

ГОРЕНСКАЯ О. В.[✉], НАВРОЦКАЯ В. В.

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина,
Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: olgavg2014@gmail.com,
valeriya.navrotskaya@ukr.net

[✉] olgavg2014@gmail.com, (096) 971-83-99

АНАЛИЗ РОЛИ ТРИПТОФАН-КИНУРЕНИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В КОНТРОЛЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Цель. Анализ продолжительности жизни у мутантных линий дрозофилы с нарушением кинуренинового пути метаболизма триптофана.

Методы. Использовали линии дикого типа *Canton-S* и *Oregon*, линии с мутациями локуса *white*: *white*, *white^{apricot}*, *white^{satsuma}* и линию с мутацией *vermilion*. Определяли показатель средней продолжительности жизни имаго, анализировали кривые выживания имаго. **Результаты.** Показано, что средняя продолжительность жизни самок дрозофилы с мутантными аллелями гена *white* не отличается от линии дикого типа, у самцов линий *w(C-S)* и *w^a(C-S)* показатель увеличился. Присутствие в генотипе мутации *vermilion* также увеличивает среднюю продолжительность жизни имаго обоего пола, но у самцов увеличение выражено сильнее. **Выводы.** Результаты исследований позволяют предположить, что старение ассоциировано с регуляцией триптофан-кинуренинового метаболизма.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, длительность жизни, триптофан-кинурениновый путь метаболизма.

Поддержание высокого уровня трансляции, необходимое организму для энергетических и метаболических процессов, зависит от доступности питательных веществ. Однако показано, что снижение синтеза белка, например, во время диеты, увеличивает продолжительность жизни у многих эукариотических видов, что связано, очевидно, с активацией процессов репарации и комплексным ответом клетки на стресс. В условиях ограниченной диеты подавляется старение иммунной системы, которое определяется перестройкой паттерна экспрессии генов [1]. Кроме того, особенности диеты могут оказывать пролонгированный в поколениях эффект. Такой пример эпигенетического наследования был продемонстрирован у *C. elegans*: вызванное ограниченной диетой увеличение продолжительности жизни наблюдалось до трех

поколений нормально питающихся животных после голодания их предков [2].

Основными компонентами, вовлеченными в процесс увеличения длительности жизни при ограничении калорийности питания, являются сигнальные пути IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста 1); инсулиновый сигналинг, включающий протеинкиназу АКТ, mTOR и FOXO; метаболиты (глюкоза, липиды, аминокислоты); клеточные процессы, которым необходимы эти метаболиты, включающие синтез белка и производство АТФ. Однако недостаточно изученным является вклад отдельных аминокислот в контроль продолжительности жизни организмов. Так, показано, что ограничение метионина или триптофана в диете продлевает продолжительность жизни у высших эукариот [3], тогда как повышенные уровни пролина и триптофана увеличивают продолжительность жизни у *C. elegans* [4, 5].

Drosophila, как классический объект для генетических исследований, является подходящей моделью для изучения влияния триптофан-зависимого метаболизма на процессы, связанные со старением. Это обусловлено эволюционной консервативностью основных метаболических путей, в частности, триптофан-кинурениновый путь и основные гены, контролирующие его, были описаны и у дрозофилы [6]. Хорошая изученность этого объекта и наличие множества мутаций, нарушающих метаболизм, позволяют анализировать особенности метаболических нарушений при анализе адаптивно важных признаков. В частности, ранее в экспериментах на дрозофиле показано, что фармакологическое угнетение триптофан-кинуренинового пути метаболизма влияет на длительность жизни [7, 8]. Таким образом, целью данной работы был анализ продолжительности жизни у мутантных линий дрозофилы с нарушением метаболизма триптофана.

© ГОРЕНСКАЯ О. В., НАВРОЦКАЯ В. В.

