

Связь между фенотипической робастностью и средней продолжительностью жизни у *Drosophila melanogaster*

Л.П. Захаренко¹, Д.В. Петровский¹, И.Г. Дранов², С.А. Федорова¹, Н.С. Юдин¹, А.В. Пиндюрин³, Ю.М. Мошкин^{1,3} 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Любая долгоживущая система должна быть стабильной, т.е. обладать повышенной устойчивостью как к внешним воздействиям, так и к внутренним сбоям. Робастность биологических систем может быть определена как реципрокная величина к фенотипической изменчивости или, для положительно распределенных признаков, к коэффициенту вариации (C.V.). Рассматривая продолжительность жизни как интегральный фенотип всех функций организма, мы показали, что фенотипическая робастность организма положительно коррелирует с ожидаемой продолжительностью жизни. Мы определили параметры продолжительности жизни для ряда инбредных линий *Drosophila melanogaster*, выращенных при 29 °C, из коллекции Drosophila Genetic Reference Panel (DGRP). Фенотипическая робастность продолжительности жизни (C.V.⁻¹) для этих линий коррелировала положительно с ожидаемой продолжительностью жизни. Соотношение между робастностью и ожидаемой продолжительностью жизни сохраняется и для DGRP линий, выращенных при 25 °C. Помимо этого, в соответствии с ранее опубликованными результатами, с изменением (уменьшением или увеличением) температуры кривые дожития масштабируются (растягиваются или сжимаются соответственно) по временной шкале. Иными словами, с увеличением температуры падает как средняя продолжительность жизни, так и стандартное отклонение от средней продолжительности жизни, в то время как коэффициенты вариации сохраняются в том же диапазоне. Исходя из этого, мы заключили, что коэффициенты вариации коррелируют со средней продолжительностью жизни и отражают фенотипическую робастность продолжительности жизни даже при ускоренном старении, вызванном температурой.

Ключевые слова: продолжительность жизни; ожидаемая продолжительность жизни; старение; фенотипическая изменчивость; фенотипическая робастность; *Drosophila melanogaster*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Захаренко Л.П., Петровский Д.В., Дранов И.Г., Федорова С.А., Юдин Н.С., Пиндюрин А.В., Мошкин Ю.М. Связь между фенотипической робастностью и средней продолжительностью жизни у *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):816-824. DOI 10.18699/VJ17.301

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zakharenko L.P., Petrovskii D.V., Dranov I.G., Fedorova S.A., Yudin N.S., Pindyurin A.V., Moshkin Y.M. A link between phenotypic robustness and life expectancy in *Drosophila melanogaster*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):816-824. DOI 10.18699/VJ17.301 (in Russian)

Received 06.10.2017


Accepted for publication 27.10.2017

© AUTHORS, 2017

L.P. Zakharenko and D.V. Petrovskii equal contribution to manuscript preparation.

 e-mail: yury.moshkin@gmail.com

A link between phenotypic robustness and life expectancy in *Drosophila melanogaster*

L.P. Zakharenko¹, D.V. Petrovskii¹, I.G. Dranov², S.A. Fedorova¹, N.S. Yudin¹, A.V. Pindyurin³, Y.M. Moshkin^{1,3} 

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

Long-lived systems are expected to be stable, i.e. resistant to either external influences, or internal failures. Robustness of biological systems can be defined as a reciprocal value to their phenotypic plasticity expressed through a coefficient of variation (C.V.) for positively distributed phenotypic traits. Considering lifespan as phenotype, which integrates all functions of an organism, we showed that its phenotypic robustness correlates positively with life expectancy. We assessed lifespan parameters for a selection of inbred *Drosophila melanogaster* strains from Drosophila Genetic Reference Panel (DGRP) reared at 29 °C. The robustness of lifespan phenotype (C.V.⁻¹) correlated positively with estimated life expectancy for these strains. The same relation also holds for the lifespan of all DGRP strains reared at 25 °C. Also, in agreement with previous observations, upon temperature change (decrease or increase) the survival curves scaled in time (stretched or shrunk respectively). In other words, the average lifespan decreased for flies reared at elevated temperature, but so did the standard deviation, and thus the coefficients of variation remained in the same range. From this we conclude that coefficients of variation correlate with life expectancies and account for the robustness of lifespan phenotype irrespective of accelerated aging caused by temperature.

Key words: lifespan; life expectancy; aging; phenotypic plasticity; phenotypic robustness; *Drosophila melanogaster*.

Ожидаемая продолжительность жизни, как и множество других фенотипических признаков, зависит от взаимодействия генотипа со средой. Так, мутации в ряде генов, контролирующих метаболизм, рост, упаковку ДНК в хроматин, репарацию ДНК и т.д., могут приводить к ощутимым изменениям в средней продолжительности жизни (Kenyon et al., 1993; Ayyadevara et al., 2008; Garinis et al., 2008; Zane et al., 2014; Ivanov et al., 2015; Proshkina et al., 2015; Pan, Finkel, 2017; Van Raamsdonk, 2017). Очевидно, что генетика старения представляет собой обширную область исследований, и на данный момент уже известно порядка 900/200/100 генов (<http://genomics.senescence.info>), отвечающих за увеличение или уменьшение продолжительности жизни, у нематод (*Caenorhabditis elegans*), мух (*Drosophila melanogaster*) и мышей (*Mus musculus*) соответственно (Tacutu et al., 2013). Среди средовых факторов, влияющих на продолжительность жизни, одними из наиболее часто рассматриваемых являются диета, суточные ритмы и др. (Mair et al., 2003; Lopez-Otin et al., 2016; Vermeij et al., 2016; Kapahi et al., 2017; Rogina, 2017). Помимо этого, для пойкилотермных животных существенное влияние на продолжительность жизни оказывает температура, с увеличением которой, как правило, уменьшается средняя продолжительность жизни (Shaw, Bergaw, 1962). Наконец, при сравнении ожидаемой продолжительности жизни для различных видов животных выявляется ряд универсальных аллометрических зависимостей. Так, ожидаемая продолжительность жизни растёт с увеличением видовых размеров и уменьшением скорости основного метаболизма на единицу массы (Speakman, 2005; Hulbert et al., 2007).

