



ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО 20-ГИДРОКСИЭКДИЗОНА И S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЭКДИЗОНА *EcR* У КОМНАТНОЙ МУХИ *MUSCA DOMESTICA L.*

Никоноров Ю.М., Ахметкиреева Т.Т., Беньковская Г.В.*

Институт биохимии и генетики Уфимского исследовательского центра РАН,
Россия, 450054 Уфа, проспект Октября, 71, e-mail: bengal2@yandex.ru

Резюме

Стероидный гормон 20-гидроксиэкдизон (20E) инициирует у насекомых запуск личиночных линек, процессы метаморфоза, регулирует репродукцию. Основным рецептором 20E служит гетеродимер, состоящий из белков *EcR* и *USP*. Кодированный экдизоновый рецептор ген *EcR* является ключевым элементом регуляции генных сетей, включающих в себя значительную часть генов, отвечающих за рост и развитие, а также воспроизводство потомства и реакцию организма на неблагоприятные факторы окружающей среды. Источник метильных групп S-аденозилметионин (SAM) используется в процессе синтеза ювенильного гормона (JH), метилировании гистоновых белков и ДНК. Основной целью исследования было определение транскрипционной активности гена рецептора экдизона *EcR* комнатной мухи *Musca domestica L.* при включении в пищевой рацион нелетальных доз 20E и SAM. Эксперименты проводились на личинках и имаго лабораторных линий комнатной мухи *Shgen* и *Lgen* с различной продолжительностью жизни имаго. Изменения в содержании транскриптов гена *EcR* в общем пуле мРНК клеток мышечной ткани и гонад, а также уровень метилирования ДНК в его 5'-концевом участке регистрировались с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Проведенные нами исследования позволяют предположить наличие механизма регуляции экспрессии гена *EcR* у *M. domestica*, чувствительного к воздействию экзогенного 20E и теплового стресса (ТС), а также к присутствию в пище SAM. Вариации в количественных соотношениях 5'-и 3'-концевых областей мРНК гена *EcR M. domestica* в зависимости от типа тканей, пола и возраста свидетельствуют в пользу гипотезы о возможности кодирования этим геном нескольких изоформ белка *EcR*. Обнаруженные изменения в статусе метилирования ДНК в 5'-концевой области гена и колебания в представленности различных участков мРНК после обработки SAM позволяют предполагать вовлеченность процессов метилирования/деметиления ДНК в регуляцию экспрессии гена *EcR M. domestica*.

Ключевые слова: Рецептор экдизона, *Musca domestica*, 20-гидроксиэкдизон, S-аденозилметионин, метилирование ДНК.

Цитирование: Никоноров Ю.М., Ахметкиреева Т.Т., Беньковская Г.В. Влияние экзогенного 20-гидроксиэкдизона и S-аденозилметионина на транскрипционную активность гена рецептора экдизона *EcR* у комнатной мухи *Musca domestica L.* // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 480-491. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-42

© Авторы

EFFECT OF 20-HYDROXYECDYSONE AND S-ADENOSYLMETHIONINE ON THE ECDYSONE RECEPTOR GENE *ECR* TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY IN HOUSEFLY *MUSCA DOMESTICA L.*

Nikonorov Yu. M., Akhmetkireeva T.T., Benkovskaya G.V.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Prospekt Oktyabrya, 71, Ufa, 450054, Russia, e-mail: bengal2@yandex.ru

Resume

Steroid hormone 20-hydroxyecdysone (20E) initiates larval molting start and metamorphosis and regulates reproduction. Its basic receptor is heterodimer including proteins *EcR* and *USP*. Ecdysone receptor gene

EcR coding protein EcR is a key regulatory element of gene circuits cover considerable part of genes, implicated in growth and development as well as in reproduction of progeny and reactions of organisms to unfavorable factors of environment. The source of methyl groups S-adenosylmethionine (SAM) is in use for biosynthesis of juvenile hormone (JH), methylation of histone proteins and DNA. The main aim of our investigation was evaluation of transcriptional activity of housefly *Musca domestica* ecdysone receptor gene *EcR* under adding into ration of 20E and SAM in non-lethal concentrations. Experiments were carried out with larvae and adults of housefly from laboratory strains *Shgen* and *Lgen* differ in life span of adults. Change of gene *EcR* transcripts content in common pool of mRNA in the cells of muscles and gonads, as well as DNA methylation level in 5'-terminal site registered by quantitative real time PCR (RT-PCR). The results of our investigations allow us to suggest existence of mechanism for regulating expression of the *EcR* gene in *M. domestica* which is sensitive to exogenic 20E and heat stress action as well as to presence of SAM in food. Variations in the mRNA quantitative ratios of *EcR* gene 5'-and 3'-terminal regions depending on tissue type, gender and age support the hypothesis that this gene can encode several isoforms of the protein EcR. The detected changes in the status of DNA methylation in the 5'-terminal region of the gene and fluctuations in the representation of different mRNA sites after SAM processing suggest the involvement of DNA methylation/demethylation processes in the regulation of *EcR* gene expression in *M. domestica*.

Key words: Ecdysone receptor; *Musca domestica*; 20-hydroxyecdysone; S-adenosylmethionine; DNA methylation.

Citation: Nikonorov Yu. M., Akhmetkireeva T.T., Benkovskaya G.V. effect of 20-Hydroxyecdysone and S-adenosylmethionine on the ecdysone receptor gene *EcR* transcriptional activity in housefly *Musca domestica* L. *Biomics*. V.12(4). P. 480-491. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-42 (In Russian)

© The Authors

Введение

Рост, линька и развитие насекомых (включая метаморфоз и созревание гонад) регулируются стероидным гормоном 20-гидроксиэктизоном (20E) и сесквитерпеноидным ювенильным гормоном (ЮГ, JH), действующими синхронно, взаимно дополняя и усиливая влияние друг друга [Riddiford, 2012]. Эктистероиды и ювеноиды задействуются в стресс-реакции насекомых и в адаптиогенезе. Важнейшим критерием приспособленности является успешное воспроизводство адаптированного потомства [Raushenbach et al., 1987]. Различные ткани используют одни и те же гормональные сигналы в виде определённых титров эктистероидов и ЮГ для инициации отдельных фаз развития [Andres et al., 1993]. У плодовой мушки *D. melanogaster* практически все ткани являются мишенями для этих гормонов, что предполагает наличие универсального механизма реализации сигнальных титров 20E и ЮГ в регуляции транскрипционной активности целых паттернов генов, проявляющегося в активации специфического по времени и месту пуффинга [Russel, Ashburner, 1996]. Представляется чрезвычайно интересным исследование последствий для онтогенетических процессов и устойчивости к стрессовым воздействиям поступления с пищей экзогенного эктистерона (20E) и ЮГ, а также необходимых для их синтеза компонентов.