Материалы и методы

В работе использовались линии дикого типа *Drosophila melanogaster Canton-Special (C-S)* и *Oregon (Or)* и линии с мутациями локуса *white*: *white^{apricot}*, *white^{satsuma}*, соответственно *w(C-S)*, *w^a(C-S)* и *w^{sat}(C-S)*, а также линии с мутацией *vermilion*: *v* и *v(Or)*. В наших исследованиях мутации перенесены на генетический фон линий дикого типа для возможности оценки вклада мутаций в проявление изучаемого признака. Мухи развивались в стандартных условиях, на сахарно-дрожжевой среде при температуре 23°C. Для анализа показателя продолжительности жизни (ПЖ) отбирали виргинных имаго, разделяя их по полу. Каждые два дня имаго пересаживали на свежую среду, учитывая одновременно количество погибших особей. Анализировали продолжительность жизни не менее 100 особей каждого пола во всех вариантах эксперимента.

Строили кривые выживания особей и рассчитывали показатель средней продолжительности жизни (СПЖ) имаго и ошибку среднего. Значения показателей средней продолжительности жизни линий дикого типа и мутантных линий сравнивали при помощи непарного t-критерия Стьюдента с использованием поправки Бонферрони. Проверку нулевых гипотез проводили на уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

Кривые выживания, построенные при анализе длительности жизни имаго дрозофилы, несущей разные аллели гена *white*, показаны на рис. 1.

Результаты эксперимента показали, что средняя продолжительность жизни самок дрозофилы линии дикого типа *C-S* не изменяется, если в генотипе присутствуют мутантные аллели гена *white*. Для самцов отмечено увеличение изучаемого показателя в линиях *w(C-S)* ($p=0,0008$) и *w^a(C-S)* ($p=0,0029$).

Ранее (при изучении комплекса адаптивно важных признаков у линий дрозофилы с разным аллельным состоянием локуса *white*) показано, что у мух линий *w^{sat}C-S* и *w^aC-S* количество потомков и на стадии куколки, и на стадии имаго возрастает по сравнению с линией дикого типа в среднем на 30 %, увеличивается длительность

предимагинального развития самок и самцов линии *w^aC-S* по сравнению с линией *Canton-S*, снижается устойчивость к голоданию у мух с нарушенным метаболизмом триптофана. Суммарная частота доминантных летальных мутаций у линий с разным аллельным состоянием локуса *white* не отличается от значений у линии дикого типа [9].

В природе триптофан синтезируют микроорганизмы, растения и грибы. Многоклеточные животные не способны синтезировать триптофан *de novo*. У имаго дрозофилы основное количество триптофана поступает из дрожжей, которые составляют основной компонент рациона взрослых мух.

Ген *white⁺* кодирует трансмембранный ABC-транспортер, который осуществляет перенос 3-гидроксикинуренина в пигментные гранулы глаз. Нарушение в структуре гена *w⁺* приводит к изменениям в метаболизме триптофана по кинурениновому пути. Так, при мутации *white* транспорт предшественников красных и коричневых пигментов, гуанина и триптофана внутрь специальных внутриклеточных везикул глаза не происходит. Это определяет основное проявление фенотипа мутантных имаго – белые глаза и бесцветные мальпигиевы сосуды [10].

Трансмембранный ABC транспортер участвует и в захвате гуанина и триптофана. Поскольку гуанин требуется для синтеза дофамина и серотонина, а триптофан является предшественником серотонина, у мутантов изменены уровни и распределение этих нейромедиаторов.

Инсерция мобильного элемента *copia* в ген *w⁺* приводит к возникновению мутации *white^{apricot}*. Мутация *w^a* имеет только 3 % пигмента дрозоптерина от 100 % уровня дикого типа, ксантоматин не обнаружен, что свидетельствует о нарушении обмена триптофана.