Будучи количественным фенотипическим признаком, продолжительность жизни может быть описана некоторой функцией распределения плотности вероятности $f(t)$ (probability density function, PDF) с параметрами $\theta = (\theta_1 = \mu, \theta_2 = \sigma, \dots, \theta_k)$, где μ и σ – ожидаемая продолжительность жизни и стандартное отклонение соответственно. При этом тип и параметры распределения $f(t)$ будут зависеть от функции силы смертности $h(t)$, описывающей риск смерти в интервале возраста $[t, (t+\Delta t)]$. Сила смертности связана с функцией дожития $S(t)$, т.е. с вероятностью дожития до времени t , как $S(t) = \mathbb{P}(T \geq t) = \exp\left[-\int_0^t h(x)dx\right]$, и с PDF, как $f(t) = h(t) \cdot S(t)$. При этом $S(t) = 1 - F(t)$, где $F(t) = \mathbb{P}(T \leq t)$ – функция распределения продолжительности жизни (cumulative distribution function, CDF) (Moore, 2016). Таким образом, зная закон, определяющий силу смертности $h(t)$, можно вывести функцию дожития $S(t)$.

Исходя из эмпирических наблюдений, Б. Гомперц предположил, что вероятность смерти возрастает экспоненциально с возрастом: $h(t) = a \cdot \exp\left[\frac{t}{\beta}\right]$ или в параметризации Гумбеля: $h(t) = \frac{1}{\beta} \cdot \exp\left[\frac{t-\tau}{\beta}\right]$ (Gompertz, 1825; Greenwood, 1928; Gumbel, 1958; Missov et al., 2015). При этом функция дожития принимает следующий вид: $S(t) = \exp\left[-\exp\left(\frac{t-\tau}{\beta}\right)\right]$ (рис. 1, а). Помимо этого, возможны и другие законы, определяющие изменения в силе смертности с возрастом $h(t)$ (Moore, 2016). Следует, одна-

ко, отметить, что в большинстве, если не во всех, случаях, касающихся биологии старения, функции $h(t)$ и $S(t)$ неизвестны. Тем не менее их можно определить из аппроксимации экспериментальных данных методами обобщенной регрессии, применяя распределения Гомпертца/Гумбеля, либо ряд других распределений (Moore, 2016). Помимо прочего, непараметрические подходы, как, например, метод Каплана–Мейера, также позволяют оценить функцию дожития $\hat{S}(t)$ и основные параметры продолжительности жизни μ и σ (Kaplan, Meier, 1958).

Как правило, при анализе эффектов тех или иных факторов на процессы старения в центре внимания оказывается ожидаемая продолжительность жизни $E(T) = \mu$. Однако если посмотреть на функцию дожития, то сразу видно, что другим немаловажным параметром является и крутизна кривых $S(t)$, заданная коэффициентом β для распределения Гумбеля (см. рис. 1, а), что в равной степени представляет интерес для понимания процессов старения (Stroustrup et al., 2016). Очевидна также и прямая связь между крутизной функции дожития и среднеквадратичным отклонением (σ) в продолжительности жизни (см. Материалы и методы, рис. 1, а). Рассматривая саму продолжительность жизни как фенотипический признак, нетрудно заметить, что σ отражает не что иное, как величину изменчивости данного фенотипа при заданном генотипе.

Для положительно распределенных признаков, таких как время жизни, имеет смысл выражать фенотипическую изменчивость через коэффициент вариации ($C.V. = \sigma/\mu$), т.е. как относительное среднеквадратичное отклонение от ожидаемой продолжительности жизни. В отличие от $C.V.$ показывает крутизну кривых дожития в координатах, нормализованных на ожидаемую продолжительность жизни (см. Материалы и методы, рис. 1, б) (Markov et al., 2016). Обратная величина $C.V.^{-1} = SNR = \mu/\sigma$ соответствует в техническом смысле соотношению сигнала к шуму (signal to noise ratio), а в биологическом – фенотипической робастности.

Мы предположили, что увеличение ожидаемой продолжительности жизни может быть обусловлено повышенной фенотипической робастностью организма. В качестве интегрального фенотипического признака, зависящего от всех функций организма, мы рассмотрели саму же продолжительность жизни. Наши результаты показывают, что средняя продолжительность жизни (μ) и фенотипическая робастность продолжительности жизни ($C.V.^{-1}$) коррелированы положительно, что подтверждает гипотезу.

Материалы и методы

Математический анализ продолжительности жизни. Распределение Гумбеля задается двумя параметрами: коэффициентом сдвига τ (location) и масштаба β (scale): $f(t) = \frac{1}{\beta} \cdot \exp\left[\frac{t-\tau}{\beta}\right] \cdot \exp\left[-\exp\left(\frac{t-\tau}{\beta}\right)\right]$ (см. рис. 1, а) (Gumbel, 1958; Missov et al., 2015).

