *Cell and Tissue Research*. 2008; 334(3): 499-516.
214. Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Muller F. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*. 2003; 426(6967): 620.
215. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2012; 12(10): 685-698.
216. Wang BT, Ducker GS, Barczak AJ, Barbeau R, Erle DJ, Shokat KM. The mammalian target of rapamycin regulates cholesterol biosynthetic gene expression and exhibits a rapamycin-resistant transcriptional profile. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2011; 108: 15201-15206.
217. Wang MM. Notch signaling and Notch signaling modifiers. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2011; 43(11): 1550-1562.
218. Wang L, Karpac J, Jasper H. Promoting longevity by maintaining metabolic and proliferative homeostasis. *Journal of Experimental Biology*. 2014; 217: 109-118.
219. Wang YH, Huang ML. Reduction of Lobe leads to TORC1 hypoactivation that induces ectopic Jak/STAT signaling to impair *Drosophila* eye development. *Mechanisms of Development*. 2009; 126(10): 781-790.
220. Williams KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat Neurosci*. 2012; 15(10): 1350-1355.
221. Wu Q, Zhao Z, Shen P. Regulation of aversion to noxious food by *Drosophila* neuropeptide Y- and insulin-like systems. *Nature Neuroscience*. 2005; 8: 1350-1355.
222. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006; 124: 471-484.

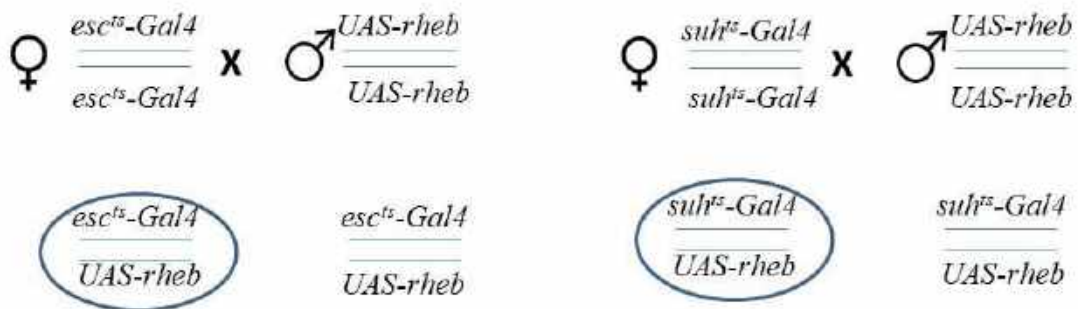
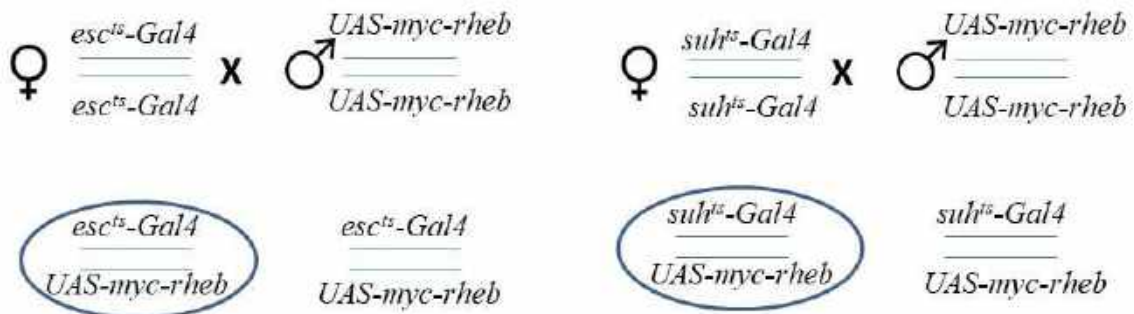
223. Xu N, Wang SQ, Tan D, Gao Y, Lin G, Xi R. EGFR, Wingless and JAK/STAT signaling cooperatively maintain *Drosophila* intestinal stem cells. *Developmental Biology*. 2011; 354(1): 31-43.
224. Yamagata K, Sanders LK, Kaufmann WE, Yee W, Barnes CA, Nathans D, Worley PF. Rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269: 16333-16339.
225. Yang J, Kalhan SC, Hanson RW. What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *The Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284(40): 27025-27029.
226. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular Cell*. 2010; 38: 768-774.
227. Zeng X, Han L, Singh SR, Liu H, Neumüller RA, Yan D, Hu Y, Liu Y, Liu W, Lin X, Hou SX. Genome-wide RNAi screen identifies networks involved in intestinal stem cell regulation in *Drosophila*. *Cell Reports*. 2015; 10(7): 1226-1238.
228. Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP. Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes & Development*. 2000; 14: 2712-2724.
229. Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nature Cell Biology*. 2003; 5: 578-581.
230. Zhang HH, Lipovsky AI, Dibble CC, Sahin M, Manning BD. S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. *Molecular Cell*. 2006; 24(2): 85-97.
231. Zinke I, Schütz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ. Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J*. 2002; 21(22): 6162-6173.