Мутация *w^{sat}* характеризуется тем, что уровень дрозоптерина составляет 4 % от уровня дикого типа, а ксантоматина – 79 %, поэтому фенотипически мы наблюдаем коричневый цвет сложных фасеточных глаз имаго. Предполагается, что данный фенотип образуется в результате нарушения обмена гуанина.

Кривые выживания, построенные при анализе длительности жизни имаго дрозофилы, несущей мутацию *vermilion*, показаны на рис. 2.

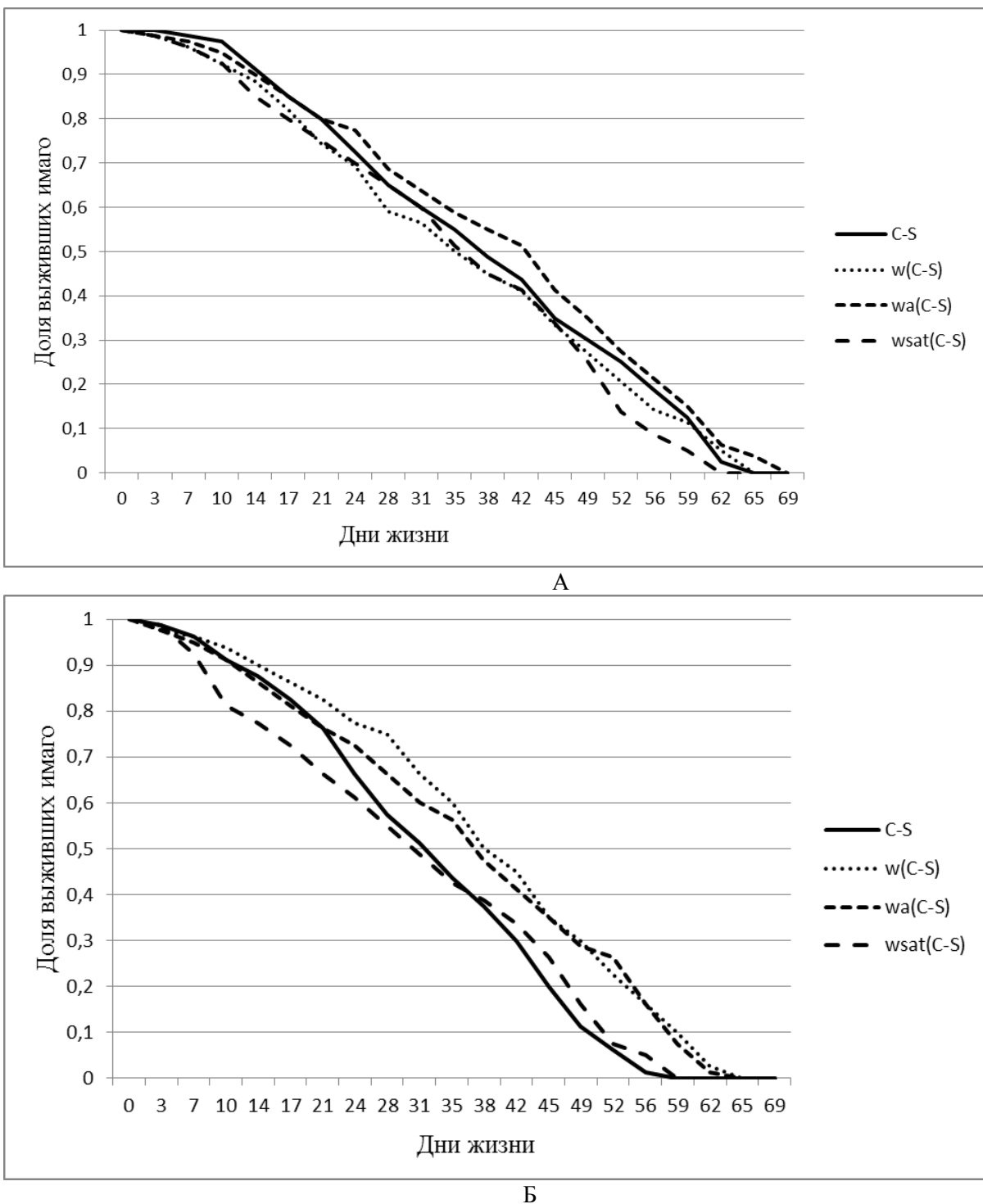
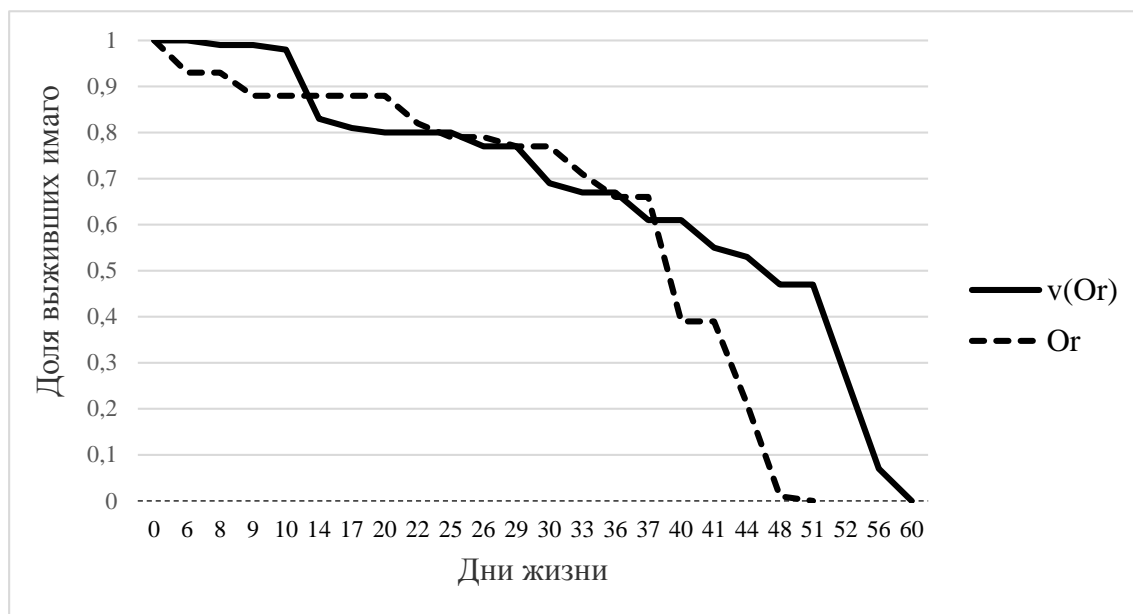