Ожидаемая продолжительность жизни (μ) и стандартное отклонение (σ) определяются, как $\mu = \tau + \gamma \cdot \beta$, и среднеквадратичное отклонение, как $\sigma = \frac{\pi \cdot \beta}{\sqrt{6}}$, где $\gamma = 0.57721$ (постоянная Эйлера – Маскерони). Параметр τ соответствует моде продолжительности жизни и β , а значит,

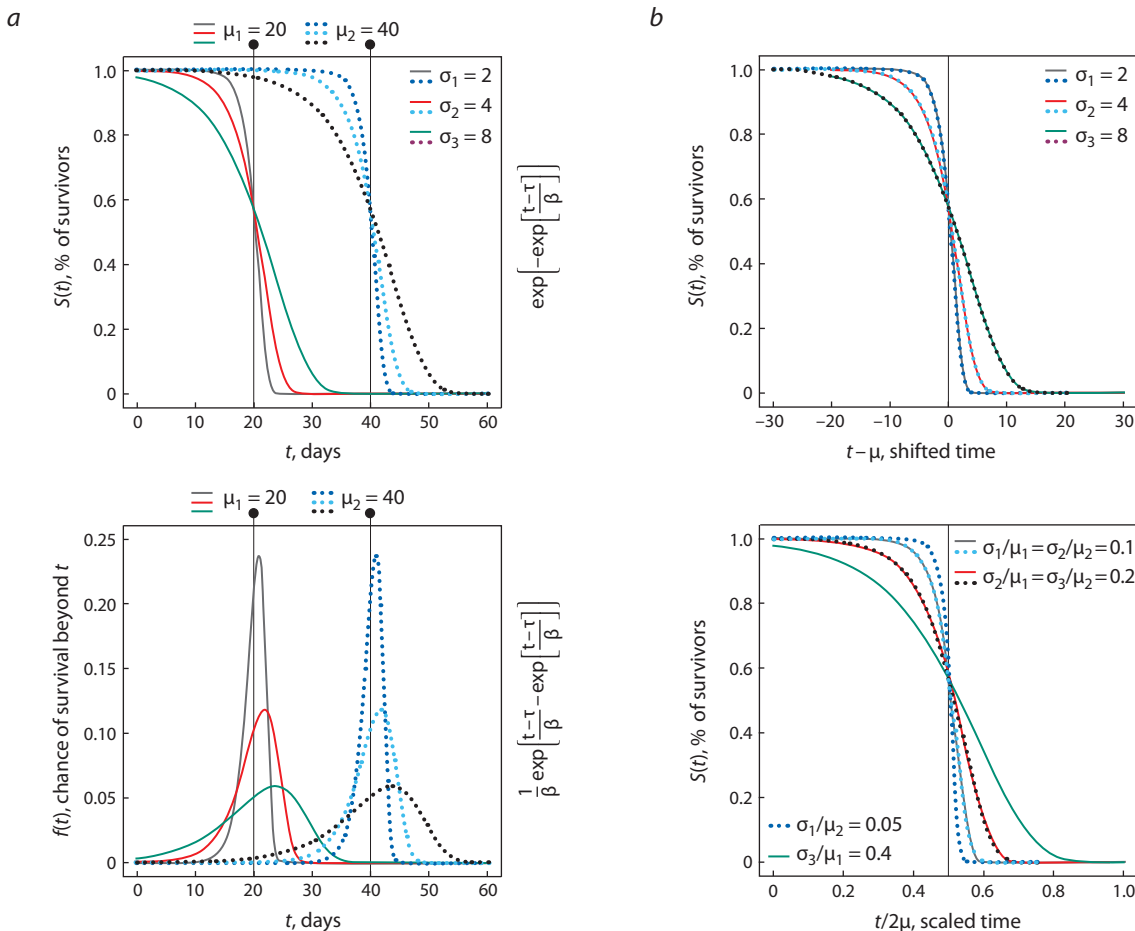


Fig. 1. Parametric modeling of lifespan.

(a) The survival function $S(t)$ expresses the probability of survival beyond time t . It is related to the distribution function $F(t)$ and to the probability density function $f(t)$ as $S(t) = \mathbb{P}(T \geq t) = 1 - F(t) = \int_t^\infty f(x)dx$. Functions $S(t)$ and $f(t)$ of the Gumbel distribution are shown as an example; (b) Standard deviation (σ) from life expectancy defines the steepness of the survival function in the absolute time scale, which is evident from a comparison of mean-centered $(t - \mu)$ survival curves. The coefficient of variation ($C.V. = \sigma/\mu$) defines the steepness of the survival function in the mean-normalized $(t/2\mu)$ time scale.

и σ – крутизне функции дожития: $S(t) = \exp\left[-\exp\left(\frac{t-\tau}{\beta}\right)\right]$

(см. рис. 1, a). При этом $C.V. = \frac{\sigma}{\mu} = \frac{\pi}{\sqrt{6}} \cdot \left(\frac{\beta}{\tau - \gamma \cdot \beta}\right)$

и $SNR - C.V.^{-1} = \frac{\mu}{\sigma} = \frac{\sqrt{6}}{\pi} \cdot \left(\frac{\tau - \gamma \cdot \beta}{\beta}\right)$.