232. Zid BM, Rogers AN, Katewa SD, Vargas MA, Kolipinski MC, Lu TA, Benzer S, Kapahi P. 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*. *Cell*. 2009; 139: 149-160.

## ДОДАТОК 1

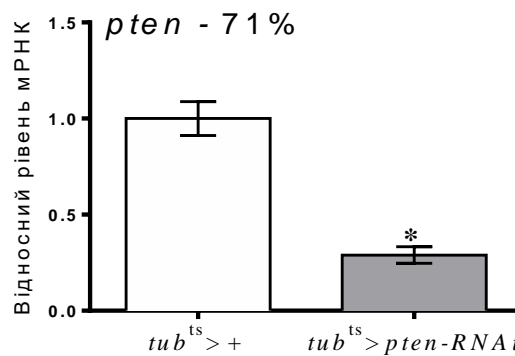
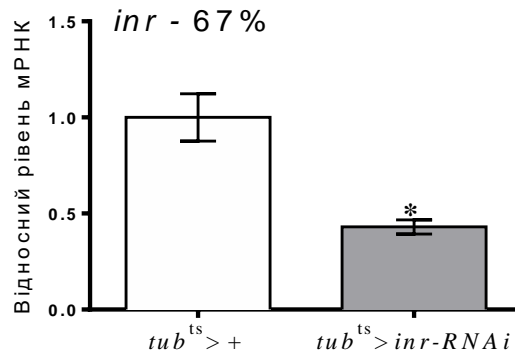
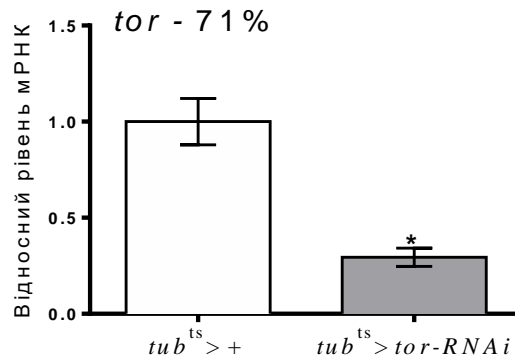
## 1. Контрольні особини

2. Нокдаун гену *tor*3. Нокдаун гену *inr*4. Нокдаун гену *pten*

5. Надекспресія *rheb*6. Надекспресія *myc-rheb*Схеми схрещувань ліній *D. melanogaster*