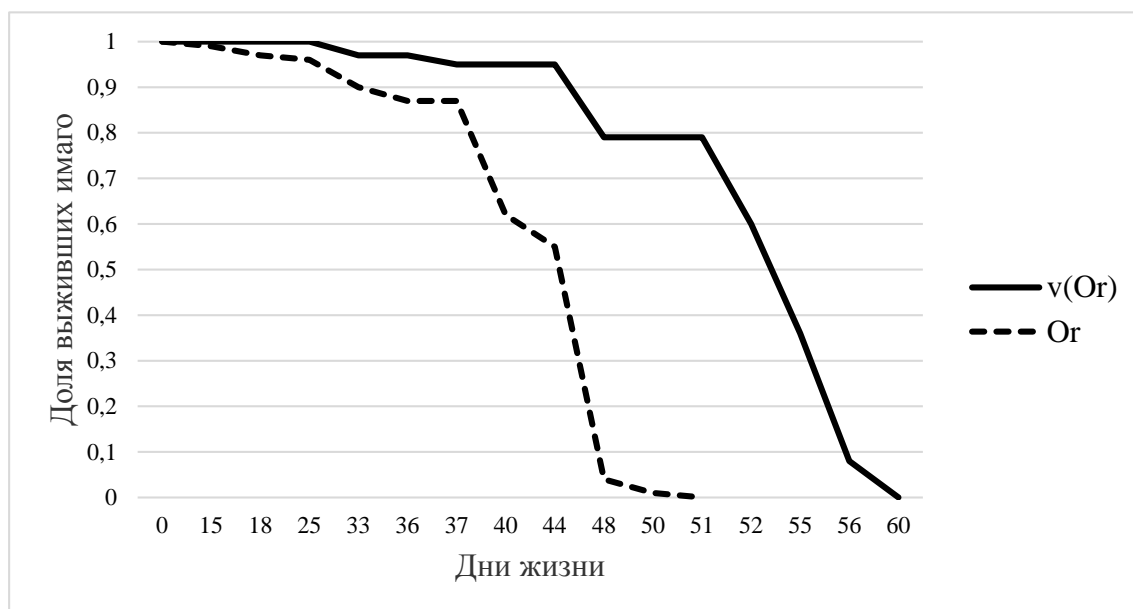
Рис. 1. Кривые выживания имаго дрозофилы самок (А) и самцов (Б), несущих мутантные аллели гена *white*.