При масштабировании $S(t)$ на среднюю продолжительность жизни $S(t/\mu) = \exp\left[-\exp\left(\frac{t/\mu - \tau_{norm}}{\beta/\mu}\right)\right]$, где $\tau_{norm} = \tau/\mu$,

крутизна кривых дожития приводится к $C.V.$ При равенстве $C.V.$ для двух различных функций дожития, $S_1(t|\tau_1, \beta_1)$ и $S_2(t|\tau_2, \beta_2)$, имеет место следующее соотношение:

$S_1(t|\tau_1, \beta_1) = S_2\left[\frac{\tau_2}{\tau_1} \cdot t|\tau_2, \beta_2\right] = S_2\left[\frac{\mu_2}{\mu_1} \cdot t|\tau_2, \beta_2\right]$. Действительно,

если $\frac{\sigma_1}{\mu_1} = \frac{\sigma_2}{\mu_2}$, то $\frac{\beta_1}{\tau_1} = \frac{\beta_2}{\tau_2}$ и $\beta_1 = \frac{\tau_1}{\tau_2} \cdot \beta_2$. Отсюда

$S_2\left[\frac{\tau_2}{\tau_1} \cdot t|\tau_2, \beta_2\right] = \exp\left[-\exp\left(\frac{(\tau_2/\tau_1) \cdot t - \tau_2}{\beta_2}\right)\right] =$
 $= \exp\left[-\exp\left(\frac{t - \tau_1}{(\tau_1/\tau_2) \cdot \beta_2}\right)\right] = \exp\left[-\exp\left(\frac{t - \tau_1}{\beta_1}\right)\right] = S_1(t|\tau_1, \beta_1)$.

Таким образом, при равенстве $C.V.$ в нормализованных координатах времени две функции дожития равны (см. рис. 1, б). Подобное явление наблюдается у нематод (*Caenorhabditis elegans*), когда при увеличении температуры крутизна кривых дожития (β) увеличивается пропорционально падению средней продолжительности жизни при сохранении равенства $C.V.$ (Stroustrup et al., 2016).

Для определения параметров кривых дожития из экспериментальных данных использовали следующие пакеты языка программирования R: *survival* для непараметрической оценки методом Каплана–Мейера (Kaplan, Meier, 1958; Therneau, Grambsch, 2000) и *gamlss* для параметрической оценки $S(t)$ Гумбеля (Rigby, Stasinopoulos, 2005; Stasinopoulos, Rigby, 2007).

GAMLSS (Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape) представляет собой подход, расширяющий обобщенный регрессионный анализ (Generalized Linear Modelling), который позволяет оценить эффекты интересующих факторов не только на средние значения, но и на целый ряд других параметров распределения (масштаб, форма и т. д.). В общем случае, если случайная

величина (время смерти) распределена как $Y \sim D(\theta)$, где D – некоторое распределение с параметрами $\theta = (\theta_1 = \mu, \theta_2 = \sigma, \dots, \theta_k)$, то общая модель GAMLSS задается как:

$$g_1(\mu) = \eta_1 = X_1 \cdot \alpha_1 + Z_1 \cdot \omega_1,$$

$$g_2(\sigma) = \eta_2 = X_2 \cdot \alpha_2 + Z_2 \cdot \omega_2,$$

$$g_k(\theta_k) = \eta_k = X_k \cdot \alpha_k + Z_k \cdot \omega_k,$$

где g_k – «линкерная» функция ($x, \ln(x), 1/x$, и т. д.); X_k – регрессорная матрица фиксированных эффектов; Z_k – регрессорная матрица случайных эффектов; α_k и ω_k – коэффициенты модели, устанавливаемые для параметра θ_k (Rigby, Stasinopoulos, 2005; Stasinopoulos, Rigby, 2007).

Экспериментальный анализ продолжительности жизни. Длительность жизни определена для 12 секвенированных инбредных линий *Drosophila melanogaster* дикого типа из *Drosophila* Genetic Reference Panel (DGRP), выделенных из популяции Raleigh, North Carolina (коллекция Bloomington *Drosophila* Stock Centre): DGRP-93, DGRP-229, DGRP-370, DGRP-630, DGRP-653, DGRP-761, DGRP-787, DGRP-790, DGRP-812, DGRP-822, DGRP-850, DGRP-900 (Mackay et al., 2012; Huang et al., 2014). Для этого в каждую пробирку с кормом на кукурузной крупе без изюма помещали 20 двухдневных девственных самок или самцов. Всего в анализ было взято 100 самок и 100 самцов каждой линии. Эксперимент проводили при 29 °C, меняя корм на свежий каждые три дня. Число погибших особей подсчитывали каждые три дня. Данные по продолжитель-

ности жизни для линий DGRP, выращенных при 25 °C, доступны из литературы (Ivanov et al., 2015). Кривые дожития Гумбеля для DGRP линий, выращенных при 25 °C, были восстановлены из опубликованных параметров $\hat{\mu}$ и $\hat{\sigma}$ (Ivanov et al., 2015).

Результаты и обсуждение

Для оценки соотношений между такими параметрами продолжительности жизни, как μ , σ и $S(t)$, мы проанализировали длительность жизни для 12 секвенированных инбредных линий DGRP *D. melanogaster* (Mackay et al., 2012), выращенных при 29 °C. Аппроксимация кривых дожития по функциям $S(t)$ распределений Гумбеля (GU), Вейбулла (WEI), Гамма (Г), логнормального (LNO) и обратного распределения Гаусса (IG) показала, что распределение Гумбеля наилучшим образом описывает экспериментальные данные (рис. 2, а). Действительно, значения логарифмической функции правдоподобия для модели $S_{GU}(t)$, построенной по распределению Гумбеля, превосходит таковые для других моделей: $l_{GU} = -7399.6 > l_{WEI} = -7610.8 > l_{\Gamma} = -8013.91 > l_{LNO} = -8230.04 > l_{IG} = -8293.09$. Помимо этого, параметрические оценки средней продолжительности жизни и среднеквадратичного отклонения хорошо совпадают с непараметрическими, определенными методом Каплана–Мейера (см. рис. 2, б, в).

