МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2024, том 58, № 2, с. 246–259

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 612.74, 573.7.017.6, 577.29

НОКАУТ ГЕНОВ *Hsp70* МОДУЛИРУЕТ ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА В МЫШЦАХ НОГ, СНИЖАЕТ СКОРОСТЬ ЛОКОМОЦИЙ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *Drosophila melanogaster*[#]

© 2024 г. И. В. Кукушкина[a, b], П. А. Махновский[a], В. Г. Згода[c], Н. С. Курочкина[a], Д. В. Попов[a*]

[a] *Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, 123007 Россия*
[b] *Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия*
[c] *Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия*
**e-mail: danil-popov@yandex.ru*

Поступила в редакцию 23.08.2023 г.
После доработки 05.10.2023 г.
Принята к публикации 13.10.2023 г.

Изучено влияние нокаута шести генов семейства *Hsp70* (ортологи генов млекопитающих *Hspa1a*, *Hspa1b*, *Hspa2* и *Hspa8*) на возрастные изменения экспрессии генов в ногах *Drosophila melanogaster*, содержащих преимущественно пучки скелетных мышц. С этой целью определен транскриптомный профиль скелетных мышц ног самцов контрольной линии w^{1118} и линии $Hsp70^{-}$ на 7-, 23- и 47-е сутки жизни. У мух w^{1118} возрастное снижение скорости локомоций в тесте на отрицательный геотаксис (маркер функционального состояния и выносливости) сопровождалось выраженным изменением транскриптомного профиля скелетных мышц ног, носящим консервативный характер. У мух $Hsp70^{-}$ медианная продолжительность жизни была меньше, а скорость локомоций значительно ниже, чем у контрольных мух; одновременно наблюдались комплексные изменения возрастной динамики транскриптома скелетных мышц. Количественный масс-спектрометрический анализ протеома выявил разнонаправленные изменения в содержании ключевых ферментов метаболизма глюкозы и окисления жиров (гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса, бета-окисление и окислительное фосфорилирование) у 47-суточных мух $Hsp70^{-}$ относительно w^{1118}. Такая дисрегуляция может быть связана с компенсаторным увеличением экспрессии других генов, кодирующих шапероны (малые Hsp, Hsp40, 60 и 70), которые регулируют специфичные наборы белков-мишеней. Совокупность полученных нами данных показывает, что нокаут шести генов *Hsp70* несколько уменьшает медианную продолжительность жизни мух, но выраженно снижает скорость их локомоций, что может быть связано с комплексными изменениями транскриптома скелетных мышц ног и с разнонаправленными изменениями в содержании ключевых ферментов энергетического метаболизма.

Ключевые слова: скелетная мышца, старение, белки теплового шока, транскриптом, протеом
DOI: 10.31857/S0026898424020065**, EDN:** NKMIFA

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение доли пожилых людей, наблюдаемое в развитых странах в последнее десятилетие, делает актуальным изучение механизмов старения. При старении происходит постепенное снижение функциональных и адаптационных возможностей организма и развитие возрастных патологий. Один из интегральных признаков старения – уменьшение массы и функциональных возможностей скелетной мускулатуры – выражается в снижении способности мышц окислять жиры и углеводы, аэробной работоспособности (выносливости) и силы мышц [1, 2]. Эти изменения ведут к нарушению углеводно-жирового обмена, развитию метаболических заболеваний, патологий сердечно-сосудистой системы, саркопении и ряду других нарушений [3–6]. Совокупность этих изменений может быть причиной старческой астении (немощи) и значительного снижения качества жизни, что подчеркивает важность изучения влияния старения (и соответствующих механизмов) на функции скелетных мышц.

[#] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898424020065 для авторизованных пользователей.

Выделяют более 10 молекулярно-клеточных признаков старения, среди которых большое внимание привлекает нарушение клеточного протеостаза [7]. Ключевыми регуляторами протеостаза являются белки теплового шока и, в частности, одно из наиболее консервативных семейств этих белков – Hsp70 (Hspa) [8]. Белки этого семейства выполняют разнообразные функции, такие как *de novo* фолдинг белков, контроль качества и фолдинг совместно с белками Hsp90 и шаперонинами, участие в мембранном транспорте и регуляции активности белков, сборка белковых комплексов, защита белков от деградации и регуляция их протеолиза, а также предотвращение стресс-индуцируемого образования белковых агрегатов, импорт и фолдинг митохондриальных белков [9, 10]. Наиболее хорошо изучены функции белков, кодируемых генами-паралогами *Hspa1a* (*Hsp72-1*) и *Hspa1b* (*Hsp72-2*). Белок, кодируемый *Hspa1a*, играет важную роль в регенерации скелетных мышц в ответ на различные стимулы, включая сократительную активность [11], а также в регуляции чувствительности к инсулину, биогенеза митохондрий и аэробной работоспособности (выносливости) [12, 13]. Эти процессы значительно нарушаются в скелетных мышцах при старении, поэтому не стала неожиданностью связь *Hspa1a* с возрастзависимым снижением чувствительности к инсулину [14, 15] и мышечной силы [16]. Нужно отметить, что влияние генов семейства *Hsp70* (*Hspa*) на возрастные изменения скелетных мышц изучено явно недостаточно, в частности, отсутствуют данные об их воздействии на транскриптом при старении.

Ключевым подходом к изучению функции генов считается нокаут. Семейство *Hsp70* (*Hspa*) состоит более чем из 10 генов, и подавление экспрессии одного из них может компенсировать другие гены этого семейства, что затрудняет интерпретацию результатов таких экспериментов. Поэтому для исследования влияния генов семейства *Hsp70* (*Hspa*) на возрастные изменения транскриптома скелетных мышц мы использовали линию *Drosophila melanogaster* с нокаутом шести генов *Hsp70* (*Hsp70Aa*, *Hsp70Ab*, *Hsp70Ba*, *Hsp70Bb*, *Hsp70Bbb*, *Hsp70Bc*), ортологов генов *Hspa1a*, *Hspa1b*, *Hspa2* и *Hspa8* млекопитающих. Для определения зависящих от возраста и *Hsp70* изменений экспрессии генов мы выделяли РНК и белки из ног мух, состоящих преимущественно из мышечных пучков и хитинового каркаса [17]. Использовали широкозахватные методы РНК-секвенирования и количественный масс-спектрометрический анализ протеома. Кроме того, оценивали влияние нокаута генов *Hsp70* на скорость локомоций в тесте на отрицательный геотаксис – показатель, характеризующий функциональное состояние и выносливость мух [18], и на продолжительность жизни мух с обычным и хронически повышенным уровнем двигательной (локомоторной) активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии *D. melanogaster* и условия их культивирования. Самки *D. melanogaster* хуже адаптируются к увеличению двигательной активности, чем самцы [19]. Поэтому исследование проводили на самцах линии w^{1118} (Vienna Drosophila Resource Center, ID 60000) и $Hsp70^{-}$ (генотип w^{1118}; *Df(3R)Hsp70A*, *Df(3R)Hsp70B*) (Bloomington Drosophila Stock Center, ID 8841) с нокаутом шести генов этого семейства (*Hsp70Aa*, *Hsp70Ab*, *Hsp70Ba*, *Hsp70Bb*, *Hsp70Bbb*, *Hsp70Bc*) [20] из 13. Отсутствие экспрессии этих генов подтверждено анализом покрытия их открытой рамки считывания (РНК-секвенирование) (рис. 1*а*). Мух содержали при 22 °С, влажности 45–55% и 12-часовом цикле свет – темнота, на пищевой среде (5% сахарозы, 10% пекарских дрожжей, 5% манной крупы, 0.7% агара, 0.1% пропионовой кислоты). Мух культивировали при постоянной плотности не менее двух поколений; самцов отбирали в парах диэтилового эфира в течение 36 ч после вылета имаго и помещали по 30 особей в 50 мл полипропиленовые пробирки с вентилируемой крышкой и 5 мл пищевой среды. Корм меняли каждые 3 суток.

Анализ выживаемости. Число мертвых мух подсчитывали каждые 2 суток. Различия в продолжительности жизни в разных группах определяли с помощью инструмента OASIS2 [21] при уровне значимости 0.05 по логарифмическому тесту Мантеля – Кокса (n >150 для каждой линии); различия в медианной и максимальной продолжительности жизни (50 и 10% выживших соответственно) – по точному критерию Фишера.

Возрастные изменения скорости локомоций. Локомоции (перемещение вверх по стенке пробирки) инициировали с использованием теста на отрицательный геотаксис [18] и самодельного прибора, который каждые 15 с поворачивал пробирки на 180° вокруг поперечной оси, как описано ранее [22]. Через 5 мин после начала теста записывали видео (в течение 6 мин) для определения положения каждой мухи и скорости ее движения по вертикали (программа FreeClimber [23]).