СПЖ самцов линии дикого типа составила 43,4 суток, самок – 36,2. Для особей линии, несущей мутацию *vermilion*, показано увеличение этого показателя: СПЖ самок – 40,9 и самцов – 53,0 ($p < 0,05$) суток, различия по сравне-

нию со значениями СПЖ линии дикого типа статистически значимы. Как и в случае с внесением аллелей гена *white* в генотип линии дикого типа, больший эффект от нарушения кинуренинового пути отмечается у самцов.



А



Б

Рис. 2. Кривая выживаемости имаго дрозофилы самок (А) и самцов (Б) линий *v(Or)* и *Or*.

Большая длительность жизни особей *vermillion* по сравнению с линиями дикого типа показана и в ряде других работ [11, 12], но в нашей работе этот факт подтвержден с использованием линий с выравненным генотипом.

Мушкетеры, несущие мутацию *vermillion*, имеют дефицит фермента триптофан-2,3-диоксигеназы, и можно предположить, что увеличение ПЖ может быть связано с замедлением превращения триптофана в кинуренин. Соотношение кинуренин/триптофан повышается при старении у человека [13]. В экспериментах с *C. elegans* по-

казано, что нокаут генов ферментов триптофан-кинуруенинового пути значительно увеличивает продолжительность жизни [14].

В отношении связи кинуренинов и старения, возникновения возраст-ассоциированных заболеваний необходимо учитывать способность кинуренинов индуцировать накопление свободных радикалов [15], а также нейротоксические [16] и диабетогенные [17] свойства некоторых метаболитов кинуренинового пути. Кроме того, торможение данного пути метаболизма триптофана может приводить к интенсификации

других путей, в т. ч. серотонинового, метаболиты которого также являются нейроактивными веществами и влияют на поведение и приспособленность мух.

Выводы

Результаты исследований позволяют предположить, что старение ассоциировано с

регуляцией триптофан-кинуренинового метаболизма. Нарушение метаболизма триптофана по кинурениновому пути у мутантных линий дрозофилы $w(C-S)$ и $w^a(C-S)$ привело к увеличению показателя средней продолжительности жизни самцов. Увеличение длительности жизни (для обоих полов) показано и при введении в генотип линии дикого типа мутации *vermilion*.