Анализ кривых дожития $S(t)$ для самок и самцов, выращенных при 29 °C, выявил широкий разброс по средней

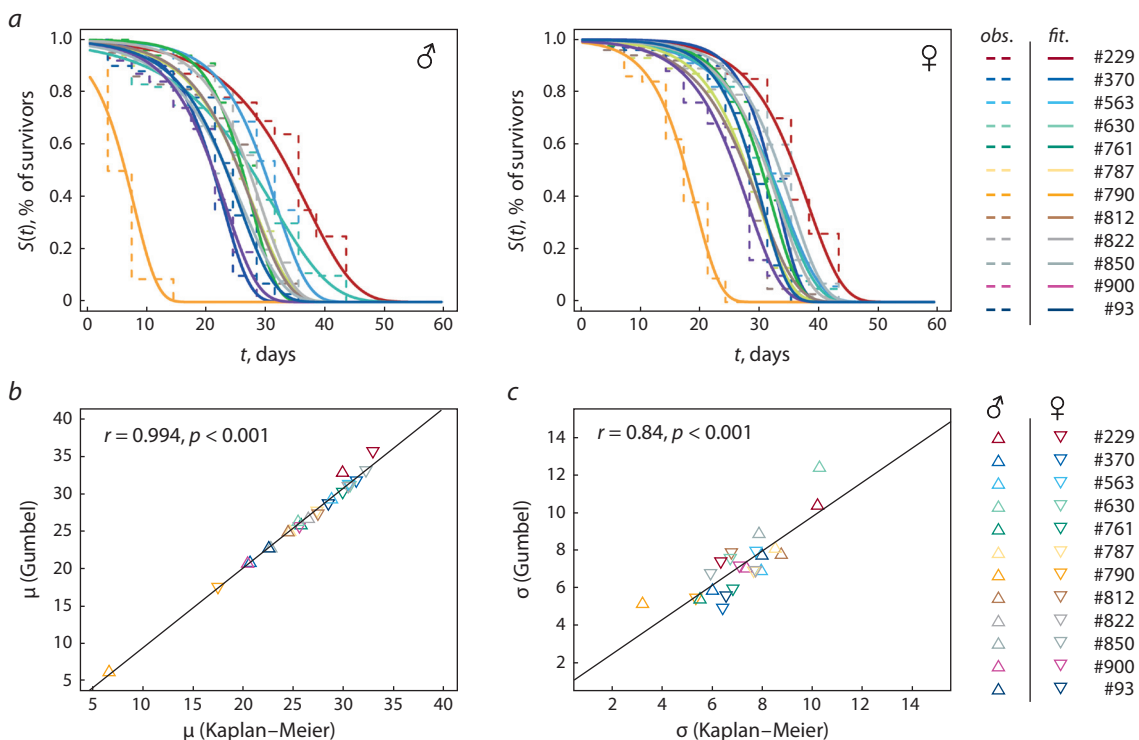


Fig. 2. Parametric analysis of lifespan in inbred DGRP *Drosophila melanogaster* strains.

(a) Experimental (obs, dashed lines) and modeled (fit, solid lines) survival curves constructed for males (left) and females (right) of Genetic Reference Panel *D. melanogaster* lines (DGRP: #93, #229, #370, #563, #630, #761, #787, #790, #812, #822, #850, #900) grown at 29 °C. The survival curves were modeled with the survival function $S(t)$ for the Gumbel distribution. The modeled survival curves are in good agreement with the experimental ones ($R^2 = 0.98$). (b, c) Lifespan parameters determined with the Gumbel parametric model and nonparametric Kaplan–Meier estimator are in good agreement: (b) mean, (c) standard deviation.

Impacts of genotype and nonrelevant experimental fluctuations on the μ and σ parameters of the survival function

Sex	Model ^a	μ	σ	d.f. ^b	Λ ΔAIC ^c	p
♂	m0 $_{\mu}$	μ_0		42.6		
	m1 $_{\mu}$	$\mu_0 + G$	$\sigma_0 + G + R$	67.4	m1 $_{\mu}$ – m0 $_{\mu}$: 589.3 539.7	$1.6 \cdot 10^{-108}$
	m2 $_{\mu}$	$\mu_0 + G + R$		106.8	m2 $_{\mu}$ – m1 $_{\mu}$: 144.8 66.05	$5.7 \cdot 10^{-14}$
♀	m0 $_{\mu}$	μ_0		28.9		
	m1 $_{\mu}$	$\mu_0 + G$	$\sigma_0 + G + R$	52.04	m1 $_{\mu}$ – m0 $_{\mu}$: 454.5 408.2	$1.2 \cdot 10^{-81}$
	m2 $_{\mu}$	$\mu_0 + G + R$		102.4	m2 $_{\mu}$ – m1 $_{\mu}$: 210.0 109.2	$2.2 \cdot 10^{-21}$
♂	m0 $_{\sigma}$		σ_0	49.8		
	m1 $_{\sigma}$	$\mu_0 + G + R$	$\sigma_0 + G$	60.1	m1 $_{\sigma}$ – m0 $_{\sigma}$: 131.6 111.0	$3.3 \cdot 10^{-23}$
	m2 $_{\sigma}$		$\sigma_0 + G + R$	106.8	m2 $_{\sigma}$ – m1 $_{\sigma}$: 177.2 83.7	$4.5 \cdot 10^{-17}$
♀	m0 $_{\sigma}$		σ_0	50.5		
	m1 $_{\sigma}$	$\mu_0 + G + R$	$\sigma_0 + G$	66	m1 $_{\sigma}$ – m0 $_{\sigma}$: 68.6 37.6	$1.2 \cdot 10^{-8}$
	m2 $_{\sigma}$		$\sigma_0 + G + R$	102.4	m2 $_{\sigma}$ – m1 $_{\sigma}$: 129.6 56.7	$2.3 \cdot 10^{-12}$