Возрастные изменения транскриптома и протеома скелетной мышцы. Мух обеих линий анестезировали диэтиловым эфиром на 7, 23 и 47 сутки жизни, конечности отделяли в фосфатно-солевом буфере, а затем помещали в охлажденный буфер RLT (“Qiagen”, Германия) для выделения РНК или в буфер для выделения белка (см. ниже).

Влияние хронического увеличения локомоторной активности на продолжительность жизни мух. Мух (n = 180 в каждой линии) тренировали в пробирках для культивирования в течение 4 недель (4–32-е сутки жизни). Использовали прибор (см. выше), который ежедневно, начиная с 12 ч, каждые 15 с поворачивал пробирки на 180° вокруг поперечной оси: в первые 2 суток тренировочного периода в течение 30 мин, во вторые 2 суток – 60 мин, далее – 90 мин. Выживаемость мух регистрировали, как описано выше. Контрольных (нетренирующихся) мух (n = 180 каждой линии) содержали в пробирках с ограниченным объемом (высота 1.5 см) согласно [22].

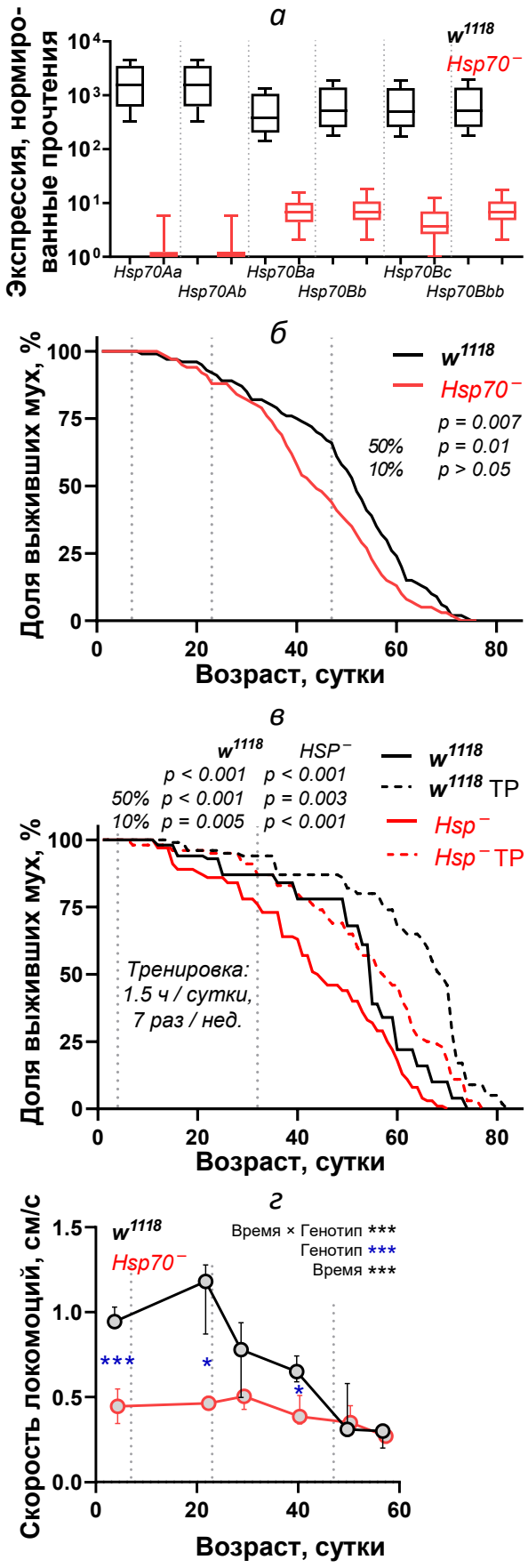
РНК-секвенирование и обработка данных. Ноги 15 мух гомогенизировали в 1.5 мл пробирке с помощью полипропиленового пестика и дрели (200 об./мин, ~ 30 с) в RLT буфере (“Qiagen”) с 1%-ным бета-меркаптоэтанолом и инкубировали (55 °C, 10 мин) с протеинкиназой K (“Евроген”, Россия). Суммарную РНК выделяли на колонке (Clean RNA Standard, “Евроген”). Концентрацию РНК оценивали с помощью флуориметра (Qubit 4, “Thermo Scientific”, США). Целостность РНК определяли с помощью капиллярного электрофореза (TapeStation, “Agilent”, Германия) в аликвоте общей РНК (200 мкг) после обработки ДНКазой I (“Thermo Scientific”). Суммарную РНК (500 мкг) использовали для приготовления цепьспецифичной библиотеки с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Preparation kit (“NEB”, США) и секвенировали (75 нуклеотидов, один конец) со средней глубиной 25 млн. прочтений на образец, используя секвенатор NextSeq 550 (“Illumina”, США), как описано ранее [24].

Прочтения низкого качества и адаптерные последовательности удаляли (Timomatic tool, версия 0.36), прочтения выравнивали по первичной сборке генома BDGP6.94. Подсчитывали уникальные прочтения известных экзонов каждого гена с использованием пакета Rsubread (среда R) и аннотации Ensembl (BDGP6.94). Затем анализировали дифференциально экспрессируемые белоккодирующие гены (метод DESeq2, анализ непарных образцов с поправкой Бенджамини – Хохберга) и удаляли гены с низким уровнем экспрессии (TPM <1) (kallisto v0.46.2). Дифференциально экспрессируемые гены определяли как гены с изменением | экспрессии | >1.25 и p_{adj} <0.05.

Количественный масс-спектрометрический протеомный анализ и обработка данных. Ноги 10 мух гомогенизировали, как описано выше, в 140 мкл лизирующего буфера (4% додецилсульфата натрия, 0.1 М Трис и 0.1 М дитиотреитол pH 7.6). Лизат кипятили (95ºС, 5 мин), переносили в микропробирку AFA и обрабатывали ультразвуком (средняя мощность 20 Вт, 30 с × 4) с помощью фокусированного ультразвукового генератора ME220 (все – “Covaris”, США). После центрифугирования (5 мин, 30000 g) концентрацию белка в супернатанте измеряли флуориметрическим методом (Qubit 4), затем 100 мкг белка загружали на центрифужный фильтр YM-10 (“Millipore”, Ирландия) и гидролизовали с помощью метода FASP, используя ферменты Lys-C и трипсин (Lys-C 1:150, Trypsin Gold 1:100, оба – “Promega”, США) в течение ночи при температуре 37°C, как описано ранее [25].

Каждый образец анализировали трижды с помощью системы ВЭЖХ Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”) и гибридного квадрупольно-орбитального масс-спектрометра Q Exactive HF-X (“Thermo Scientific”) с использованием наноэлектроспрея в режиме положительной ионизации (“Thermo Scientific”), как описано ранее [26]. Градиент (140 мин) был сформирован подвижной фазой A (0.1% муравьиной кислоты) и B (80% ацетонитрила, 0.1% муравьиной кислоты) при потоке 0.4 мкл/мин. Ионизирующее напряжение составляло 2.1 кВ. Масс-спектры получены с разрешением 120000 в диапазоне 380–1500 m/z; ионы фрагментов сканировали по массе с разрешением 60000 в диапазоне m/z от 115 до верхнего значения m/z, соответствующего массе зарядового числа иона-предшественника. Все тандемные МС-сканирования проводили на ионах с зарядовым числом от z = 2+ до z = 4+. Синхронный отбор родительских ионов позволял одновременно выделить до 40 ионов-фрагментов (MC2). Максимальное время накопления ионов установлено равным 50 мс для родительских ионов и 100 мс для фрагментов. Целевые значения AGC были установлены на 10^7 и 2 × 10^5 для ионов-предшественников и фрагментов соответственно.

Определение пептидов, белков и интенсивности репортерных ионов проводили с использованием платформы MaxQuant (1.6.11; Институт биохимии Макса Планка) при стандартных настройках (FDR для пептидов 1%, N-концевое ацетилирование и окисление метионина в качестве переменных модификаций и карбамидометилирование цистеина в качестве фиксированной модификации); для устранения влияния системных факторов небиологических эффектов использовали функции “Isobaric much between runs” и “PSM-level weighted ratio normalization” [27]. После фильтрации (потенциальные контаминанты, обратные пептиды и пептиды, идентифицированные только по сайту) рассчитывали отношение интенсивностей репортерных ионов ($Hsp70^{-}/w^{1118}$) для каждого белка, идентифицированного по >1 уникальному пептиду, с использованием платформы Perseus (1.6.5; Институт



биохимии Макса Планка). Дифференциально экспрессируемые белки определяли с помощью Т-критерия Уэлча с q-значением (p-значение, скорректированное по Бенджамини – Хохбергу) < 0.05. Если белковая группа состояла из нескольких белков, то выбирали белок с наибольшей экспрессией соответствующей мРНК.