References

1. Lypez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013. Vol. 153 (6). P. 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
2. Greer E.L., Maures T.J., Ucar D., Hauswirth A.G., Mancini E., Lim J.P., Benayoun B.A., Shi Y., Brunet A. Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2011. Vol. 479. P. 365–371. doi: 10.1038/nature10572.
3. Orentreich N., Matias J.R., DeFelice A., Zimmermann J.A. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J. Nutr.* 1993. Vol. 123 (2). P. 269–274. doi: 10.1093/jn/123.2.269.
4. Zarse K., Schmeisser S., Groth M., Priebe S., Beuster G., Kuhlow D., Guthke R., Platzer M., Kahn C.R., Ristow M. Impaired insulin/IGF1 signaling extends life span by promoting mitochondrial L-proline catabolism to induce a transient ROS signal. *Cell Metab.* 2012. Vol. 15 (4). P. 451–465. doi: 10.1016/j.cmet.2012.02.013.
5. Van der Goot A.T., Wentao Zhu, V6zquez-Manriqueet R.P., Seinstra R.I., Dettmer K., Michels H., Farina F., Krijnen J., Melki R., Buijsman R.C., Silva M.R., Thijssen K.L., Kema I.P., Neri Ch., Oefner P.J., Nollen E.A.A. Delaying aging and the aging associated decline in protein homeostasis by inhibition of tryptophan degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012. Vol. 109 (37). P. 14912–14917. doi: 10.1073/pnas.1203083109.
6. Savvateeva-Popova E.V., Popov A.V., Heinemann T., Riederer P. *Drosophila* mutants of the kynurenine pathway as a model for ageing studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003. Vol. 527. P. 713–722.
7. Oxenkrug G., Navrotskaya V., Vorobyova L., Summergrad P. Extension of life span of *Drosophila melanogaster* by the inhibitors of tryptophan – kynurenine metabolism. *Fly (Austin)*. 2011. Vol. 5 (4). P. 307–309. doi: 10.4161/fly.5.4.18414.
8. Navrotskaya V., Oxenkrug G., Vorobyova L.I., Summergrad P. Berberine attenuated aging-accelerating effect of high temperature in drosophila model. *Amer. J. Plant Sci.* 2014. Vol. 5 (3). P. 275–278. doi: 10.4236/ajps.2014.53037.
9. Gorenskaya O.V., Kostenko V.V., Vorobyova L.I., Taglina O.V. The influence of allelic state of locus white on some parameters of fitness in *Drosophila melanogaster*. *Bulletin of problems in biology and medicine*. 2015. Issue 1. P. 74–79. [in Russian] / Горенская О.В., Костенко В.В., Воробьева Л.И., Таглина О.В. Влияние аллельного состояния локуса white на некоторые показатели приспособленности у *Drosophila melanogaster*. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015. Вип. 1. С. 74–79.
10. Mackenzie S.M., Brooker M.R., Gill T.R., Cox G.B., Howells A.J., Ewart G.D. Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999. Vol. 1419. P. 173–185.
11. Kamyshev M.G. Longevity and its relation to the locomotor activity in tryptophan–xanthommatin metabolic pathway mutant of *Drosophila*. *Dokl Acad Nauk USSR*. 1980. Vol. 253. P. 1476–1480. [in Russian] / Камышев М.Г. Продолжительность жизни и ее отношение к локомоторной активности у мутантов метаболического пути триптофан – ксантомматин *Drosophila*. *Доклады АН УССР*. 1980. Т. 253. С. 1476–1480.
12. Oxenkrug G.F. The extended life span of *Drosophila melanogaster* eye-color (*white* and *vermilion*) mutants with impaired formation of kynurenine. *J. Neural. Transm.* 2010. Vol. 117. P. 23–26. doi: 10.1007/s00702-009-0341-7.
13. Frik B., Schroecksnadel K., Neurauder G., Leblhuber F., Fuchs D. Increasing production of homocysteine and neopterin and degradation of tryptophan with older age. *Clin. Biochem.* 2004. Vol. 37. P. 684–687. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.02.007.
14. Sutphin G.L., Backer G., Sheehan S., Bean S., Corban C., Liu T., Peters M.J., van Meurs J.B.J., Murabito J.M., Johnson A.D., Korstanje R. *Caenorhabditis elegans* orthologs of human genes differentially expressed with age are enriched for determinants of longevity. *Aging Cell*. 2017. Vol. 16 (4). P. 672–682. doi: 10.1111/acel.12595.
15. Ocampo J.R., Huitryn R.L., González-Esquivel D., Ugalde-Muciz P., Jiménez-Anguiano A., Pineda B., Pedraza-Chaverri J., Rhos C., Pírez de la Cru V. Kynurenines with neuroactive and redox properties: relevance to aging and brain diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014. Vol. 2014. Article ID 646909. doi: 10.1155/2014/646909.
16. Campesan S., Green E.W., Breda C., Sathyaikumar K.V., Muchowski P.J., Schwarcz R., Kyriacou C.P., Giorgini F. The kynurenine pathway modulates neurodegeneration in a drosophila model of Huntington's disease. *Curr. Biol.* 2011. Vol. 21 (11). P. 961–966. doi: 10.1016/j.cub.2011.04.028.
17. Oxenkrug G.F. Increased plasma levels of xanthurenic and kynurenic acids in type 2 diabetes. *Mol. Neurobiol.* 2015. Vol. 52 (2). P. 805–810. doi: 10.1007/s12035-015-9232-0.