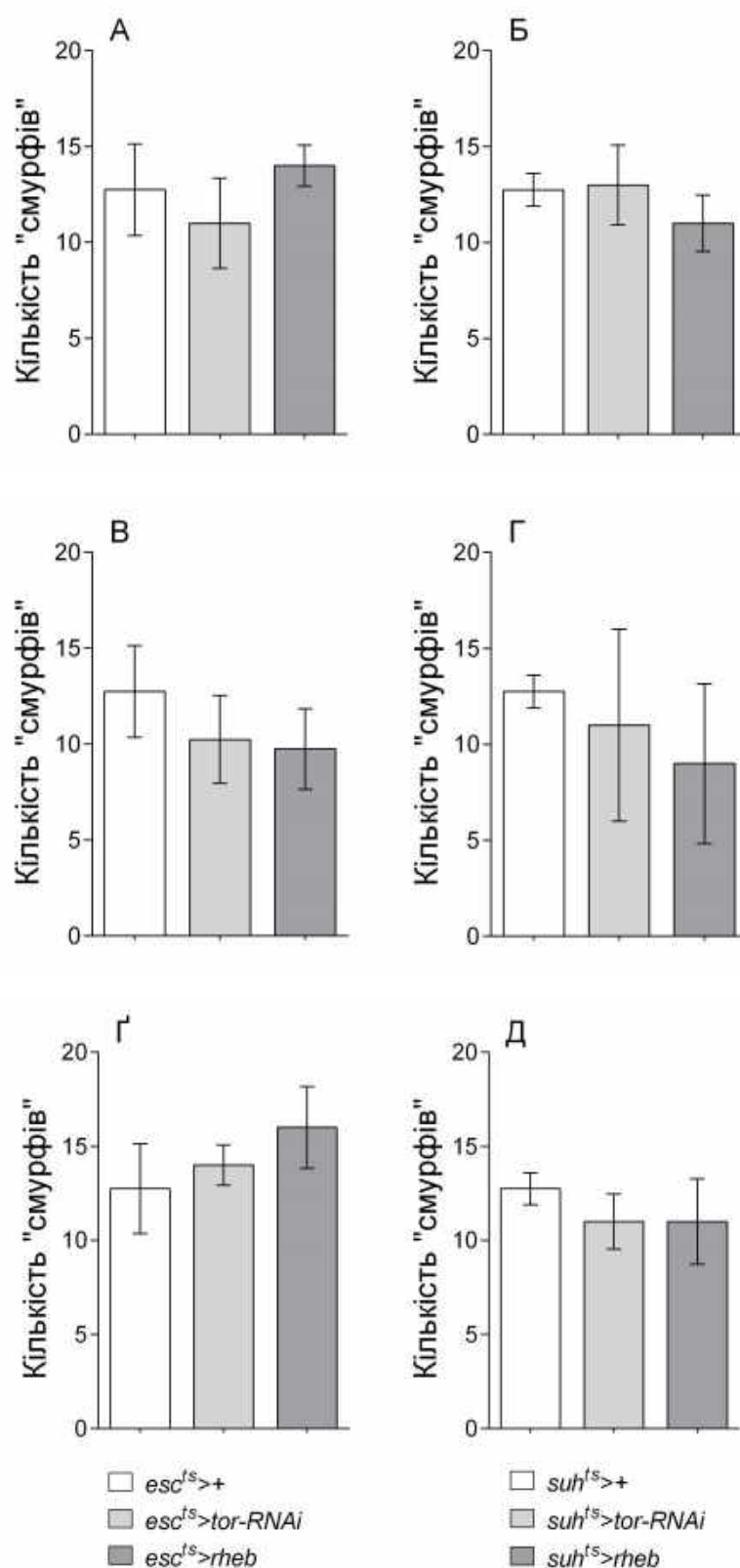
- *esc<sup>ts</sup>-Gal4* та *suh<sup>ts</sup>-Gal4* – драйвери, які зумовлюють надекспресію в тканинах тіла дрозофіли, де експресується гени *esc* та *suh* відповідно;
- *RNAi*- послідовність РНК інтерференції генів, призводить до нокдауну певного гена;
- СуО – балансер за другою хромосомою.

## ДОДАТОК 2



Відносний рівень мРНК генів *tor*, *inr*, *pten* у мух із нокдауном *tor*, *inr* та *pten* відповідно у всіх клітинах тіла *Drosophila*. Результати представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього,  $n=4$ . \*Вірогідно відмінне від контрольного значення ( $P<0,05$ , критерій Стюдента).

## ДОДАТОК 3



Виявлення цілісності кишківника у мух із модуляціями сигнальних шляхів TOR (А, Б), IS (В, Г) та Мус (Г, Д) в *esc*-клітинах та у *suh*-клітинах.