Статистический анализ. Физиологические данные представлены как медианы и межквартильный разброс. Данные повторных измерений анализировали с использованием двухфакторной (время и генотип) модели со смешанными эффектами с тестом множественных сравнений Сидака (уровень значимости 0.05).

Анализ функционального обогащения биологических процессов и клеточных компонентов выполняли относительно референсного набора генов (белоккодирующие гены с TPM > 1) с помощью DAVID 6.8 (p_{adj} < 0.05 точный тест Фишера с поправкой Бенджамини) с использованием баз данных GENE ONTOLOGY BP/CC DIRECT и KEGG PATHWAY. Динамику экспрессии генов, относящихся к некоторым обогащенным функциональным группам, оценивали с использованием нормированной экспрессии (z-шкала) каждого гена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние нокаута генов Hsp70 на продолжительность жизни D. melanogaster

Медианная продолжительность жизни мух линии *Hsp70*$^-$ оказалась на 14% (p = 0.01) меньше, чем у мух контрольной линии w^{1118}, при этом не выявлено различий в максимальной продолжительности жизни (рис. 1*б*). Снижение продолжительности жизни мух *Hsp70*$^-$ отмечено ранее [28], однако подавление экспрессии *Hsp70* с помощью РНК-интерференции не повлияло на этот показатель [29].

Увеличение физической активности повышает качество и/или продолжительность жиз-

Рис. 1. Нокаут шести генов семейства *Hsp70* снижает медианную продолжительность жизни *D. melanogaster* и оказывает выраженное негативное влияние на скорость локомоций в тесте на отрицательный геотаксис. *а* – Нормированное количество прочтений (РНК-секвенирование), приходящееся на открытую рамку считывания каждого гена. n = 12 пулов (ноги 15 мух) каждой линии. *б* и *в* – Доля выживших мух с обычным и хронически повышенным уровнем двигательной (локомоторной) активности. Представлено значение p для сравнения кривых, а также для медианной и максимальной продолжительности жизни (доля выживших 50 и 10%); n >150 в каждой линии. ТР – тренировка. *г* – Возрастные изменения скорости локомоций в тесте на отрицательный геотаксис. Одной и тремя звездочками представлены значения p < 0.05 и < 0.001 соответственно. n = 5–6 пулов (10–30 мух в пуле) каждой линии.

ни разных организмов (человека [30, 31], грызунов [32, 33], а также мух [34–38]). Поэтому мы решили проверить, окажет ли нокаут генов *Hsp70* негативное влияние на прирост продолжительности жизни, вызванный физическими нагрузками. В нашей работе повышенная локомоторная активность (4–32-е сутки жизни) привела к увеличению медианной и максимальной продолжительности жизни не только мух линии w^{1118} (на 26 и 9% соответственно), но и *Hsp70*$^-$ (на 30 и 15% соответственно) (рис. 1*в*). Это означает, что увеличение продолжительности жизни, вызванное тренировками, не регулируется *Hsp70*. По-видимому, нокаут генов *Hsp70* вызывает несильный негативный эффект, поскольку он полностью компенсируется влиянием хронически повышенной двигательной активности.

Нокаут генов Hsp70 снижает скорость локомоций у D. melanogaster

В первые сутки после вылупления у мух наблюдаются выраженные изменения экспрессии генов, размеров и функциональных возможностей скелетных мышц, связанные с ростом и развитием [17], поэтому все исследования проводили, начиная с 7-х суток жизни. Скорость локомоций (перемещение вверх) в тесте на отрицательный геотаксис широко используется для оценки функционального состояния и выносливости мух [18]. Нами обнаружено, что скорость локомоций у молодых самцов *Hsp70*$^-$ в 2 раза ниже ($p_{adj} < 0.001$), чем в контрольной линии w^{1118} (рис. 1*г*). Это согласуется с данными о том, что сверхэкспрессия *Hspa1a* в скелетных мышцах мышей приводит к увеличению скорости и времени бега до отказа активности окислительных ферментов и содержания митохондрий в мышцах, а также к максимальной скорости потребления O_2 организмом [12, 13]. У мух w^{1118} в возрасте 3 нед. наблюдается резкое снижение скорости локомоций, что соответствует данным [35, 39], однако у мух *Hsp70*$^-$ скорость локомоций не изменяется значимо и остается на очень низком уровне (рис. 1*г*). Возрастные изменения скорости локомоций у мух w^{1118} согласуются с многочисленными изменениями в летательных мышцах старых мух: со снижением плотности митохондрий и нарушением их структуры, с увеличением продукции активных форм кислорода, нарушением структуры мышечных волокон, саркомеров и эндоплазматического ретикулума и с накоплением полиубиквитинированных белковых агрегатов [40–42].

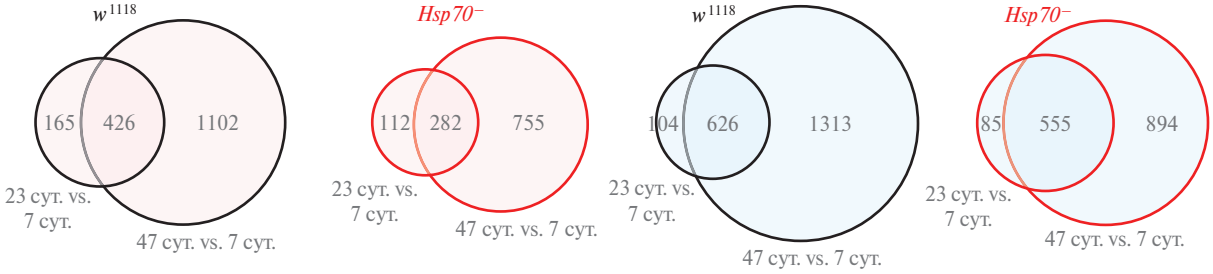
В дальнейшем профиль экспрессии генов в мышцах ног *D. melanogaster* изучали на 7- (молодые особи), 23- (до резкого снижения скорости локомоций контрольных мух) и 47-е сутки (при сопоставимой скорости локомоций) (рис. 1*г*).

Сравнение возрастных изменений транскриптома в мышцах ног мух w^{1118} и млекопитающих

Исследование динамики транскриптомного профиля в мышцах ног показало, что большинство возрастных изменений, наблюдаемых у 23-суточных мух w^{1118} относительно молодых, сохранились у 47-суточных мух (рис. 2*а*, табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/2/supp_Kukushkina_rus.zip), а количество генов, экспрессия которых изменилась к 47-м суткам, увеличилось в 2–3 раза, что говорит о прогрессировании возрастных изменений. В дополнение к этому анализ функционального обогащения показал, что после 23 суток жизни (сопоставление 47 и 23-суточных мух, а также 23 и 7-суточных мух) значительно изменяется выраженность транскриптомных изменений: увеличивается количество генов, входящих в функциональную категорию “иммунный ответ”, “фолдинг белков”, “цитоскелет” (рис. 2*б*) и “митохондрия” (рис. 2*в*), снижается обогащение генами категорий “трансляция”, “протеолиз/лизосома”, “биосинтез кофакторов”, “метаболизм углеводов” (рис. 2*б*) и “плазматическая мембрана” (рис. 2*в*).

Сравнение совокупных изменений у мух разного возраста (47 суток *vs.* 7) выявило наиболее значимое обогащение генами, экспрессия которых снизилась, а именно генами, кодирующими белки митохондрий (окислительные ферменты и др.), мембранные белки и синаптические белки мотонейронов, ферменты метаболизма глюкозы/гликогена и аминокислот, белки саркомеров и внеклеточного матрикса (рис. 2*в*). Генами, экспрессия которых повысилась, обогащены функциональные категории, связанные с ядерными белками, протеолизом/протеасомами, фолдингом белков, трансляцией/рибосомами и внеклеточным матриксом (рис. 2*б*). Эти изменения хорошо согласуются с возрастными изменениями транскриптома летательных мышц *D. melanogaster* (линия *B3*) [41] и скелетных мышц грызунов и человека [43–46], в которых снижается экспрессия генов, ассоциированных с многочисленными митохондриальными белками (включая рибосомные), регуляторами транскрипции, углеводного, жирового и аминокислотного обмена и с саркомерными белками, а увеличивается экспрессия генов, связанных с воспалительным и иммунным ответом, клеточной адгезией и секрецией. Это свидетельствует о консервативности механизмов регуляции воз-