Ключевым элементом избирательной каскадной активации эктистероидами отдельных элементов генной сети на разных фазах развития является продукт гена *EcR* - эктизоновый рецептор, который принадлежит к

суперсемейству ядерных стероидных рецепторов, имеющих ДНК- и лигандсвязывающий домены [Talbot et al., 1993]. Активный эктизоновый рецептор представляет собой гетеродимер, включающий в себя одну из изоформ белка EcR, различающихся своими N-концевыми областями, и белок USP, кодируемый геном *ultraspiracle (usp)* [Thomas et al., 1993]. Гетеродимер связывает эктистероиды и элементы ответа рецептора эктизона и активирует транскрипцию генов-респондеров эктизона [Riddiford et al., 2000]. ЮГ и его метаболиты, специфически связываясь с USP-белком, изменяют его конформацию и индуцируют олигомеризацию, влияя на его доступность для формирования гетеродимеров эктизонового рецептора и регулируя его активность, что в значительной мере объясняет возникающие эффекты при взаимодействии 20E и ЮГ [Fang et al., 2005].

Высказано предположение, что механизм поддержания соотношения различных изоформ белка EcR в клетках соответствующих тканей используется в регуляции дифференциальной экспрессии генов-респондеров эктизона [Watanabe et al., 2010]. Обнаружение вариаций в соотношении изоформ белка EcR в различных тканях во время онтогенеза позволило установить их специализацию на определенных функциях. EcR-B у *D. melanogaster* необходим для прохождения личиночных линек и ремоделинга нейронов во время метаморфоза [Mouillet et al., 2001]; EcR-A преимущественно присутствует в делящихся клетках во время метаморфоза и необходим в процессах, происходящих на стадии имаго [Talbot et al., 1993]. К сожалению, на сегодняшний день экспериментальные

данные о функциональной нагрузке различных областей гена *EcR*, доменной структуре самого белка, соответствии предсказанных и реальных границ экзонов и интронов, и тем более, о наличии альтернативных изоформ белка у *M. domestica* в публикациях отсутствуют.

Участие процессов метилирования/деметилирования ДНК в кодирующей области гена *EcR* в регуляции его экспрессии у насекомых практически не исследовано. Универсальный источник метильных групп, S-аденозилметионин (SAM), используется в организме насекомых не только для метилирования ДНК, РНК и гистоновых белков, но и при синтезе метилфарнезоата, предшественника одной из активных форм ЮГ (JH3), необходимой для развития имаго насекомых и закладки и созревания репродуктивных органов [Jindra et al., 2013; Toyota et al., 2015]. Получаемые с пищей дополнительные объемы экистероидов и источников метильных групп могут стать причиной различных фенотипических эффектов сбоя в гормональном балансе организма насекомого, а также оказать прямое или опосредованное влияние на транскрипционную активность гена рецептора экидизона *EcR*. В наших экспериментах, проводимых на лабораторных линиях комнатной мухи, различающихся по продолжительности жизни и срокам массового размножения, мы поставили перед собой задачу по исследованию экспрессии гена *EcR* в условиях включения в пищевой рацион насекомых веществ, потенциально имеющих значение регуляторов транскрипционной активности.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на личинках и имаго комнатной мухи из лабораторных линий Коллекции лабораторных насекомых Института биохимии и генетики УФИЦ РАН (№ в системе ИСГЗ 0104-2016-0001) *Shgen* и *Lgen* с сокращенной и увеличенной продолжительностью жизни имаго, соответственно [Benkovskaya, 2011]. Насекомые содержались в лабораторных условиях в соответствии с правилами, принятыми для ЦКП «Коллекция лабораторных насекомых» Института биохимии и генетики УФИЦ РАН [Беньковская (Benkovskaya), 2017]. Весь цикл развития комнатной мухи во время проведения экспериментов проходил при температуре 20-26°C и освещении с периодом день/ночь 12:12 ч.

Линия *Shgen* прошла ко времени начала исследований 95 поколений селекции, минимальная продолжительность жизни в этой линии составляет 22.3 ± 1.9 сут, максимальная – 42.0 ± 3.3 сут. Линия *Lgen*, селекционируемая на повышенную продолжительность жизни, прошла 65 поколений селекции, и соответствующие показатели для нее составляют 46.3 ± 3.8 сут и 67.5 ± 4.5 сут. Достоверность различий в сроках жизни имаго между линиями короткоживущих и долгоживущих, оцененная по критерию Уилкоксона, статистически значима ($p < 0.01$).

В ходе экспериментов 20Е, выделенный из растения *Serratula coronata* сотрудниками ИНК УФИЦ РАН [Odinokov et al., 2002], был использован в нескольких вариантах.

1. Кратковременное воздействие на личиночной стадии. Личинок III возраста (7-суточных) из линий *Shgen* и *Lgen* на 1 час помещали в чашки Петри с фильтрами, импрегнированными водным раствором 20Е ($2 \cdot 10^{-7}$ М, 0.5 мл на фильтр, 2 фильтра на чашку) по 20 особей в 3-х кратной повторности. В контрольном варианте фильтры обрабатывали стерильной водой.

2. Длительное воздействие в период завершения личиночного развития и метаморфозов. Личинки III возраста (5-суточные) линий *Lgen* и *Shgen* были разделены на 2 группы. Личинки из контрольной группы продолжали свое развитие в обычном субстрате, а из опытной группы – на субстрате с добавлением 20Е (в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М, 3-х кратная повторность по 50 личинок в контейнерах объемом 100 см³). После завершения 48-часовой экспозиции во всех вариантах были отобраны по 2 повторности по 3 личинки для выделения РНК. Оставшиеся личинки были пересажены в субстрат без добавок для дальнейшего развития.

3. Воздействие на имаго. Имаго линии *Shgen* (F 95) получали 20Е с водой ($2 \cdot 10^{-7}$ М) в течение 24 часов сразу после выхода из куколки, после чего поилки заменялись содержащими обычную воду или SAM.

Тепловой стресс (ТС) проводили на личинках III возраста. На 7-е сутки развития половину личинок из всех вариантов опыта с кратковременным воздействием 20Е подвергали тепловому стрессу (+40°C, 10 мин) в индивидуальных микроцентрифужных пробирках объемом 1.5 мл. Через 30 мин после завершения экспозиции во всех вариантах были отобраны по 3 личинки в двух повторностях для выделения РНК.

Для обработки SAM (Гептрал) имаго комнатной мухи использовали поилки с водой, содержащей SAM в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М. Поилки помещали в садки на 5 суток спустя 24 часа после выхода имаго, затем заменяли обычными. В опыте с предварительной обработкой имаго линий *Shgen* 20Е действию SAM подвергали половину особей контрольной группы и половину особей, получавших в течение первых 24 часов имагинальной стадии воду с добавкой 20Е ($2 \cdot 10^{-7}$ М). Мышечно-покровные ткани личинок III возраста получали, полностью удаляя внутренние органы и переднюю часть тела личинки. Для получения гомогената на стадии 1-суточного пупария удаляли верхнюю часть кокона. Прокалывали наконечником поверхность и отбирали содержимое пупария. Для выделения ДНК на стадии имаго брали освобожденные от покровов мышцы торакса. В экспериментах использовали индивидуально выделенную ДНК из 3-4

особей во всех вариантах. Экстракцию ДНК из предварительно гомогенизированных и инкубированных с протеиназой К в течение ночи тканей осуществляли фенол-хлороформной смесью (1:1). Депротеинизированную ДНК осаждали двумя объемами 96% этанола. Промытый 70%-ным этанолом после центрифугирования осадок ДНК растворяли в бидистиллированной воде. При оценке статуса метилирования энзиматический гидролиз ДНК (20-30 нг) соответствующими ферментами, используя по 5-10 ед. рестриктаз *EcoRI*, *MspI* и *HpaII* (СибЭнзим, Россия) на образец, проводили в рекомендуемых фирмой-производителем условиях в течение 16 час.