^a GAMLSS models $\mu = \mu_0 + G \cdot \alpha_1 + R \cdot \omega_1$ и $\ln(\sigma) = \sigma_0 + G \cdot \alpha_2 + R \cdot \omega_2$, describing the effect of a particular genotype effect G and a random effect R of experimental replications (tube) on parameters of the Gumbel survival function; ^b degrees of freedom of the model; ^c Λ , logarithm of the likelihood ratio; and ΔAIC , difference between the values of the Akaike informative criterion for the models compared.

продолжительности жизни между линиями DGRP (таблица, см. рис. 2, а) $s_{\mu} = 6.5$ для самцов и $s_{\mu} = 4.6$ для самок, где s_{μ} – среднеквадратичное отклонение в ожидаемой продолжительности жизни для различных линий DGRP. При этом средняя продолжительность жизни для самок и самцов высоко коррелирована ($r = 0.86$, $p < 0.001$). Схожим образом варьирует и средняя продолжительность жизни для самок 197 линий DGRP, выращенных при 25 °C, $s_{\mu} = 9.9$ (Ivanov et al., 2015). Во многом подобные отличия в средней продолжительности жизни между линиями DGRP неудивительны, так как роль генотипа в определении продолжительности жизни хорошо известна (Van Raamsdonk, 2017).

Фенотипическая изменчивость продолжительности жизни обратно коррелирует с ожидаемой продолжительностью жизни. Параметр β в функции дожития Гумбеля $S(t) = \exp\left[-\exp\left(\frac{t-\tau}{\beta}\right)\right]$ соответствует крутизне кривых дожития в абсолютной шкале времени, равно как и стандартное отклонение от ожидаемой продолжительности жизни (так как $\sigma = \frac{\pi \cdot \beta}{\sqrt{6}}$; см. рис. 1, а). Разброс по крутизне в кривых дожития между DGRP линиями существенно меньше, чем по средней продолжительности жизни (рис. 3, а). Так, для мух, выращенных при 29 °C, $s_{\sigma} = 2.1$ и 1.0 – для самцов и самок соответственно и для самок, выращенных при 25 °C, $s_{\sigma} = 4.6$ (Ivanov et al., 2015). Тем не менее влияние генотипа на данный параметр статистически значимо (см. таблицу). Однако изменения в крутизне кривых дожития не коррелируют с изменениями в средней продолжительности жизни как для мух, выращенных при 29 °C (см. рис. 3, б), так и для мух, выращенных при 25 °C (см. рис. 3, в). Иными словами, в абсолютной шкале времени параметры функции $S(t)$, μ – сдвиг и σ – крутизна, меняются независимо под влиянием генотипа.

Учитывая значимый разброс в средней продолжительности жизни между линиями DGRP, для адекватной оценки фенотипической изменчивости продолжительности

жизни мы использовали коэффициент вариации $C.V. = \sigma/\mu$. $C.V.$ отражает крутизну кривых дожития, масштабированных по средней продолжительности жизни $S(t/\mu)$ (см. рис. 1, б). Так же, как и σ , $C.V.$ варьирует в большей степени для самцов линий DGRP, выращенных при 29 °C, чем для самок (см. рис. 3, з). Однако, в отличие от σ , $C.V.$ обратно коррелирована со средней продолжительностью жизни как для мух, выращенных при 29 °C (см. рис. 3, д), так и для мух, выращенных при 25 °C (см. рис. 3, е). Таким образом, с увеличением ожидаемой продолжительности жизни падает фенотипическая изменчивость или, в реципрокных терминах, растет фенотипическая робастность самой же продолжительности жизни, рассматриваемая в данном контексте как фенотипический признак.

Влияние неучитываемых (стохастических) флуктуаций в среде на вариацию в продолжительности жизни. Следует отметить, что средняя продолжительность жизни для мух линий DGRP, выращенных при 29 °C в нашем эксперименте, никак не коррелирована с таковой для мух тех же линий, выращенных при 25 °C (Ivanov et al., 2015) (рис. 4, а). Помимо этого, учитывая то, что продолжительность жизни определялась в четырех-пяти биологических повторах (4–5 стаканчиков по 20 мух в каждой) для мух линий DGRP, выращенных при 29 °C, можно определить влияние неучитываемых (случайных) экспериментальных факторов на параметры кривых дожития. Действительно, влияние подобных неучитываемых флуктуаций статистически значимо как на среднюю продолжительность жизни (см. таблицу, рис. 4, б), так и на крутизну кривых дожития. Более того, крутизна кривых дожития в абсолютной шкале времени в сопоставимой степени зависит как от генетических, так и от случайных средовых факторов (см. таблицу, рис. 4, в).