а



б

ГРУППА	ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КАТЕГОРИИ мРНК с увеличенной экспрессией (БАЗЫ ДАННЫХ GO CC и KEGG PATHWAY)	Гены, число					
		23 vs.7		47 vs.23		47 vs.7	
		w^{1118}	*Hsp70*−	w^{1118}	*Hsp70*−	w^{1118}	*Hsp70*−
TRANSLATION	CYTOSOLIC RIBOSOME	19			25	25	
	RIBOSOME	25			27		
	RIBOSOME	25			25		
	CYTOSOLIC LARGE RIBOSOMAL SUBUNIT	12			15	19	
	CYTOSOLIC SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT	9			11		
	SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT				6		
	MITOCHONDRIAL SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT	9					
	MATURATION OF SSU-RRNA					10	
	90S PRERIBOSOME						7
	U4/U6 X U5 TRI-SNRNP COMPLEX					10	
	CYTOPLASMIC TRANSLATION					29	
EXTRACELLULAR REGION	EXTRACELLULAR REGION	46	48				
	EXTRACELLULAR SPACE	61		41		91	
	SMOOTH SEPTATE JUNCTION			5			
NUCLEUS	NUCLEOLUS					71	52
	NUCLEOPLASM					65	
PROTEIN FOLDING	CHAPERONIN-CONTAINING T-COMPLEX			7	8	8	8
PROTEOLYSIS	LYSOSOME	22					
	PROTEASOME COMPLEX					20	
	PROTEASOME REGULATORY PARTICLE					14	
	PROTEASOME REGULATORY PARTICLE, BASE SUBCOMPLEX					9	
	PROTEASOME-MEDIATED UBIQUITIN-DEPENDENT PROTEIN CATABOLIC PROCESS					34	
	PROTEASOME CORE COMPLEX					10	
IMMUNE RESPONSE	TOLL AND IMD SIGNALING PATHWAY		15	18			
CYTOSOL	CYTOSOL					183	
CYTOSKELETON	ARP2/3 PROTEIN COMPLEX			6			
	LAMELLIPODIUM			6			
	MICROVILLUS			5			
	ACTIN CYTOSKELETON			9			
BIOSYNTHESIS OF COFACTORS	BIOSYNTHESIS OF COFACTORS	19					
METABOLIC PATHWAYS	METABOLIC PATHWAYS	82					
CARBONHYDRATE METABOLISM	OTHER GLYCAN DEGRADATION	7					
	PENTOSE AND GLUCURONATE INTERCONVERSIONS	10					

$P_{adj} \times 10^{-45}$ ... $\times 10^{-2}$ *N.S.*

в

ГРУППА	ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕКАТЕГОРИИ мРНК со сниженной экспрессией (БАЗЫ ДАННЫХ GO CC и KEGG PATHWAY)	Гены, число					
		23 vs.7		47 vs.23		47 vs.7	
		w1118	Hsp 70	w1118	Hsp 70	w1118	Hsp 70
METABOLIC PATHWAYS	METABOLIC PATHWAYS	115	156	135	79	266	270
MITOCHONDRION	OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	30	58	61		78	70
	MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX I	13	22	27		35	27
	CITRATE CYCLE (TCA CYCLE)	9	16	19		21	19
	PYRUVATE METABOLISM	9	13	12		15	17
	PROTON-TRANSPORTING ATP SYNTHASE COMPLEX, CATALYTIC CORE F(1)	5	5	5			5
	MITOCHONDRION		93	120		168	177
	MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX IV		12	11		13	14
	MITOCHONDRIAL INNER MEMBRANE		29	29		50	44
	MITOCHONDRIAL PROTON-TRANSPORTING ATP SYNTHASE COMPLEX, COUPLING FACTOR F(O)		8	7		9	9
	MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX III		7	6		9	9
	MITOCHONDRIAL PROTON-TRANSPORTING ATP SYNTHASE COMPLEX		5	5		6	6
	MITOCHONDRIAL MATRIX			15			
	MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX II, SUCCINATE DEHYDROGENASE COMPLEX			4			
	MITOCHONDRIAL PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX		4	4			
	RESPIRATORY CHAIN		8				8
	MITOCHONDRIAL MEMBRANE						14
PLASMA MEMBRANE	BASEMENT MEMBRANE	8					
	PLASMA MEMBRANE	114			70	367	247
	INTEGRAL COMPONENT OF MEMBRANE	177	157			547	410
	INTEGRAL COMPONENT OF PLASMA MEMBRANE				33	164	108
	MEMBRANE					324	243
	ANCHORED COMPONENT OF MEMBRANE					15	12
CARBONHYDRATE METABOLISM	CARBON METABOLISM	25	30	25	15	35	46
	GLYCOLYSIS/GLUCONEOGENESIS	17	18	14		22	24
	STARCH AND SUCROSE METABOLISM	9	9				13
	FRUCTOSE AND MANNOSE METABOLISM						9
NERVOUS SYSTEM PROCESS	NEURON PROJECTION MEMBRANE				8	24	19
	SYNAPSE	27				70	41
	NEURON PROJECTION					49	30
	POSTSYNAPTIC MEMBRANE					33	
	AXON					55	
	PRESYNAPTIC ACTIVE ZONE					18	
	SYNAPTIC VESICLE					26	
	ACETYLCHOLINE-GATED CHANNEL COMPLEX					7	
	DENDRITE					28	
	TERMINAL BOUTON					19	
	VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL COMPLEX					9	
	NEUROMUSCULAR JUNCTION					31	
	TYPE I TERMINAL BOUTON					8	
SENSORY PERCEPTION	PHOTOTRANSDUCTION-FLY					15	
	RHABDOMERE		11			19	
	INAD SIGNALING COMPLEX		5			8	
MUSCLE CONTRACTION AND CYTOSKELETON	Z DISC	20	13	14		26	17
	M BAND	11	8	8		12	11
	CYTOSKELETON	18					
AMINOACID METABOLISM	TYROSINE METABOLISM	9	10		11	14	13
	BIOSYNTHESIS OF AMINO ACIDS	14	16	11	12	23	26
	TRYPTOPHAN METABOLISM			7		9	11
	2-OXOCARBOXYLIC ACID METABOLISM		7			9	8
	ARGININE BIOSYNTHESIS					9	
	ARGININE AND PROLINE METABOLISM					11	10
	VALINE, LEUCINE AND ISOLEUCINE DEGRADATION						17
	PHENYLALANINE METABOLISM		5		5		7
	GLYCINE, SERINE AND THREONINE METABOLISM				8		10
	ALANINE, ASPARTATE AND GLUTAMATE METABOLISM						12
	BETA-ALANINE METABOLISM						11
	HISTIDINE METABOLISM						5
	PHENYLALANINE, TYROSINE AND TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS						4
	CYSTEINE AND METHIONINE METABOLISM				7		
LIPID METABOLISM	INSECT HORMONE BIOSYNTHESIS		11			10	9
	GLYCEROLIPID METABOLISM						16
	BUTANOATE METABOLISM						8
	GLYCEROPHOSPHOLIPID METABOLISM				9		18
	PROPANOATE METABOLISM						10
EXTRACELLULAR REGION	EXTRACELLULAR REGION	46		49	42		81
	EXTRACELLULAR SPACE	49		50	37		
	EXTRACELLULAR MATRIX	15				25	
	ECM-RECEPTOR INTERACTION	5					
	CELL-CELL JUNCTION					17	
DRUG METABOLISM	DRUG METABOLISM-CYTOCHROME P450		12				
	METABOLISM OF XENOBIOTICS BY CYTOCHROME P450		12				
PURINE METABOLISM	PURINE METABOLISM						20

$P_{adj} \times 10^{-45}$ $\times 10^{-2}$ *N.S.*

Рис. 2. Старение вызывает выраженные и прогрессирующие изменения транскриптомного профиля ног (состоящих преимущественно из пучков мышечных волокон) мух w^{1118}. Нокаут шести генов семейства *Hsp70* модулирует возрастные изменения транскриптома скелетных мышц ног. *а* – Количество уникальных и общих генов, экспрессия которых у 23- и 47-суточных мух отличается от экспрессии у 7-суточных мух. $n = 4$ пула (ноги 15 мух) каждой линии. *б* и *в* – Анализ функционального обогащения генами, экспрессия которых увеличилась (*б*) и снизилась (*в*). Представлено количество генов в каждой функциональной категории; тепловая карта показывает *p*-значение.

растных изменений экспрессии генов в скелетной мышце и косвенно говорит об адекватности выбранного нами экспериментального подхода. К возрастным изменениям транскриптома скелетных мышц (ног) мух w^{1118}, отличным от изменений у млекопитающих, относится увеличение экспрессии различных ядерных белков, регуляторов транскрипции и рибосомных белков, менее существенное повышение экспрессии генов иммунного ответа и секретируемых белков (рис. 2*б*), а также снижение экспрессии генов синаптических белков (рис. 2*в*).