Тотальную РНК выделяли с помощью набора РНК-Экстран («Синтол», Россия), содержащего реагент Trizol по соответствующему протоколу. Конверсию РНК в реакции с обратной транскриптазой (построение кДНК) осуществляли с использованием набора той же фирмы. В качестве затравок использовали 300 нмоль олиго-дТ (dT18) или 600 нмоль гексануклеотидного праймера (N6) со случайной последовательностью.

Реакцию амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2-3 нг рестрицированной ДНК (или 2-3 мкл кДНК) и интеркалирующий краситель SYBR Green I в составе ПЦР-микса (Синтол, Россия) в пробирках объемом 0.2 мл на термоблокере RotorGene 6000 фирмы Corbett Research (Австралия). Для анализа относительного уровня экспрессии генов применяли 2-ΔΔСТ метод [Livak, Schmittgen, 2001]. В качестве референсных использовали гены актина (*act*) (NCBI, GenBank, AC JN969088) и рибосомного белка RP49 (*rp49*) *M. domestica* [Codd et al., 2007], относительно мРНК которых рассчитывалось содержание мРНК

исследуемого гена *EcR*. В качестве праймеров для амплификации использовали олигонуклеотиды, специфичные к кодирующей области гена *EcR M. domestica*: *ecd1* - cgggcatcgggttatcactac, *ecd2* - ttttcaggcggcactcttg, *ecd3* - ctgtgagggtgtaagggttct, *ecd4* - ctggttctctgggactacacattc, *ecd5* - cagcgtggccacctcatc, *ecd6* - tcatcgccatcttcaccaccat. Последовательности праймеров подбирались с использованием пакета программ Lasergene (DNASTAR, США). Статистическую обработку результатов с использованием теста Манна-Уитни проводили с использованием пакета программ Excel.

Результаты и обсуждение

Основное внимание в нашей работе мы уделили исследованию влияния на экспрессию гена *EcR* экзогенных факторов, провоцирующих гормональные сдвиги на различных стадиях онтогенеза комнатной мухи – экдистерона (20E) и источника метильных групп S-аденозилметионина (SAM). Последовательность фрагмента кДНК гена *EcR* комнатной мухи, полученная в ходе биоинформатического исследования по результатам секвенирования генома *M. domestica* лабораторной линии *aaby*s (PRJNA210139), представлена в банке данных GenBank, NCBI, AC XM_005187389 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/755885941/>).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *EcR M. domestica* и других представителей *Diptera* позволяет построить физическую карту кодирующей области (без интронов) гена с указанием предсказанных с некоторым приближением границ ДНК- и лигандсвязывающих доменов и его областей, исследованных нами с помощью метода ПЦР-РВ (см. рис 1.).

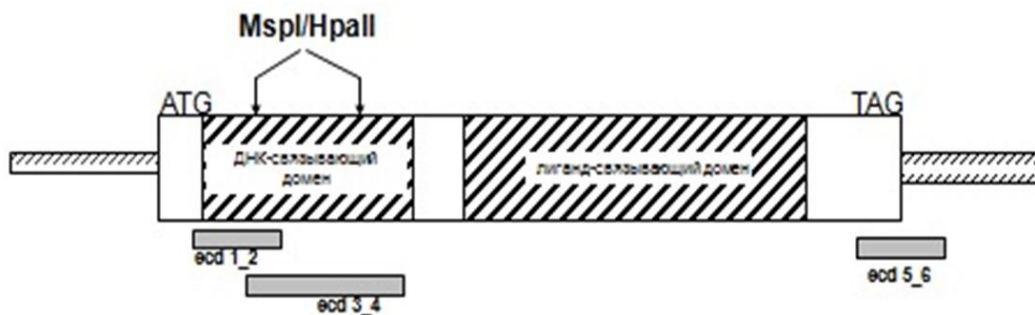


Рис. 1. Структурная организация гена рецептора экдизона *M. domestica*. На физической карте гена *EcR* (AC XM_005187389) указаны расположение ДНК- и лиганд-связывающих доменов, сайты для рестриктаз *MspI/HpaII* и границы ампликонов, образующихся при ПЦР с указанными сочетаниями праймеров. Размеры ампликонов: *ecd1_2* - 161 п.н. (включает в себя один сайт *MspI/HpaII*), *ecd3_4* - 179 п.н. (два сайта *MspI/HpaII*), *ecd5_6* - 166 п.н. (нет сайтов для *MspI/HpaII*).

Fig.1. Structural organization of the *M. domestica* ecdysone receptor gene. At the physical map of *EcR* gene (AC XM_005187389) indicated DNA-binding and ligand-binding domains arrangement, sites of restrictases *MspI/HpaII* and boundaries of amplicones obtained by PCR with marked combinations of primers. Dimensions of amplicones: *ecd1_2* – 161 b.p. (including 1 site of *MspI/HpaII*); *ecd3_4* – 179 b.p. (2 sites of *MspI/HpaII*); *ecd5_6* – 166 b.p. (no sites of *MspI/HpaII*).

Использование нескольких наборов праймеров, специфичных к различным участкам гена *EcR* (рис.1), позволило нам определить количественные соотношения между содержанием 5'- и 3'- концевых областей мРНК в клетках различных тканей, а также оценить уровень метилирования ДНК на выбранном участке 5'- концевой области гена *EcR*

комнатной мухи *M. domestica* методом ПЦР-РВ после расщепления ее рестрикционными эндонуклеазами, чувствительными к метилированию.

В табл.1 и табл. 2 приведены результаты экспериментов, отличающихся по продолжительности экспонирования личинок в среде, содержащей 20E.

Таблица1.

Влияние кратковременной обработки личинок III возраста линий *Shgen* и *Lgen* 20E и теплового стресса на содержание мРНК гена *EcR* в покровно-мышечных тканях

Варианты		Содержание мРНК гена <i>EcR</i> при использовании различных затравок в ревертазной реакции		Соотношение продуктов ПЦР dT18/N6
		Олиго-дТ (dT18)	6-звенный праймер (N6)	
Линия <i>Shgen</i>	1	0.000272±0.000032	0.002022±0.000273	0.13
	2	0.000742±0.000221 ^{a*}	0.007140±0.001857 ^{a**}	0.10
	3	0.000535±0.000112 ^{a*}	0.003826±0.000821	0.14
	4	0.000405±0.000082 ^{a*}	0.002560±0.000345	0.16
Линия <i>Lgen</i>	1	0.000090±0.000047 ^{b**}	0.001017±0.000413 ^{b*}	0.09
	2	0.000566±0.000058 ^{a***}	0.004216±0.00054 ^{a***; b*}	0.13
	3	0.000817±0.000115 ^{a***; b*}	0.004613±0.000711 ^{a***}	0.17
	4	0.000630±0.000119 ^{a**; b*}	0.003044±0.000608 ^{a**}	0.21

Статистическая значимость различий: а – с контролем для линии; b – с аналогичным вариантом из линии *Shgen*. * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$. Обозначения вариантов: 1 – контроль; 2 – обработка 20E; 3 – тепловой стресс; 4 – тепловой стресс на фоне действия 20E.