GORENSKAYA O. V., NAVROTSKAYA V. V.

V.N. Karazin Kharkiv National University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 4, e-mail: olgavg2014@gmail.com, valeriya.navrotskaya@ukr.net

ANALYSIS OF THE ROLE OF TRYPTOPHAN-KYNURENINE PATHWAY IN THE LIFE SPAN CONTROL IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Aim. To analyze life span in mutant *Drosophila* stocks with impaired tryptophan-kynurenine metabolism. **Methods.** Wild type stocks Canton-S and Oregon, stocks with mutations of the locus *white*: *white*, *white^{apricot}*, *white^{satsuma}*, and stocks with the mutation *vermilion* have been used. The average life span of imago has been determined, survival curves have been analyzed. **Results.** It has been shown that the average life span of *Drosophila* females with mutant alleles of the *white* gene does not differ from the wild-type stock; in males of the *w(C-S)* and *w^a(C-S)* stocks the index is increased. The presence of the mutation *vermilion* in the genotype also increases the average life span of imago of both sexes, but in males the extension is more pronounced. **Conclusions.** The results suggest that aging is associated with the regulation of tryptophan-kynurenine metabolism.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, life span, kynurenine pathway of tryptophan metabolism.

ГОРЕНСЬКА О. В., НАВРОЦЬКА В. В.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,

Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, e-mail: olgavg2014@gmail.com, valeriya.navrotskaya@ukr.net

АНАЛІЗ РОЛІ ТРИПТОФАН-КІНУРЕНИНОВОГО МЕТАБОЛІЗМУ У КОНТРОЛІ ТРИВАЛОСТІ ЖИТТЯ

Мета. Аналіз тривалості життя у мутантних ліній дрозофіли з порушенням кінуренинового шляху метаболізму триптофану. **Методи.** Використані лінії дикого типу *Canton-S* і *Oregon*, лінії з мутаціями локусу *white*: *white*, *white^{apricot}*, *white^{satsuma}*, і лінія з мутацією *vermilion*. Визначали показник середньої тривалості життя імаго, аналізували криві виживання імаго. **Результати.** Показано, що середня тривалість життя самок дрозофіли з мутантними алелями гена *white* не відрізняється від лінії дикого типу, у самців ліній *w(C-S)* і *w^a(C-S)* показник збільшився. Присутність у генотипі мутації *vermilion* також збільшує середню тривалість життя імаго обох статей, але у самців збільшення виражено сильніше. **Висновки.** Результати досліджень дозволяють припустити, що старіння асоційоване з регуляцією триптофан-кінуренинового метаболізму.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, тривалість життя, триптофан-кінурениновий шлях метаболізму.