Интересно отметить, что мы обнаружили множество возрастных изменений в экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока: увеличение *Hsp10*, генов *Cct*, кодирующих комплекс, содержащий шаперонин TCP-1, атипичных *Hsp70* и *Hsp90*, а также разнонаправленные изменения генов малых *Hsp*, *Hsp40*, *Hsp70* (экспрессия 22 и 11 мРНК из 76 экспрессируемых увеличилась и снизилась соответственно; табл. S2, см. Дополнительные материалы), некоторые из них были отмечены ранее в летательных мышцах [47]. При этом нами не найдено возрастных изменений в экспрессии генов *Hsp70Aa*, *Hsp70Ab*, *Hsp70Ba*, *Hsp70Bb*, *Hsp70Bbb*, *Hsp70Bc*, что согласуется с данными о посттранскрипционной регуляции увеличения содержания белков Hsp70 в летательных мышцах старых мух [47].

Нокаут генов Hsp70 модулирует возрастную динамику транскриптома в ногах мух

Изменения транскриптома у мух *Hsp70*$^{-}$ (47-суточных *vs*. 7-суточных) были несколько меньше, чем в контроле (~1000–1500 мРНК *vs*. ~1500–2000 мРНК соответственно; рис. 2*а*, табл. S1, см. Дополнительные материалы), при этом отмечено нарушение возрастной динамики экспрессии многих генов. Так, анализ функционального обогащения показал, что изменения экспрессии генов, кодирующих регуляторы трансляции, ферменты биосинтеза кофакторов, углеводного обмена (рис. 2*б*) и мембранные белки (рис. 2*в*), происходили в начальный период жизни мух линии w^{1118}, тогда как в линии *Hsp70*$^{-}$ изменения экспрессии наблюдались с 23-х по 47-е сутки или отсутствовали. Обратная ситуация отмечена в случае генов иммунного ответа, белков цитоскелета (рис. 2*б*), митохондрий и регуляторов метаболизма лекарственных средств (рис. 2*в*). Анализ возрастной динамики экспрессии генов, относящихся к этим и некоторым другим функциональным категориям, подтвердил это наблюдение (рис. 3). Кроме того, совокупные возрастные изменения (47 *vs*. 7 суток) в экспрессии генов, кодирующих регуляторы трансляции, протеолиза (рис. 2*б* и рис. 3), метаболизма липидов и белки мотонейронов/синапсов, различались между линиями (рис. 2*в* и рис. 3). Суммарно эти данные показывают, что гены *Hsp70* оказывают комплексное, но относительно небольшое влияние на возрастные изменения экспрессии множества генов в скелетных мышцах ног мух.

Нокаут генов Hsp70 вызывает разнонаправленные изменения в экспрессии генов ключевых ферментов метаболизма глюкозы и жиров

Для исследования влияния генотипа (*Hsp70*$^{-}$ *vs*. w^{1118}) на экспрессию генов мы сопоставили транскриптомные и протеомные профили 47-суточных мух (при сопоставимой скорости локомоций; рис. 1*г*). Масс-спектрометрический анализ позволяет детектировать преимущественно высокопредставленные мышечные белки (белки саркомеров, митохондрий, внеклеточного матрикса и др.) [48, 49], поэтому в нашей работе *Hsp70*-зависимые изменения в низкопредставленных сигнальных/регуляторных белках остались практически неохарактеризованными. В результате анализа в скелетных мышцах ног мух детектировано 724 белка, экспрессия 247 из которых у мух линии *Hsp70*$^{-}$ увеличилась, а 72 снизилась, причем изменение содержания трети белков коррелировало с изменением уровня соответствующих мРНК (рис. 4*а*, табл. S1, см. Дополнительные материалы). Оказалось, что белками, имеющими разный паттерн регуляции на уровне мРНК, обогащены различные функциональные категории (рис. 4*б*), что согласуется с наблюдениями для скелетной мышцы человека [50]. Так, белки, содержание которых увеличилось при повышении экспрессии их генов, были ассоциированы с категорией “окислительное фосфорилирование” и включали субъединицы митохондриальных комплексов I, III и V (АТРаза), а также вакуолярной V-АТРазы (рис. 4*б*,*в*). Более 170 белков, содержание которых увеличилось без изменения содержания их мРНК, были ассоциирова-

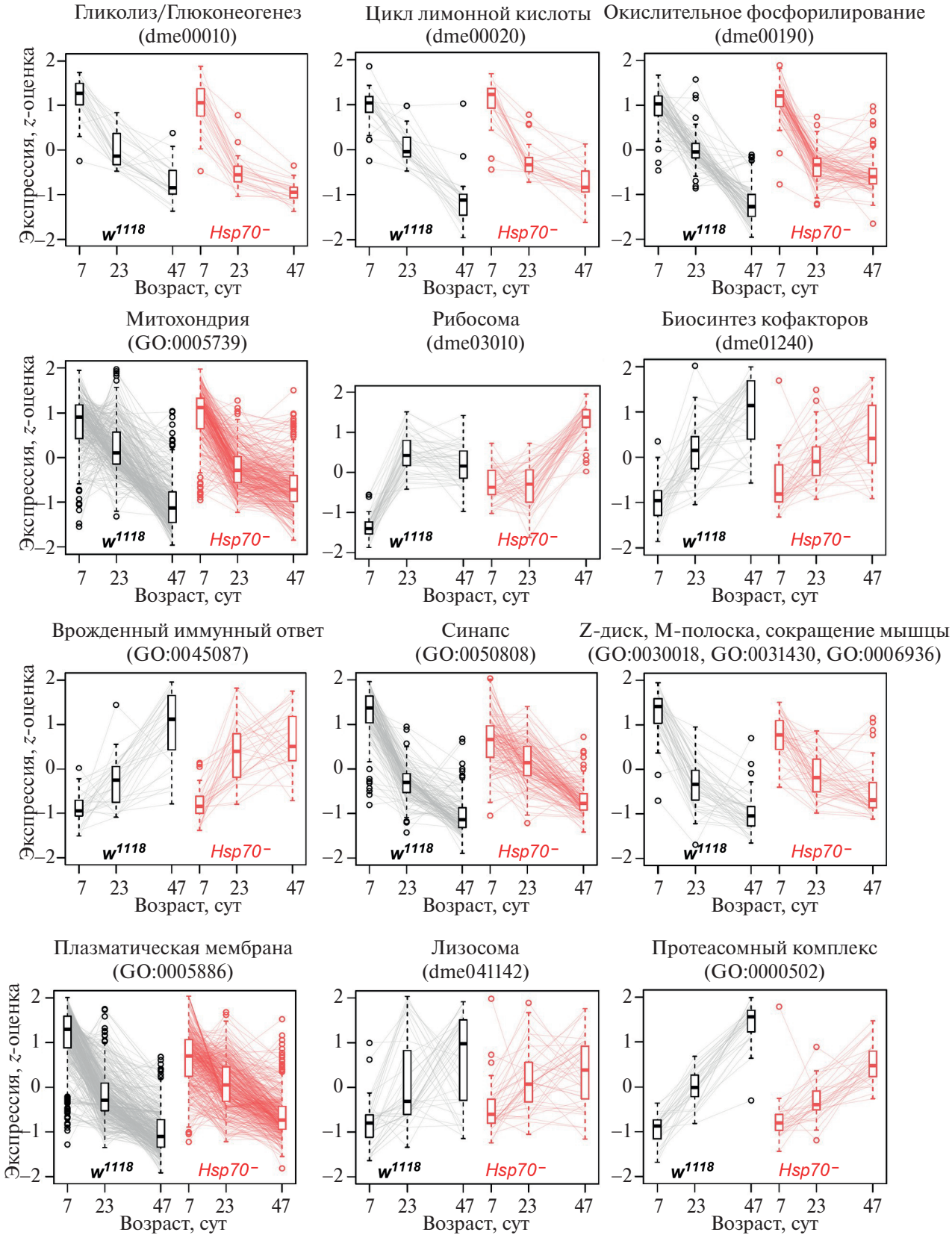
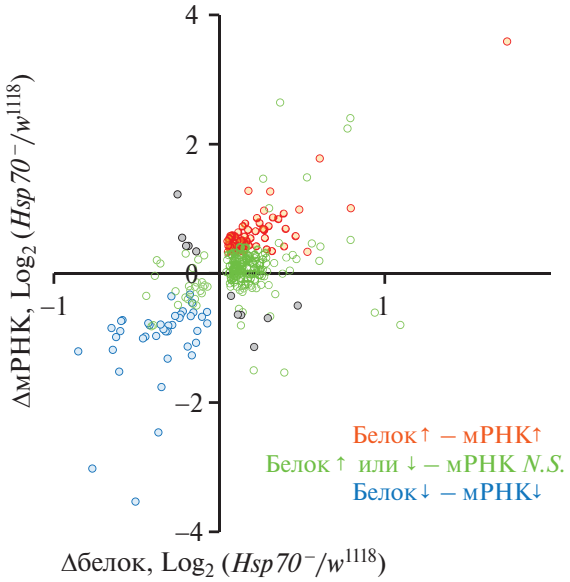


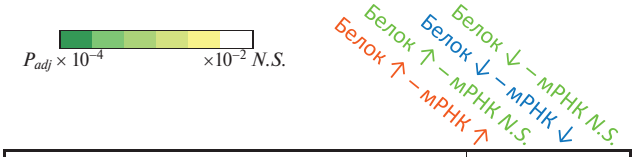
Рис. 3. Нокаут шести генов семейства *Hsp70* нарушает возрастную динамику экспрессии генов. Линией представлены величины нормированной экспрессии (*z*-шкала) каждого гена некоторых обогащенных функциональных групп из рис. 2*б* и *в*. Приведены названия и номера функциональных категорий; $n = 4$ пула (ноги 15 мух) каждой линии.