Table 1. - Effect of short-term treatment of III instar larvae from strains *Shgen* and *Lgen* by 20E and heat stress on gene *EcR* mRNA content in cuticle-muscle tissues.

Variants		mRNA content of the <i>EcR</i> gene when using different primers in the revertase reaction		Ratio of PCR products dT18/N6
		Oligo-dT (dT18)	6-link primer (N6)	
Strain <i>Shgen</i>	1	0.000272±0.000032	0.002022±0.000273	0.13
	2	0.000742±0.000221 ^{a*}	0.007140±0.001857 ^{a**}	0.10
	3	0.000535±0.000112 ^{a*}	0.003826±0.000821	0.14
	4	0.000405±0.000082 ^{a*}	0.002560±0.000345	0.16
Strain <i>Lgen</i>	1	0.000090±0.000047 ^{b**}	0.001017±0.000413 ^{b*}	0.09
	2	0.000566±0.000058 ^{a***}	0.004216±0.00054 ^{a***; b*}	0.13
	3	0.000817±0.000115 ^{a***; b*}	0.004613±0.000711 ^{a***}	0.17
	4	0.000630±0.000119 ^{a**; b*}	0.003044±0.000608 ^{a**}	0.21

Significant differences: a – against control variant; b – against analogous variant in *Shgen* strain. * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$. Variants: 1 – control; 2 – treatment by 20E; 3 – heat stress; 4 – heat stress against the background of 20E influence.

Для сравнения, в схему эксперимента, наряду с обработкой 20E, были введены варианты с кратковременным воздействием повышенной температуры (ТС), и их комбинацией (20E+ТС), когда температурному воздействию предшествует предварительное выдерживание личинок на субстрате, содержащем 20E. Эксперимент с кратковременной обработкой 20E на стадии личинки (табл. 1) показал, что непосредственным ответом на нее является повышение относительного содержания участка мРНК

гена *EcR*, ограниченного праймерами *ecd3* и *ecd4*, в мышечных тканях личинок обеих линий.

Последствия стимуляции транскрипции мРНК обработкой экдизоном отчетливо выражены на момент выделения РНК - 2 часа после начала экспозиции (60 мин экспозиции с 20E, 10 мин ТС в тех вариантах, где он есть, 30 мин реабилитации, 20 мин на препарирование и гомогенизацию тканей).

Сходный эффект наблюдается в вариантах с тепловым стрессом и с комбинированным воздействием. На клетках эпидермиса в системе *in*

in vitro табачного бражника *Manduca sexta* показано, что пик в содержании тотальной мРНК гена *EcR* достигается через 3 часа после индукции 20E, с последующим снижением к 6 часам [Jindra et al., 1996]. Установлено, что применение ингибиторов белкового синтеза предотвращает снижение содержания мРНК, т.е. в регуляцию экспрессии гена *EcR* вовлечены белковые продукты генов, индуцируемых 20E.

Особенностью линии *Lgen* является пониженное в 2-3 раза по сравнению с *Shgen* содержание мРНК гена *EcR* в контрольном варианте и способность существенно повысить его после теплового стресса и обработки экзогенным экдизоном или же их комбинированного воздействия. В линии *Lgen*, селекция в которой велась по признаку повышенной продолжительности жизни имаго, по всей видимости, этот фенотип связан с супрессией активности гена *EcR* при содержании в лабораторных условиях, отменяющейся при различных стрессах. Увеличение продолжительности жизни вследствие мутаций, ведущих к синтезу частично функционально неполноценных молекул белка *EcR*, показано для лабораторной линии *EcR^{V559fs} D. melanogaster*, у которой гетерозиготные имаго обоих полов показали увеличение продолжительности жизни до 50% и повышенную устойчивость к таким стрессовым воздействиям, как оксидативный стресс, перегрев и голодание (Simon et al., 2003). Во всех вариантах нашего опыта в обеих линиях продукт ПЦР нарабатывался в значительно больших количествах на

матрице кДНК, полученной с использованием в качестве заправки олигонуклеотида со случайной последовательностью (N6), а не олигодезокситимидиловой кислоты (dT18). Выглядит это как снижение эффективности конверсии полноразмерных молекул РНК в ДНК обратной транскриптазой, возможно, за счет их частичной деградации во время проведения реакции, или же падения активности фермента по мере удаления от точки инициации реакции. С целью уменьшить влияние этих процессов на корректность интерпретации полученных результатов, в последующих экспериментах мы использовали две пары праймеров для количественного определения: *ecd1* и *ecd2* - для 5'-концевой области, а *ecd5* и *ecd6* - для 3'-концевой. В качестве референсного гена вместо гена актина (*act*) использовался ген рибосомного белка RP49 (*rp49*), что дало лучшую сопоставимость концентраций мРНК.

Продолжительная экспозиция личинок в субстрате с 20E позволила установить, что после первоначальной индукции транскрипции в результате воздействия 20E, тепловым стрессом и их комбинацией через 2-е суток происходит резкое падение содержания мРНК в клетках исследуемых тканей личинок. У имаго, в зависимости от пола, отмечаются и довольно значительные изменения в количественных соотношениях 5'- и 3'- концевых областей (Табл. 2).

Таблица 2.

Влияние продолжительного действия 20E и теплового стресса на стадии личинки на содержание мРНК гена *EcR* в мышечных тканях личинок и имаго линии *Lgen*

Группы	Варианты	Содержание мРНК гена <i>EcR</i> по результатам ПЦР с использованием различных сочетаний праймеров:		Соотношение ампликонов <i>ecd1_2 / ecd5_6</i>
		<i>ecd1</i> x <i>ecd2</i>	<i>ecd5</i> x <i>ecd6</i>	
I	1	0.001790 ± 0.000471	0.004457 ± 0.001143	0.40
	2	0.000996 ± 0.000232 ^{a*}	0.002167 ± 0.000563 ^{a*}	0.46
	3	0.003215 ± 0.000868 ^{a*}	0.004017 ± 0.000918	0.80
	4	0.000888 ± 0.000316 ^{a*}	0.002372 ± 0.000497 ^{a*}	0.37
II	1	0.008374 ± 0.002189 ^{b***}	0.009292 ± 0.001973 ^{b*}	0.90
	2	0.001926 ± 0.000324 ^{a**b**}	0.002981 ± 0.000404 ^{a**}	0.65
	3	0.000502 ± 0.000037 ^{a**b**}	0.006046 ± 0.001751	0.08
	4	0.000365 ± 0.000048 ^{a**b*}	0.001410 ± 0.000289 ^{a**b*}	0.26
III	1	0.007369 ± 0.002247 ^{b***}	0.011360 ± 0.002874 ^{b*}	0.65
	2	0.001953 ± 0.000533 ^{a**b*}	0.012092 ± 0.002798 ^{b**c**}	0.16
	3	0.001262 ± 0.000408 ^{a**b**c*}	0.001343 ± 0.000302 ^{a**b**c**}	0.94
	4	0.002706 ± 0.000625 ^{a**b**c**}	0.005518 ± 0.001932 ^{a**b**c*}	0.49

Статистическая значимость различий: a – с контролем; b – с аналогичным вариантом для личинок; c – с аналогичным вариантом для самок. * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$. Группы: I – личинки, II – самки, III – самцы. Варианты: 1 – контроль; 2 – обработка 20E; 3 – тепловой стресс; 4 – тепловой стресс на фоне действия 20E.