Помимо этого, можно предположить, что фенотипически робастные генотипы с увеличенной продолжительностью жизни будут также обладать повышенной устойчивостью по отношению к спонтанным флуктуациям в среде. Действительно, коэффициенты вариации по средней про-

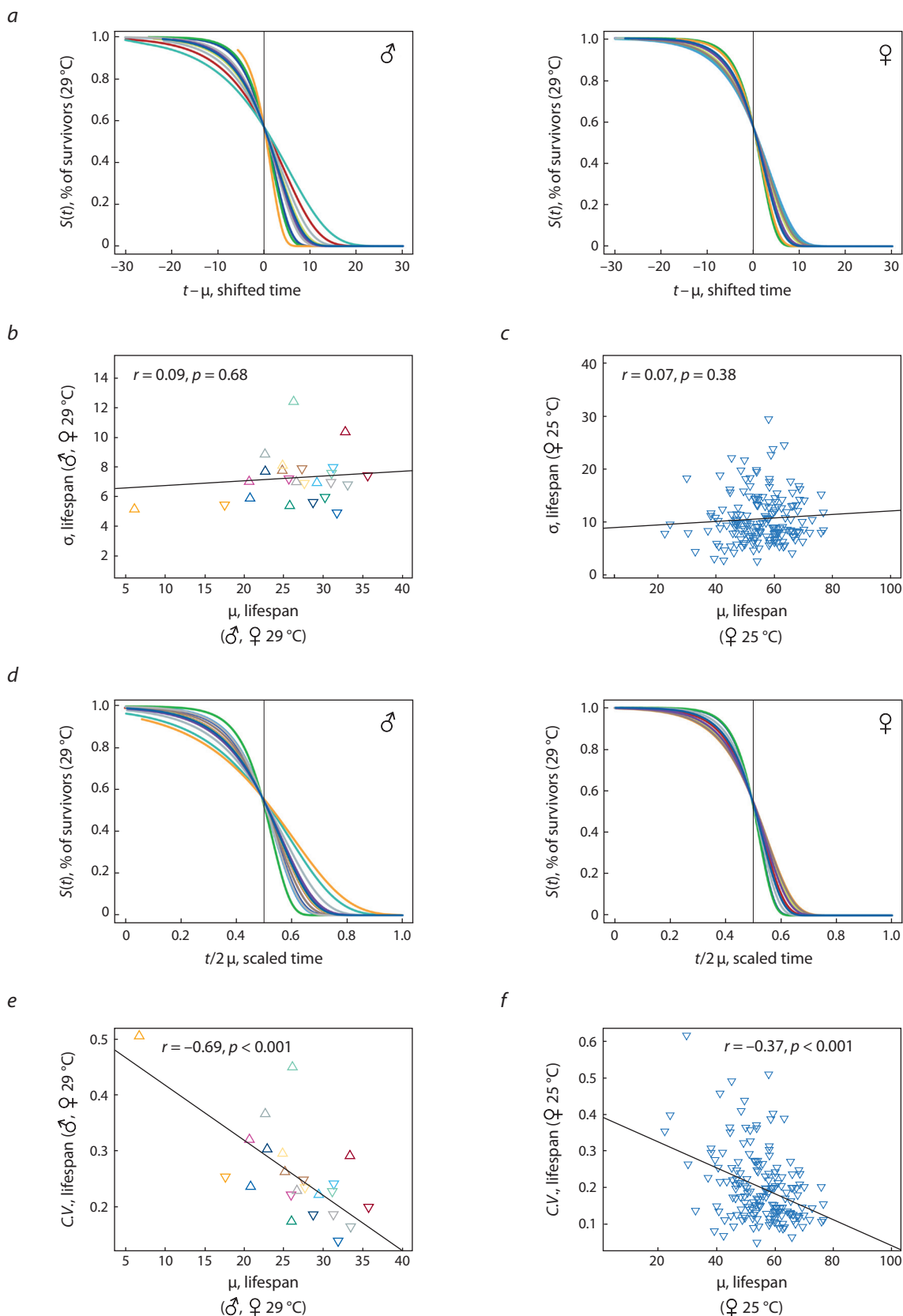


Fig. 3. Relationships among lifespan parameters μ , σ , and C.V.

(a) Survival curves (see Fig. 2a) centered around life expectancy ($t - \mu$). (b, c) Steepness of the survival curves σ in the absolute time scale does not correlate with life expectancy μ for inbred DGRP strains grown at (b) 29 °C and (c) 25 °C. The data for females grown at 25 °C are reported in (Ivanov et al., 2015). (d) Survival curves (Fig. 2a) in the mean-normalized ($t/2\mu$) time scale. (e, f) Coefficients of lifespan variation (C. V.) inversely correlate with life expectancy μ for flies grown at (e) 29 °C and (f) 25 °C.