ны с категориями “рибосома” и “трансляция” и включали ряд рибосомных белков (рис. 4), в том числе важный регулятор трансляции – рибосомный белок S6 (RpS6). Белками, содержание которых снизилось на фоне снижения экспрессии их генов, обогащены категории “цитозоль”, “метаболизм” и “пентозофосфатный путь” (рис. 4*б*). Интересно, что среди белков, снижение содержания которых произошло без изменения экспрессии их генов, оказались че-

а



б



ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КАТЕГОРИЯ		КОЛ-ВО			
KEGG	OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	15			
KEGG	RIBOSOME		26		
GOCC	CYTOSOLIC RIBOSOME		26		
GOCC	RIBOSOME		25		
GOBP	CYTOPLASMIC TRANSLATION		26		
GOCC	CYTOSOLIC SMALL RIBOSOMAL SU		14		
GOCC	CYTOSOL			18	
KEGG	PENTOSE AND GLUCURONATE INTERCONVERSIONS			7	
KEGG	METABOLIC PATHWAYS			25	
KEGG	PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY			6	
GOBP	MITOCHONDRIAL ELECTRON TRA CYTOCHROME C TO OXYGEN				4

в

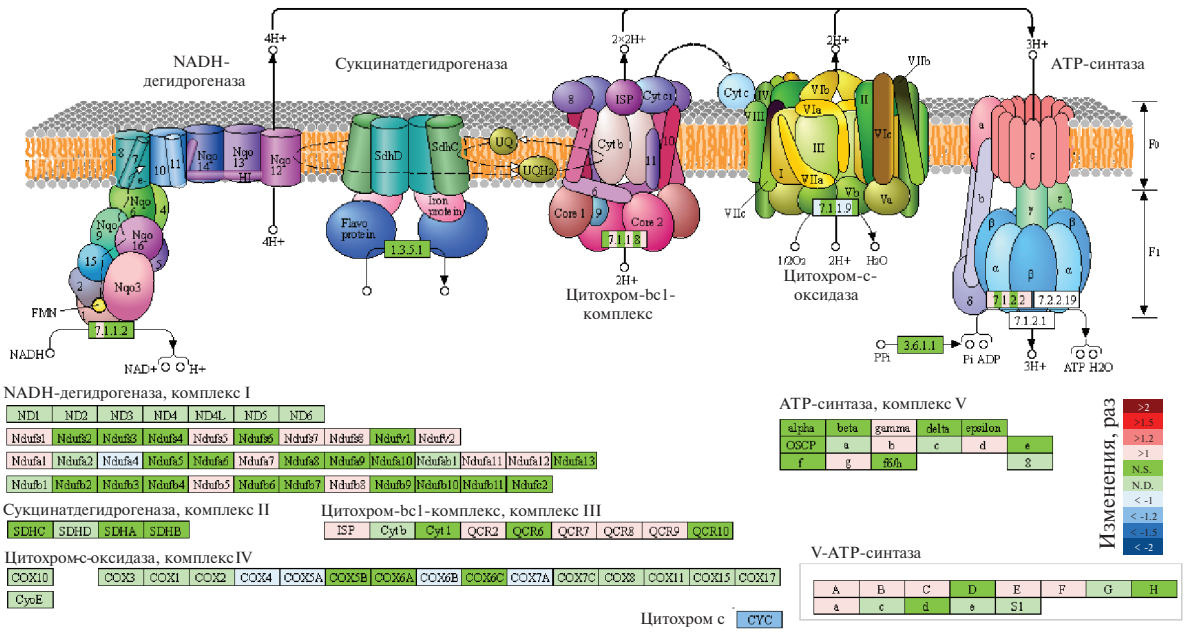


Рис. 4. Нокаут шести генов семейства *Hsp70* вызывает разнонаправленные изменения в содержании ключевых ферментов метаболизма глюкозы и жиров (гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса, бета-окисление и окислительное фосфорилирование) в мышцах ног 47-суточных мух. *а* – Изменения содержания мРНК и белка в скелетных мышцах ног мух $Hsp70^{-}$ относительно мух w^{1118}. мРНК $n = 4$ пула (ноги 15 мух) каждой линии; белок $n = 7–8$ пулов (ноги 10 мух) для каждой линии. *б* – Анализ функционального обогащения показал, что белками с разным паттерном регуляции на уровне мРНК обогащены различные функциональные категории. Представлено количество генов в каждой категории; тепловая карта показывает значение *p*. *в* – Разнонаправленные изменения содержания белков окислительного фосфорилирования в ногах 47-суточных мух $Hsp70^{-}$ и мух w^{1118} (см. рис. S1, Дополнительные материалы). N.S. – изменение содержания белка не детектировано; N.D. – белок не детектирован.

тыре субъединицы цитохромоксидазного комплекса III и цитохром *c* – терминальные участки электрон-транспортной цепи (рис. 4*б*,*в*), что говорит о разнонаправленной регуляции субъединиц ферментов дыхательных комплексов. Координированная экспрессия белков дыхательных комплексов важна для нормального окислительного фосфорилирования [51], тогда как нарушение стехиометрии может снизить устойчивость дыхательных комплексов к действию активных форм кислорода [52]. Эти рассуждения согласуются с повышенным содержанием у мух *Hsp70*¯ ферментов антиоксидантной защиты (каталаза [Cat]; тиоредоксинпероксидаза 1 [Jafrac1]; пероксиредоксин 5 [Prx5]; супероксид-дисмутаза 2 [Sod2]) (табл. S1, см. Дополнительные материалы), что можно рассматривать как компенсаторный ответ на увеличение повреждающего действия/продукции активных форм кислорода. Разнонаправленные изменения обнаружены и в случае таких ключевых путей энергетического метаболизма, как снижение содержания ферментов пентозофосфатного пути (отмечено выше), снижение и увеличение содержания различных ферментов гликолиза, цикла Кребса, транспорта и бета-окисления жирных кислот (рис. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/2/supp_Kukushkina_rus.zip).

Чем могут быть вызваны разнонаправленные изменения содержания ферментов энергетического метаболизма? Интересно, что делеция генов *Hsp70* привела к (компенсаторному) увеличению экспрессии других генов семейства *Hsp70* (*Hsc70-1* и *Hsc70-2*) и семейства *Hsp40* (*CG5504*, *CG7130*, *CG7394*, *CG32640*, *l*(*3*)*80Fg*), кодирующих важные регуляторы цикла шаперонов Hsp70, а также генов малых белков теплового шока (*CG7409*, *CG13133*, *Hsp23*, *Hsp26*, *Hsp27* и *Hsp67Bc*) (всего 13 из 75 экспрессируемых мРНК); при этом снижение экспрессии показано лишь у одного шаперона (*Sec63*) (табл. S2, см. Дополнительные материалы). Обнаружено также увеличение содержания малых белков теплового шока (CG7409, l(2)efl) и других белков-шаперонов (CG11267, Hsp60A) (всего 4 из 12 детектированных белков; табл. S2, см. Дополнительные материалы) в ногах мух линии *Hsp70*¯ по сравнению с контрольной линией. Нужно отметить, что разные семейства белков теплового шока регулируют специфические наборы белков, что, по-видимому, связано с их физико-химическими свойствами и клеточной локализацией [53, 54]. Белковые продукты нескольких генов с повышенной экспрессией (*CG5504*, *CG7394*, *CG11267* и *Hsp60A*) у мух *Hsp70*¯ локализуются в митохондриях, а малые белки теплового шока участвуют в регуляции морфологии и функции митохондрий [55]. Учитывая важную роль шаперонов в регуляции стабильности, протеолиза и транспорта/митохондриального импорта многих клеточных белков (и большинства митохондриальных белков) [9, 10], можно предположить, что разнонаправленные изменения экспрессии ряда ферментов энергетического метаболизма вызваны разнонаправленным изменением экспрессии шаперонов разных семейств. Интересно, что подобные изменения произошли на фоне увеличения экспрессии рибосомных белков (маркер производительности трансляционного аппарата) у мух *Hsp70*¯ (рис. 3, рис. 4*б* и рис. S1, см. Дополнительные материалы), что может быть дополнительным фактором, затрудняющим поддержание протеостаза в мышце.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами показано, что возрастное снижение скорости локомоций мух w^{1118} – показателя функционального состояния и выносливости – сопровождается выраженными изменениями транскриптомного профиля скелетных мышц ног, носящими консервативный характер. Это дополняет результаты предыдущих работ об использовании этой модели для исследования возрастных изменений скелетной мышцы [40–42].