Table 2. - Effect of long-term exposure with 20E and heat stress at larval stage on the gene *EcR* mRNA content in muscle tissues of larvae and adults from strain *Lgen*

Group	Variant	mRNA content of the <i>EcR</i> gene according PCR results using different pairs of primers		Amplicones ratio ecd1_2 /ecd5_6
		ecd1 x ecd2	ecd5 x ecd6	
I	1	0.001790 ± 0.000471	0.004457 ± 0.001143	0.40
	2	0.000996 ± 0.000232 ^a *	0.002167 ± 0.000563 ^a *	0.46
	3	0.003215 ± 0.000868 ^a *	0.004017 ± 0.000918	0.80
	4	0.000888 ± 0.000316 ^a *	0.002372 ± 0.000497 ^a *	0.37
II	1	0.008374 ± 0.002189 ^{b***}	0.009292 ± 0.001973 ^{b*}	0.90
	2	0.001926 ± 0.000324 ^{a**,b**}	0.002981 ± 0.000404 ^{a**}	0.65
	3	0.000502 ± 0.000037 ^{a**,b**}	0.006046 ± 0.001751	0.08
	4	0.000365 ± 0.000048 ^{a**,b*}	0.001410 ± 0.000289 ^{a**,b*}	0.26
III	1	0.007369 ± 0.002247 ^{b**}	0.011360 ± 0.002874 ^{b*}	0.65
	2	0.001953 ± 0.000533 ^{a**,b*}	0.012092 ± 0.002798 ^{b**,c**}	0.16
	3	0.001262 ± 0.000408 ^{a**,b**,c*}	0.001343 ± 0.000302 ^{a**,b**,c**}	0.94
	4	0.002706 ± 0.000625 ^{a**,b**,c**}	0.005518 ± 0.001932 ^{a**,b**,c*}	0.49

Significant differences: a – against control variant; b – against analogous variant in larvae; c – against analogous variant in females. * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$. Groups: I – larvae, II – females, III – males. Variants: 1 – control; 2 – treatment by 20E; 3 – heat stress; 4 – heat stress against the background of 20E influence.

Реакция на ТС у личинок выразилась в 2х - кратном увеличении относительного содержания 5'-концевой области мРНК, причем произошло даже некоторое снижение содержания 3'-концевой области. У 5-и суточных самок, на стадии личинки контактировавших с субстратом, содержащим 20E, сохранился низкий уровень содержания мРНК гена *EcR*. У самцов этого же возраста (в варианте с 20E) содержание 3'-концевой области мРНК, определяемое с помощью пары праймеров ecd5 и ecd6, восстановилось до уровня контрольного варианта. Содержание 5'-концевой области мРНК при этом у самцов резко снижено, возможно, в результате индукции альтернативного сплайсинга мРНК или инициации транскрипции с внутреннего промотора гена *EcR*, что могло бы привести к изменению баланса различных изоформ белка *EcR*.

В варианте с тепловым стрессом, вызвавшим на стадии личинки кратковременное повышение представленности 5'-концевой области гена *EcR* в составе мРНК, у имаго произошло снижение содержания мРНК по сравнению с контролем в целом. У самок, вероятно, существенное снижение относительного содержания 5'-концевой области мРНК является результатом выщепления из состава мРНК экзона, в пределах которого локализованы участки гибридизации праймеров ecd1 и ecd2.

Предварительный контакт с экдизоном сглаживает эффекты от теплового стресса и у личинок, и у самцов, т.е. в данном случае можно говорить о проявлении адаптивного эффекта от предобработки 20E, который сохранился и после прохождения этими особями метаморфоза. У самок же отрицательные эффекты от различных видов стресса взаимно усиливаются.

Таблица 3.

Транскрипционная активность гена *EcR* в гонадах 7-суточных имаго линии *Sh gen*, подвергшихся обработке 20E и SAM.

Пол	Вариант	Содержание мРНК гена <i>EcR</i> относительно референсного гена <i>rp49</i> , определённое с соответствующим набором праймеров, и соотношения ампликонов		
		ecd1_2	ecd5_6	ecd1_2/ecd5_6
Самки	1	0.000189 ± 0.000047	0.004073 ± 0.001107	0.05
	2	0.000063 ± 0.000008 ^{a**}	0.001565 ± 0.000372 ^{a*}	0.05
	3	0.000475 ± 0.000117 ^{a*}	0.004911 ± 0.000981	0.10
	4	0.000223 ± 0.000089	0.004743 ± 0.001352	0.05
Самцы	1	0.000318 ± 0.000074 ^{b*}	0.002991 ± 0.000734	0.14
	2	0.000565 ± 0.000182 ^{b**}	0.003570 ± 0.000589 ^{b**}	0.16
	3	0.000143 ± 0.000038 ^{a*,b**}	0.001440 ± 0.000236 ^{a*,b**}	0.10
	4	0.000622 ± 0.000171 ^{a*,b*}	0.003521 ± 0.000801	0.18

Статистическая значимость различий: a – с контролем; b – с аналогичным вариантом для самок. * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$. Варианты: 1 – контроль; 2 – обработка 20E (24 часа после выхода имаго); 3 – обработка SAM (5 суток); 4 – обработка SAM после воздействия 20E.

Table 3. Transcriptional activity of the *EcR* gene in 7 days-age adults from *Shgen* strain after treatment by 20E and SAM.

Sex	Variant	mRNA content of the <i>EcR</i> gene relative to reference gene <i>rp49</i> , defined using corresponding primers, and amplicones ratio		
		<i>ecd1_2</i>	<i>ecd5_6</i>	<i>ecd1_2</i> / <i>ecd5_6</i>
Females	1	0.000189±0.000047	0.004073±0.001107	0.05
	2	0.000063±0.000008 ^{a**}	0.001565±0.000372 ^{a*}	0.05
	3	0.000475±0.000117 ^{a*}	0.004911±0.000981	0.10
	4	0.000223±0.000089	0.004743±0.001352	0.05
Males	1	0.000318±0.000074 ^{b*}	0.002991±0.000734	0.14
	2	0.000565±0.000182 ^{b**}	0.003570±0.000589 ^{b**}	0.16
	3	0.000143±0.000038 ^{a*;b**}	0.001440±0.000236 ^{a*;b**}	0.10
	4	0.000622±0.000171 ^{a*;b*}	0.003521±0.000801	0.18

Significant differences: a – against control variant; b – against analogous variant in larvae; c – against analogous variant in females. * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$. Variants: 1 – control; 2 - treatment adults by 20E (24 hrs after eclosion); 3 – treatment by SAM (5 days); 4 - treatment by SAM after 20E influence.

Включение в состав пищевого рациона SAM вызывает проявление различных фенотипических эффектов [Никонов и др. (Nikonov et al.), 2017]. Из табл. 3 видно, что влияние экзогенного SAM на транскрипционную активность гена *EcR* в гонадах самок сводится скорее к изменению качественного состава его мРНК – увеличивается представленность в ней последовательностей 5'-концевых экзонов, тогда как общее ее содержание практически не изменяется.

SAM предотвращает эффект супрессии транскрипционной активности гена экзогенным 20E, наступающей после первичной индукции. У самцов SAM снижает как общее содержание мРНК гена *EcR* в гонадах, так и представленность в ней последовательностей 5'-концевых экзонов. А обработка 20E, судя по содержанию мРНК в гонадах самцов, стимулирует на этой стадии транскрипционную активность гена *EcR* и предотвращает негативный эффект уже от последующего воздействия SAM. Объяснение гендер-специфичному проявлению эффектов действия SAM следует из особенностей локализации систем биосинтеза экистероидов и их регуляции у самцов и самок. Если основным местом синтеза 20E у самок являются яичники [Soller et al.,

1999], и регуляция транскрипции гена количества 20E, синтезируемого предположительно тканями стенки кишечника на порядок ниже, чем у самок [Siegenthaler et al., 2009], и экзогенный 20E усиливает транскрипцию гена *EcR* в гонадах. SAM, используемый как источник метильных групп при биосинтезе ЮГ, у самок снимает супрессию гена *EcR* в гонадах; у самцов же, для которых интенсивность биосинтеза ЮГ намного ниже, часть SAM может быть вовлечена в процесс метилирования/деметиления ДНК, чем, вероятно, можно объяснить эффект значительного снижения транскрипционной активности гена *EcR* в гонадах.

Мы предполагаем, по аналогии с другими видами насекомых, что различные виды стресса могут вызвать активацию альтернативного сплайсинга некоторых экзонов из 5'-концевой области мРНК гена *EcR*. В таблицах 2 и 3 приведены соотношения 5' и 3'-концевой областей мРНК, изменяющиеся в зависимости от варианта опыта более чем в 2 раза. Интересно, что направление и результат этого процесса у насекомых может определяться уровнем метилирования прилегающих к сайтам сплайсинга участкам ДНК экзонов соответствующего гена [Bonasio et al., 2012].

Таблица 4.

Устойчивость ДНК гена *EcR* у имаго линий *Lgen* и *Shgen*, получавших SAM, к гидролизу рестрикционной эндонуклеазой HpaII.

Пол		% ДНК, устойчивой к гидролизу в сайтах, фланкированных парами праймеров <i>ecd1_2</i> и <i>ecd3_4</i>			
		<i>Lgen</i> , 25 сут.		<i>Shgen</i> , 25 сут.	
		<i>ecd1_2</i>	<i>ecd3_4</i>	<i>ecd1_2</i>	<i>ecd3_4</i>
Самки	контроль	4.56±0.23	3.65±0.28	5.24±0.33 ^{c*}	1.62±0.21 ^{c***}
	SAM	2.43±0.19 ^{a***}	1.09±0.09 ^{a***}	5.21±0.18 ^{a***;c***}	1.91±0.19 ^{c**}
Самцы	контроль	8.30±0.58 ^{b***}	2.84±0.37 ^{b*}	8.21±0.62 ^{b**}	2.74±0.36 ^{b**}
	SAM	5.66±0.47 ^{a***;b***}	1.26±0.14 ^{a**}	13.39±0.88 ^{a***;b***;c***}	3.05±0.29 ^{b**;c***}

Статистическая значимость различий: a – с контролем для варианта; b – с аналогичным вариантом для самок; c – с аналогичным вариантом из линии *Sh gen*. * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$.

Table 4. - Gene *EcR* DNA resistance to hydrolysis by *HpaII* restriction endonuclease in *Shgen* and *Lgen* adults fed by SAM

Sex		% of DNA, resistant to hydrolysis in sites flanked by pairs of primers <i>ecd1_2</i> and <i>ecd3_4</i>			
		<i>Lgen</i> , 25 days		<i>Shgen</i> , 25 days	
		<i>ecd1_2</i>	<i>ecd3_4</i>	<i>ecd1_2</i>	<i>ecd3_4</i>
Females	control	4.56±0.23	3.65±0.28	5.24±0.33 ^{c*}	1.62±0.21 ^{c***}
	SAM	2.43±0.19 ^{a***}	1.09±0.09 ^{a***}	5.21±0.18 ^{a***;c***}	1.91±0.19 ^{c**}
Males	control	8.30±0.58 ^{b***}	2.84±0.37 ^{b*}	8.21±0.62 ^{b**}	2.74±0.36 ^{b**}
	SAM	5.66±0.47 ^{a***;b***}	1.26±0.14 ^{a**}	13.39±0.88 ^{a***;b***;c***}	3.05±0.29 ^{b**;c***}

Significant differences: a – against control variant; b – against analogous variant in females; c – against analogous variant in *Shgen* strain. * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$.

Ранее нами было установлено, что в ДНК кодирующих областей ряда исследованных генов *M. domestica* цитозин практически не метилирован в динуклеотидах CpG (Никонов и др., 2016). Исследование 5'-концевой области гена *EcR* по устойчивости ее ДНК к гидролизу рестрикционной эндонуклеазой *HpaII* (табл. 4), дало основание утверждать, что, скорее всего, ДНК этого гена является исключением.

Из рис. 1 видно, что пара праймеров *ecd1* и *ecd2* позволяет амплифицировать фрагмент ДНК в 5'-концевой концевой области гена, содержащий в своих пределах один сайт для рестриктазы *MspI/HpaII*, а другая пара, *ecd3* и *ecd4* - два сайта. Полного гидролиза рестриктазой *HpaII* ДНК гена *EcR* на участках, ограниченных этими праймерами, мы не наблюдаем, как это было в случае других исследованных нами генов.

В то же время рестриктаза *MspI*, изоизомер *HpaII*, полностью расщепляет ДНК в соответствующих областях гена *EcR* комнатной мухи. В варианте с обработкой SAM у имаго линии *Lgen* (у самок в большей мере) проявился феномен деметилирования ДНК в исследуемых сайтах для рестриктазы *HpaII*. У имаго линии *Shgen* этот эффект не выявлен.