Делеция шести генов *Hsp70* уменьшила медианную продолжительность жизни мух, однако не оказала негативного влияния на прирост продолжительности их жизни, вызванный длительным повышением двигательной активности. Это свидетельствует о контекстспецифичном и небольшом влиянии нокаута генов *Hsp70* на продолжительность жизни мух. Напротив, в тесте на отрицательный геотаксис (показатель, характеризующий выносливость) скорость локомоций у мух *Hsp70*¯ была значительно снижена, что происходило на фоне комплексных изменений возрастной динамики транскриптома мышц ног. Количественный протеомный анализ выявил у 47-суточных мух *Hsp70*¯ разнонаправленные изменения в содержании ключевых ферментов метаболизма глюкозы и окисления жиров (гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса, бета-окисление и окислительное фосфорилирование). Такая дисрегуляция может быть связана с компенсаторным увеличением экспрессии генов, кодирующих другие шапероны (этого и других семейств), которые регулируют специфичные для них наборы белков-мишеней.

Таким образом, нокаут шести генов *Hsp70* несколько уменьшает медианную продолжительность жизни мух, но выраженно снижает скорость их локомоций, что может быть связано с комплексными изменениями транскриптома

скелетных мышц ног и с разнонаправленными изменениями в содержании ключевых ферментов энергетического метаболизма.

Авторы благодарны Научно-исследовательскому институту биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (Москва) за возможность использования масс-спектрометрического оборудования центра коллективного пользования “Протеом человека”.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 21-15-00405.

В работе соблюдены все принципы ухода и использования животных.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Данные РНК-секвенирования, полученные в этом исследовании, доступны в базе данных NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) под номером GSE239395.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Furrer R., Handschin C. (2023) Drugs, clocks and exercise in ageing: hype and hope, fact and fiction. *J. Physiol*. **601**, 2057–2068.
2. Karakelides H., Irving B.A., Short K.R., O’Brien P., Nair K.S. (2010) Age, obesity, and sex effects on insulin sensitivity and skeletal muscle mitochondrial function. *Diabetes*. **59**, 89–97.
3. Cervenka I., Agudelo L.Z., Ruas J.L. (2017) Kynurenines: tryptophan’s metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science*. **357**, eaaf9794.
4. Demontis F., Piccirillo R., Goldberg A.L., Perrimon N. (2013) The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan. *Aging Cell*. **12**, 943–949.
5. Pedersen B.K., Febbraio M.A. (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol*. **8**, 457–465.
6. Pedersen B.K., Saltin B. (2015) Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. **25**(Suppl 3), 1–72.
7. Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. (2023) Hallmarks of aging: an expanding universe. *Cell*. **186**, 243–278.
8. Brocchieri L., Conway de Macario E., Macario A.J. (2008) *HSP70* genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol. Biol*. **8**, 19.
9. Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B. (2019) The Hsp70 chaperone network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **20**, 665–680.
10. Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N. (2019) Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **20**, 267–284.
11. Senf S.M. (2013) Skeletal muscle heat shock protein 70: diverse functions and therapeutic potential for wasting disorders. *Front. Physiol*. **4**, 330.
12. Henstridge D.C., Bruce C.R., Drew B.G., Tory K., Kolonics A., Estevez E., Chung J., Watson N., Gardner T., Lee-Young R.S., Connor T., Watt M.J., Carpenter K., Hargreaves M., McGee S.L., Hevener A.L., Febbraio M.A. (2014) Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. *Diabetes*. **63**, 1881–1894.
13. Chung J., Nguyen A.K., Henstridge D.C., Holmes A.G., Chan M.H., Mesa J.L., Lancaster G.I., Southgate R.J., Bruce C.R., Duffy S.J., Horvath I., Mestril R., Watt M.J., Hooper P.L., Kingwell B.A., Vigh L., Hevener A., Febbraio M.A. (2008) HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 1739–1744.
14. Chichester L., Wylie A.T., Craft S., Kavanagh K. (2015) Muscle heat shock protein 70 predicts insulin resistance with aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. **70**, 155–162.
15. Silverstein M.G., Ordanes D., Wylie A.T., Files D.C., Milligan C., Presley T.D., Kavanagh K. (2015) Inducing muscle heat shock protein 70 improves insulin sensitivity and muscular performance in aged mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. **70**, 800–808.
16. McArdle A., Dillmann W.H., Mestril R., Faulkner J.A., Jackson M.J. (2004) Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J*. **18**, 355–357.
17. Soler C., Daczewska M., Da Ponte J.P., Dastugue B., Jagla K. (2004) Coordinated development of muscles and tendons of the *Drosophila* leg. *Development*. **131**, 6041–6051.
18. Sujkowski A., Wessells R. (2018) Using *Drosophila* to understand biochemical and behavioral responses to exercise. *Exerc. Sport. Sci. Rev*. **46**, 112–120.
19. Sujkowski A., Ramesh D., Brockmann A., Wessells R. (2017) Octopamine drives endurance exercise adaptations in *Drosophila*. *Cell Rep*. **21**, 1809–1823.
20. Gong W.J., Golic K.G. (2004) Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster Hsp70* genes. *Genetics*. **168**, 1467–1476.
21. Han S.K., Lee D., Lee H., Kim D., Son H.G., Yang J.S., Lee S.V., Kim S. (2016) OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget*. **7**, 56147–56152.
22. Mendez S., Watanabe L., Hill R., Owens M., Moraczewski J., Rowe G.C., Riddle N.C., Reed L.K. (2016) The TreadWheel: a novel apparatus to measure genetic variation in response to gently induced exercise for *Drosophila*. *PLoS One*. **11**, e0164706.
23. Spierer A.N., Yoon D., Zhu C.T., Rand D.M. (2021) FreeClimber: automated quantification of climb-

ing performance in *Drosophila*. *J. Exp. Biol*. **224**, jeb229377.