Заключение

Транскрипционная активность гена ядерного рецептора экидона *EcR M. domestica*, важного элемента механизма регуляции экспрессии генов, ответственных за рост и развитие, чувствительна к воздействию теплового стресса, к включению в пищу и воду 20-гидроксиэкидона (20E) и S-аденозилметионина (SAM). Колебания в количественных соотношениях 5' и 3'-концевых областей мРНК гена *EcR* в клетках в зависимости от типа тканей, пола и возраста позволяют высказать предположение о наличии у комнатной мухи *M. domestica* различных изоформ, определяющих тканевую и онтогенетическую специфичность фенотипического выражения активности этого гена. Отчетливые различия в содержании мРНК гена *EcR*

между линиями *Lgen* и *Shgen* в клетках мышц личинок и имаго, не подвергавшихся экспериментальным воздействиям, позволяют сделать заключение о том, что состав предполагаемых изоформ белка *EcR* изначально неодинаков у этих линий. Если у самок это различие может быть снято действием SAM, активно включающимся в процесс биосинтеза ЮГ, стимулирующего в яичниках продукцию стероидов и рецепторных белков, то для самцов, не имеющих яичников, в которых экспрессируется ген *EcR* у самок, а также для личинок с неразвитой репродуктивной системой это различие сохраняется. Отличие линии долгоживущих особей от короткоживущих выражается не только в разнице выживания на преимагинальных стадиях онтогенеза и в периоды трансформаций [Никонов и др. (Nikonov et al.), 2017], но и в морфогенетических эффектах, свидетельствующих о задержке развития в линии *Lgen* [Ахметкиреева и др. (Akhmetkireeva et al.), 2018]. Обнаружение частичного метилирования ДНК в 5'-концевой области гена *EcR* у *M. domestica* и эффект деметилирования у получавших SAM с пищей и водой имаго даёт основания предполагать возможность участия процессов метилирования/деметилирования в регуляции экспрессии гена.

Благодарности

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института биохимии и генетики УФИЦ РАН (тема № АААА-А16-116020350032-1) при частичной поддержке РФФИ (проект № 15-04-04801-а). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Ахметкиреева Т.Т., Беньковская Г.В., Васильев А.Г. Изменчивость формы и размеров крыла в селектированных по продолжительности жизни линиях *Musca domestica* L.: геометрическая морфометрия // Экол. Генетика. 2018. Т.16(1). С. 35-44. doi: 10.17816/ecogen 16135-44
2. Беньковская Г.В. Принципы содержания лабораторных линий насекомых // Биомика. 2017. Т.9(1). С.24-32.

3. Никоноров Ю.М., Ахметкиреева Т.Т., Беньковская Г.В. Метилирование ДНК у *Musca domestica* L. // Биомика. 2016. Т.8(3). С. 266-274.
4. Никоноров Ю.М., Ахметкиреева Т.Т., Беньковская Г.В. Онтогенетические и трансгенерационные эффекты избытка доноров метильных групп в лабораторных линиях комнатной мухи // Биомика. 2017. Т.9(2). С. 141-147.
5. Andres A.J., Fletcher J.C., Karim F.D., Thummel C.S. Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of *Drosophila* ecdysteroid-regulated transcription // Dev. Biol. 1993.160(2). P. 388-404. doi: 10.1006/dbio.1993.1315
6. Benkovskaya G.V. Opportunities and limitations of changes in lifespan in laboratory experiment // Adv. Gerontol. 2011. 1(3). P.255-259. doi: 10.1134/S2079057011030039
7. Bonasio R., Li Q., Lian J., Mutti N.S., Jin L., Zhao H., Zhang P., Wen P., Xiang H., Ding Y., Jin Z., Shen S.S., Wang Z., Wang W., Wang J., Berger S.L., Liebig J., Zhang G., Reinberg D. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator* // Curr. Biol. 2012. V.22(19). P. 1755-1764. doi: 10.1016/j.cub.2012.07.042
8. Codd V., Dolezel D., Stehlik J., Piccin A., Garner K.J., Racey A.N., Straatman K.R., Louis E.J., Costa R., Sauman I., Kyriacou C.P., Rosato E. Circadian Rhythm Gene Regulation in the Housefly *Musca domestica* // Genetics. 2007. V. 177. P.1539–1551. doi: 10.1534/genetics.107.079160
9. Fang F., Xu Y., Jones D., Jones G. Interactions of ultraspiracle with ecdysone receptor in the transduction of ecdysone- and juvenile hormone-signaling // FEBS J. 2005. V.272(7). P.1577-1589. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04578.x
10. Jindra M., Malone F., Hiruma K., Riddiford L.M. Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* // Dev Biol. 1996. V.180(1). P. 258-272. doi:10.1006/dbio.1996.0299
11. Jindra M., Palli S.R., Riddiford L.M. The juvenile hormone signaling pathway in insect development // Annu. Rev. Entomol. 2013. V.58. P.181–204. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153700
12. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods. 2001. V.25(4). P.402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
13. Mouillet J.F., Henrich V.C., Lezzi M., Vogtli M. V. Differential control of gene activity by isoforms A, B1 and B2 of the *Drosophila* ecdysone receptor // Eur. J. Biochem. 2001. V.268(6). P.1811–1819. doi: 10.1046/j.1432-1033.2001.02051.x
14. Odinokov V.N., Galyatdinov I.V., Nedopekin D.V., Khalilov L.M., Shashkov A.S., Kachala V.V., Dinan L., Lafont R.. Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L. (Asteraceae) // Insect Biochem. Mol. Biol. 2002. V.32. P. 161-165. doi: 10.1016/S0965-1748(01)00106-0
15. Rauschenbach I.Y., Lukashina N.S., Maksimovsky L.F., Korochkin L.I. Stress-like reaction of *Drosophila* to adverse environmental factors // J. Comp. Physiol. 1987. V.157. P. 519-531. doi: 10.1007/BF00691837
16. Riddiford L.M. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? // Gen. Comp. Endocrinol. 2012. V.179(3). P. 477-484. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.06.001
17. Riddiford L. M., Cherbas P., Truman J. W. Ecdysone receptors and their biological actions // Vitam. Horm. 2000. V.60. P.1-73. doi: 10.1016/s0083-6729(00)60016-x
18. Russel S., Ahsburner M. Ecdysone-regulated chromosome puffing in *Drosophila melanogaster*. In: Metamorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells. Eds. Gilbert L.I., Tata J.R., Atkinson B.G. San Diego, Academic Press, 1996. P.109-173. doi:10.1016/B978-012283245-1/50005-1
19. Schwedes C., Tulsiani S., Carney G. Ecdysone receptor expression and activity in *Drosophila melanogaster* // J. Insect Physiol. 2011. V.57. P. 899-907. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011. 03.027
20. Siegenthaler C., Maroy P., Hediger M., Dübendorfer A., Bopp D. Hormones and sex-specific transcription factors jointly control yolk protein synthesis in *Musca domestica* // Internat. J. Evol. Biol. 2009. ID 291236. doi: 10.4061/2009/201236
21. Simon A.F., Shih C., Mack A., Benzer S. Steroid Control of Longevity in *Drosophila melanogaster* // Science. 2003. V.299(5611). P. 1407–1410. doi:10.1126/science.1080539
22. Soller M., Bownes M., Kubli E. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females // Dev. Biol. 1999. V.208. P.337-351. doi: 10.1006/dbio.1999.9210
23. Talbot W.S., Swyrid E.A., Hogness D.S. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms // Cell. 1993. V.73(7). P. 1323-1337. doi: 10.1016/0092-8674(93)90359-x
24. Thomas H.E., Stunnenberg H.G., Stewart A.F. Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle // Nature. 1993. V.362(6419). P. 471-475. doi: 10.1038/362471a0
25. Toyota K., Miyakawa H., Hiruta C., Furuta K., Ogino Y., Shinoda T., Tatarazako N., Miyagawa S., Shaw J.R., Iguchi T. Methyl farnesoate synthesis is

necessary for the environmental sex determination in the water flea *Daphnia pulex* // *J. Insect Physiol.* 2015. V.80. P. 22–30. doi: 10.1016/j.jinsphys.2015.02.002