24. Popov D.V., Makhnovskii P.A., Shagimardanova E.I., Gazizova G.R., Lysenko E.A., Gusev O.A., Vinogradova O.L. (2019) Contractile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. **316**, e605–e614.
25. Wisniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*. **6**, 359–362.
26. Popov D.V., Makhnovskii P.A., Zgoda V.G., Gazizova G.R., Vepkhvadze T.F., Lednev E.M., Motanova E.S., Lysenko E.A., Orlov O.I., Tomilovskaya E.S. (2023) Rapid changes in transcriptomic profile and mitochondrial function in human soleus muscle after 3-day dry immersion. *J. Appl. Physiol.* (*1985*). **134**, 1256–1264.
27. Yu S.H., Kyriakidou P., Cox J. (2020) Isobaric matching between runs and novel PSM-level normalization in MaxQuant strongly improve reporter ion-based quantification. *J. Proteome Res*. **19**, 3945–3954.
28. Shilova V.Y., Zatsepina O.G., Garbuz D.G., Funikov S.Y., Zelentsova E.S., Schostak N.G., Kulikov A.M., Evgen'ev M.B. (2018) Heat shock protein 70 from a thermotolerant Diptera species provides higher thermoresistance to *Drosophila* larvae than correspondent endogenous gene. *Insect. Mol. Biol*. **27**, 61–72.
29. Xiao C., Hull D., Qiu S., Yeung J., Zheng J., Barwell T., Robertson R.M., Seroude L. (2019) Expression of heat shock protein 70 is insufficient to extend *Drosophila melanogaster* longevity. *G3* (Bethesda). **9**, 4197–4207.
30. Campisi J., Kapahi P., Lithgow G.J., Melov S., Newman J.C., Verdin E. (2019) From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature*. **571**, 183–192.
31. Goh J., Wong E., Soh J., Maier A.B., Kennedy B.K. (2023) Targeting the molecular & cellular pillars of human aging with exercise. *FEBS J*. **290**, 649–668.
32. Bisset E.S., Heinze-Milne S., Grandy S.A., Howlett S.E. (2022) Aerobic exercise attenuates frailty in aging male and female C57Bl/6 mice and effects systemic cytokines differentially by sex. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. **77**, 41–46.
33. Garcia-Valles R., Gomez-Cabrera M.C., Rodriguez-Manas L., Garcia-Garcia F.J., Diaz A., Noguera I., Olaso-Gonzalez G., Vina J. (2013) Life-long spontaneous exercise does not prolong lifespan but improves health span in mice. *Longev. Healthspan*. **2**, 14.
34. Wen D.T., Zheng L., Ni L., Wang H., Feng Y., Zhang M. (2016) The expression of CG9940 affects the adaptation of cardiac function, mobility, and lifespan to exercise in aging *Drosophila*. *Exp. Gerontol*. **83**, 6–14.
35. Wen D.T., Wang W.Q., Hou W.Q., Cai S.X., Zhai S.S. (2020) Endurance exercise protects aging *Drosophila* from high-salt diet (HSD)-induced climbing capacity decline and lifespan decrease by enhancing antioxidant capacity. *Biol. Open*. **9**, bio045260.
36. Li Q.F., Wang H., Zheng L., Yang F., Li H.Z., Li J.X., Cheng D., Lu K., Liu Y. (2019) Effects of modest hypoxia and exercise on cardiac function, sleep-activity, negative geotaxis behavior of aged female *Drosophila*. *Front Physiol*. **10**, 1610.
37. Ebanks B., Wang Y., Katyal G., Sargent C., Ingram T.L., Bowman A., Moisoi N., Chakrabarti L. (2021) Exercising *D. melanogaster* modulates the mitochondrial proteome and physiology. The effect on lifespan depends upon age and sex. *Int. J. Mol. Sci*. **22**, 11606.
38. Piazza N., Gosangi B., Devilla S., Arking R., Wessells R. (2009) Exercise-training in young *Drosophila melanogaster* reduces age-related decline in mobility and cardiac performance. *PLoS One*. **4**, e5886.
39. Sujkowski A., Bazzell B., Carpenter K., Arking R., Wessells R.J. (2015) Endurance exercise and selective breeding for longevity extend *Drosophila* health span by overlapping mechanisms. *Aging* (Albany NY). **7**, 535–552.
40. Demontis F., Piccirillo R., Goldberg A.L., Perrimon N. (2013) Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. *Dis. Model. Mech*. **6**, 1339–1352.
41. Hunt L.C., Jiao J., Wang Y.D., Finkelstein D., Rao D., Curley M., Robles-Murguia M., Shirinifard A., Pagala V.R., Peng J., Fan Y., Demontis F. (2019) Circadian gene variants and the skeletal muscle circadian clock contribute to the evolutionary divergence in longevity across *Drosophila* populations. *Genome Res*. **29**, 1262–1276.
42. Chechenova M., Stratton H., Kiani K., Gerberich E., Alekseyenko A., Tamba N., An S., Castillo L., Czajkowski E., Talley C., Bryantsev A. (2023) Quantitative model of aging-related muscle degeneration: a *Drosophila* study. *bioRxiv*. Feb. 21, 2023.02.19.529145 doi: https://doi.org/10.1101/2023.02.19.529145
43. Borsch A., Ham D.J., Mittal N., Tintignac L.A., Migliavacca E., Feige J.N., Ruegg M.A., Zavolan M. (2021) Molecular and phenotypic analysis of rodent models reveals conserved and species-specific modulators of human sarcopenia. *Commun. Biol*. **4**, 194.
44. Lagerwaard B., Nieuwenhuizen A.G., Bunschoten A., de Boer V.C.J., Keijer J. (2021) Matrisome, innervation and oxidative metabolism affected in older compared with younger males with similar physical activity. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*. **12**, 1214–1231.
45. Su J., Ekman C., Oskolkov N., Lahti L., Strom K., Brazma A., Groop L., Rung J., Hansson O. (2015) A novel atlas of gene expression in human skeletal muscle reveals molecular changes associated with aging. *Skelet. Muscle*. **5**, 35.
46. Hunt L.C., Graca F.A., Pagala V., Wang Y.D., Li Y., Yuan Z.F., Fan Y., Labelle M., Peng J., Demontis F. (2021) Integrated genomic and proteomic analyses identify stimulus-dependent molecular changes associated with distinct modes of skeletal muscle atrophy. *Cell Rep*. **37**, 109971.

47. Wheeler J.C., Bieschke E.T., Tower J. (1995) Muscle-specific expression of *Drosophila hsp70* in response to aging and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 10408–10412.

48. Попов Д.В., Виноградова О.Л., Згода В.Г. (2019) Подготовка образцов скелетной мышцы человека для протеомных исследований с использованием изобарической метки iTRAQ. *Молекуляр. биология*. **53**, 685–691.

49. Deshmukh A.S., Murgia M., Nagaraj N., Treebak J.T., Cox J., Mann M. (2015) Deep proteomics of mouse skeletal muscle enables quantitation of protein isoforms, metabolic pathways, and transcription factors. *Mol. Cell Proteomics.* **14**, 841–853.

50. Makhnovskii P.A., Zgoda V.G., Bokov R.O., Shagimardanova E.I., Gazizova G.R., Gusev O.A., Lysenko E.A., Kolpakov F.A., Vinogradova O.L., Popov D.V. (2020). Regulation of proteins in human skeletal muscle: the role of transcription. *Sci. Rep.* **10**, 3514.

51. Rudler D.L., Hughes L.A., Viola H.M., Hool L.C., Rackham O., Filipovska A. (2021) Fidelity and coordination of mitochondrial protein synthesis in health and disease. *J. Physiol*. **599**, 3449–3462.

52. Khalimonchuk O., Bird A., Winge D.R. (2007) Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem*. **282**, 17442–17449.

53. Mymrikov E.V., Daake M., Richter B., Haslbeck M., Buchner J. (2017) The chaperone activity and substrate spectrum of human small heat shock proteins. *J. Biol. Chem*. **292**, 672–684.

54. Bo Zheng N., Ruan L., Kline J.T., Omkar S., Sikora J., Texeira Torres M., Wang Y., Takakuwa J.E., Huguet R., Klemm C., Segarra V.A., Winters M.J., Pryciak P.M., Thorpe P.H., Tatebayashi K., Li R., Fornelli L., Truman A.W. (2022) Comprehensive characterization of the Hsp70 interactome reveals novel client proteins and interactions mediated by posttranslational modifications. *PLoS Biol*. **20**, e3001839.

55. Adriaenssens E., Asselbergh B., Rivera-Mejias P., Bervoets S., Vendredy L., De Winter V., Spaas K., de Rycke R., van Isterdael G., Impens F., Langer T., Timmerman V. (2023) Small heat shock proteins operate as molecular chaperones in the mitochondrial intermembrane space. *Nat. Cell Biol*. **25**, 467–480.

Knockout of *Hsp70* Genes Modulates Age-Related Transcriptomic Changes in Leg Muscles, Reduces Locomotion Speed and Lifespan of *Drosophila melanogaster*

I. V. Kukushkina[1,2], P. A. Makhnovskii[1], V. G. Zgoda[3], N. S. Kurochkina[1], D. V. Popov[1]*

[1]*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences*, *Moscow*, *123007 Russia*
[2]*Lomonosov Moscow State University*, *Moscow*, *119234 Russia*
[3]*Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry*, *Moscow*, *119121 Russia*
**e-mail*: *danil-popov@yandex.ru*

The study investigated the effect of knockout of six *Hsp70* genes (orthologues of the mammalian genes *Hspa1a*, *Hspa1b*, *Hspa2* and *Hspa8*) on age-related changes in gene expression in the legs of *Drosophila melanogaster*, which contain predominantly skeletal muscle bundles. For this, the leg transcriptomic profile was examined in males of the w^{1118} control line and the $Hsp70^{-}$ line on the 7th, 23rd and 47th days of life. In w^{1118} flies, an age-related decrease in the locomotion (climbing) speed (a marker of functional state and endurance) was accompanied by a pronounced change in the transcriptomic profile of the leg skeletal muscles, which is conservative in nature. In $Hsp70^{-}$ flies, the median lifespan was shorter and the locomotion speed was significantly lower compare to the control; at the same time, complex changes in the age-related dynamics of the skeletal muscle transcriptome were observed. Mass spectrometry-based quantitative proteomic showed that 47-day-old $Hsp70^{-}$ flies, compared with w^{1118}, demonstrated multidirectional changes in the content of key enzymes of glucose metabolism and fat oxidation (glycolysis, pentose phosphate pathway, Krebs cycle, beta-oxidation and oxidative phosphorylation). Such dysregulation may be associated with a compensatory increase in the expression of other genes encoding chaperones (small *Hsp*, *Hsp40*, *60*, and *70*), which regulate specific sets of target proteins. Taken together, our data show that knockout of six *Hsp70* genes slightly reduces the median lifespan of flies, but significantly reduces the locomotion speed, which may be associated with complex changes in the transcriptome of the leg skeletal muscles and with multidirectional changes in the content of key enzymes of energy metabolism.

Keywords: skeletal muscle, aging, heat shock proteins, transcriptome, proteome