26. Watanabe T., Takeuchi H., Kubo T. Structural diversity and evolution of the N-terminal isoform-specific region of ecdysone receptor-A and -B1 isoforms in insects // *BMC Evol. Biol.* 2010. V.10(40). doi: 10.1186/1471-2148-10-40

References

1. Akhmetkireeva T.T., Benkovskaya G.V., Vasylyev A.G. Izmenchivost' formy i razmerov kryla v selektirovannyh po prodolzhitel'nosti zhizni liniyah *Musca domestica* L.: geometricheskaya morfometriya. [Variability of size and shape of wings in longevity-selected strains of house fly (*Musca domestica* L.): geometric morphometrics]. *Ecol. Genetics.* 2018. V.16(1). S.35-44. doi: 10.17816/ecogen.16135-44 (In Russian).

2. Andres A.J., Fletcher J.C., Karim F.D., Thummel C.S. Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of *Drosophila* ecdysteroid-regulated transcription. *Dev. Biol.* 1993. V.160(2). P. 388-404. doi: 10.1006/dbio.1993.1315

3. Benkovskaya G.V. Opportunities and limitations of changes in lifespan in laboratory experiment. *Adv. Gerontol.* 2011. V.1(3). P.255-259. doi: 10.1134/S2079057011030039

4. Benkovskaya G.V. Principy sodержaniya laboratornyh linij nasekomyh [Principles of maintaining the laboratory strains of insects]. *Biomics.* 2017. 9(1). S. 24-32. (In Russian).

5. Bonasio R., Li Q., Lian J., Mutti N.S., Jin L., Zhao H., Zhang P., Wen P., Xiang H., Ding Y., Jin Z., Shen S.S., Wang Z., Wang W., Wang J., Berger S.L., Liebig J., Zhang G., Reinberg D. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Curr. Biol.* 2012. V.22(19). P. 1755-1764. doi: 10.1016/j.cub.2012.07.042

6. Codd V., Dolezel D., Stehlik J., Piccin A., Garner K.J., Racey A.N., Straatman K.R., Louis E.J., Costa R., Sauman I., Kyriacou C.P., Rosato E. Circadian Rhythm Gene Regulation in the Housefly *Musca domestica*. *Genetics.* 2007. V.177. P.1539–1551. doi: 10.1534/genetics.107.079160

7. Fang F., Xu Y., Jones D., Jones G. Interactions of ultraspiracle with ecdysone receptor in the transduction of ecdysone- and juvenile hormone-signaling. *FEBS J.* 2005. 272(7). P.1577-1589. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04578.x

8. Jindra M., Malone F., Hiruma K., Riddiford L.M. Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol.* 1996. V.180(1). P.258-272. doi:10.1006/dbio.1996.0299

9. Jindra M., Palli S.R., Riddiford L.M. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.* 2013. V.58. P.181–204. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153700

10. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001. V.25(4). P.402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

11. Mouillet J.F., Henrich V.C., Lezzi M., Vogtli M. V. Differential control of gene activity by isoforms A, B1 and B2 of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Eur. J. Biochem.* 2001. V.268(6). P.1811–1819. doi: 10.1046/j.1432-1033.2001.02051.x

12. Nikonorov Yu.M., Akhmetkireeva T.T., Benkovskaya G.V. Metilirovanie DNK u *Musca domestica* L. [DNA methylation in house fly *Musca domestica* L.]. *Biomics.* 2016. 8(3). S. 266-274. (In Russian).

13. Nikonorov Yu.M., Akhmetkireeva T.T., Benkovskaya G.V. Ontogeneticheskie i transgeneracionnye efekty izbytko donorov metil'nyh grupp v laboratornyh liniyah komnatnoj muhi. [Developmental transgenerational effects of methyl group donors redundancy in the laboratory strains of house fly]. *Biomics.* 2017. 9(2). S. 141-147. (In Russian).

14. Odinokov V.N., Galyatdinov I.V., Nedopekin D.V., Khalilov L.M., Shashkov A.S., Kachala V.V., Dinan L., Lafont R.. Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L. (Asteraceae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002. V.32. P. 161-165. doi: 10.1016/S0965-1748(01)00106-0

15. Rauschenbach I.Y., Lukashina N.S., Maksimovsky L.F., Korochkin L.I. Stress-like reaction of *Drosophila* to adverse environmental factors. *J. Comp. Physiol.* 1987. V.157. P. 519-531. doi: 10.1007/BF00691837

16. Riddiford L.M. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012. V.179(3). P. 477-484. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.06.001

17. Riddiford L. M., Cherbas P., Truman J. W. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam. Horm.* 2000. V.60. P.1-73. doi: 10.1016/s0083-6729(00)60016-x

18. Russel S., Ahsburner M. Ecdysone-regulated chromosome puffing in *Drosophila melanogaster*. In: Metamorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells. Eds. Gilbert L.I., Tata J.R., Atkinson B.G. San Diego, Academic Press. 1996. P.109-173. doi:10.1016/B978-012283245-1/50005-1

19. Schwedes C., Tulsiani S., Carney G. Ecdysone receptor expression and activity in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 2011. V.57. P. 899-907. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011. 03.027

20. Siegenthaler C., Maroy P., Hediger M., Dübendorfer A., Bopp D. Hormones and sex-specific transcription factors jointly control yolk protein synthesis in *Musca domestica*. *Intern. J. Evol. Biol.* 2009. ID 291236. doi: 10.4061/2009/201236
21. Simon A.F., Shih C., Mack A., Benzer S. Steroid Control of Longevity in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2003. V.299(5611). P. 1407–1410. doi:10.1126/science.1080539
22. Soller M., Bownes M., Kubli E. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Dev. Biol.* 1999. V.208. P.337-351. doi: 10.1006/dbio.1999.9210
23. Talbot W.S., Swyrid E.A., Hogness D.S. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*. 1993. V.73(7). P. 1323-1337. doi: 10.1016/0092-8674(93)90359-x
24. Thomas H.E., Stunnenberg H.G., Stewart A.F. Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature*. 1993. V.362(6419). P. 471-475. doi: 10.1038/362471a0
25. Toyota K., Miyakawa H., Hiruta C., Furuta K., Ogino Y., Shinoda T., Tatarazako N., Miyagawa S., Shaw J.R., Iguchi T. Methyl farnesoate synthesis is necessary for the environmental sex determination in the water flea *Daphnia pulex*. *J. Insect Physiol.* 2015. V.80. P. 22–30. doi: 10.1016/j.jinsphys.2015.02.002
26. Watanabe T., Takeuchi H., Kubo T. Structural diversity and evolution of the N-terminal isoform-specific region of ecdysone receptor-A and -B1 isoforms in insects. *BMC Evol. Biol.* 2010. V.10(40). doi: 10.1186/1471-2148-10-40