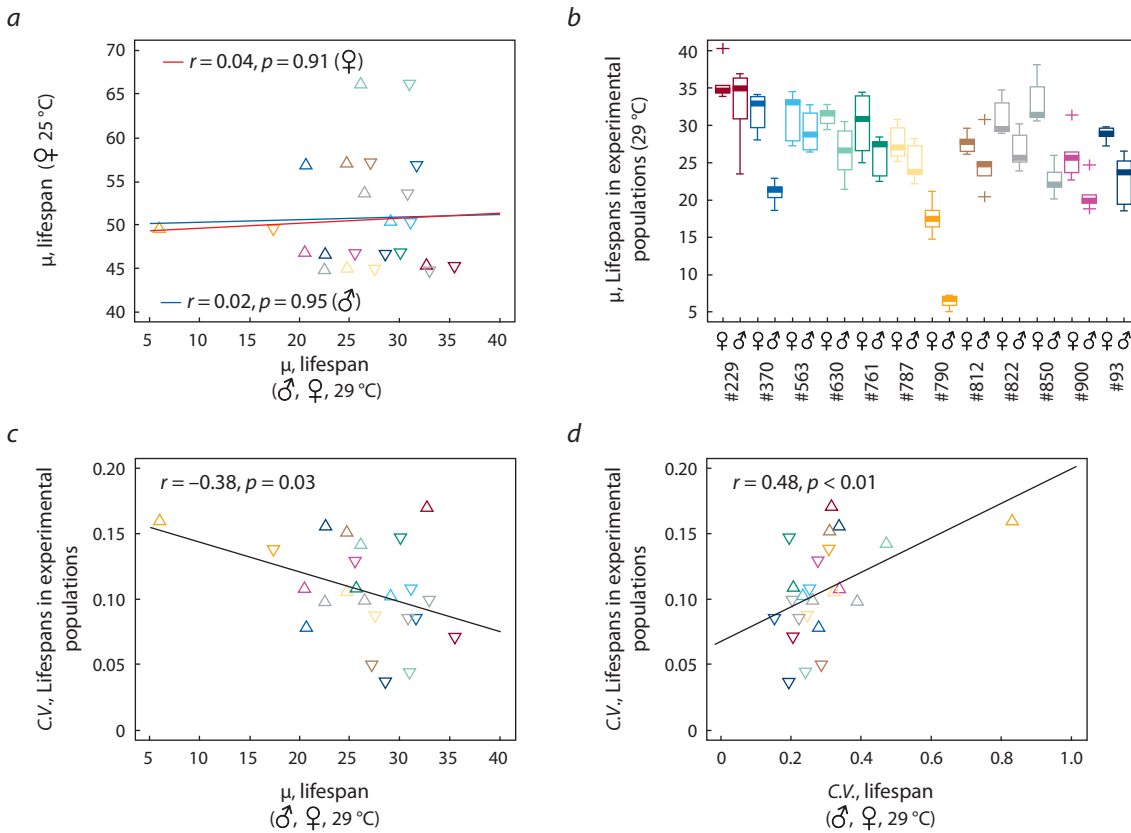


Fig. 4. Effects of experimental fluctuations on aging.

(a) Life expectancies for females and males of inbred DGRP strains grown at 29 °C closely correlate to each other ($r = 0.86$) but not to the mean lifetime of females of the same strains grown at 25 °C. (b) Life expectancies for inbred DGRP strains grown at 29 °C broadly vary among the experimental populations (individual tubes). (c, d) Coefficients of life expectancy variation estimated for each population of DGRP strains inversely correlate with mean lifespan (c) and directly with C. V. (d) determined from data integrated for each DGRP strain (Fig. 2).

должительности жизни между биологическими повторами обратно коррелируют со средней продолжительностью жизни (см. рис. 4, б) и положительно – с C.V. (см. рис. 4, з), определенными на основе общей выборки.

Временное масштабирование функции дожития $S(t)$ при разных температурах. Ранее было показано, что при изменении температуры (T_i, T_j) функции дожития масштабируются по времени как $S_{T_i}(t|\mu_i, \sigma_i) \approx S_{T_j}[\frac{t}{\mu_j} | \mu_j, \sigma_j]$ для *Caenorhabditis elegans* (Stroustrup et al., 2016). Иными словами, при увеличении температуры кривые дожития смещаются и сжимаются пропорционально (для $T_i > T_j$, $\mu_i > \mu_j$ и $\sigma_i > \sigma_j$) при сохранении равенства в C.V. $[\frac{\sigma_i}{\mu_i} = \frac{\sigma_j}{\mu_j}]$, т.е. нормализованной крутизны (см. Материалы и методы; рис. 1, б). Это, в свою очередь, предполагает, что сдвиг в кинетике реакций за счет температуры ($\ln(k) \sim -1/T$) пропорционально ускоряет или замедляет старение.

Так как мухи – пойкилотермные животные, то можно ожидать схожее масштабирование функции дожития, как у нематод, при изменении температуры. Действительно, сопоставление параметров функций дожития для линий DGRP, выращенных при 29 °C и 25 °C, выявило, что $\mu_{25\text{ °C}} > \mu_{29\text{ °C}}$ и $\sigma_{25\text{ °C}} > \sigma_{29\text{ °C}}$, в то время как $C.V._{25\text{ °C}} \approx$

$\approx C.V._{29\text{ °C}}$ (рис. 5, а). Таким образом, кривые дожития, нормализованные на среднюю продолжительность жизни, оказываются приблизительно равными:

$$S_{25\text{ °C}}\left[\frac{1}{\mu_{25\text{ °C}}}\left|1, \sigma_{25\text{ °C}}\right.\right] \approx S_{29\text{ °C}}\left[\frac{1}{\mu_{29\text{ °C}}}\left|1, \sigma_{29\text{ °C}}\right.\right]$$

(см. рис. 5, б, в). Отсюда следует, что температура ожидаемо сдвигает среднюю продолжительность жизни, но, в отличие от генотипа, не влияет на фенотипическую изменчивость, выраженную через C.V.

Заключение

В настоящей работе мы обнаружили следующую закономерность: фенотипическая изменчивость в продолжительности жизни, выраженная через коэффициент вариации, обратно коррелирует со средней продолжительностью жизни для разных генотипов *Drosophila melanogaster*. В свою очередь, фенотипическая робастность как обратная величина к C.V. положительно коррелирует со средней продолжительностью жизни. По большому счету это происходит из того, что средняя продолжительность жизни и среднеквадратичное отклонение в продолжительности жизни декоррелированы. И так как C.V. показывает фенотипическую изменчивость, нормированную на среднее значение, то это и приводит к обратному соотношению

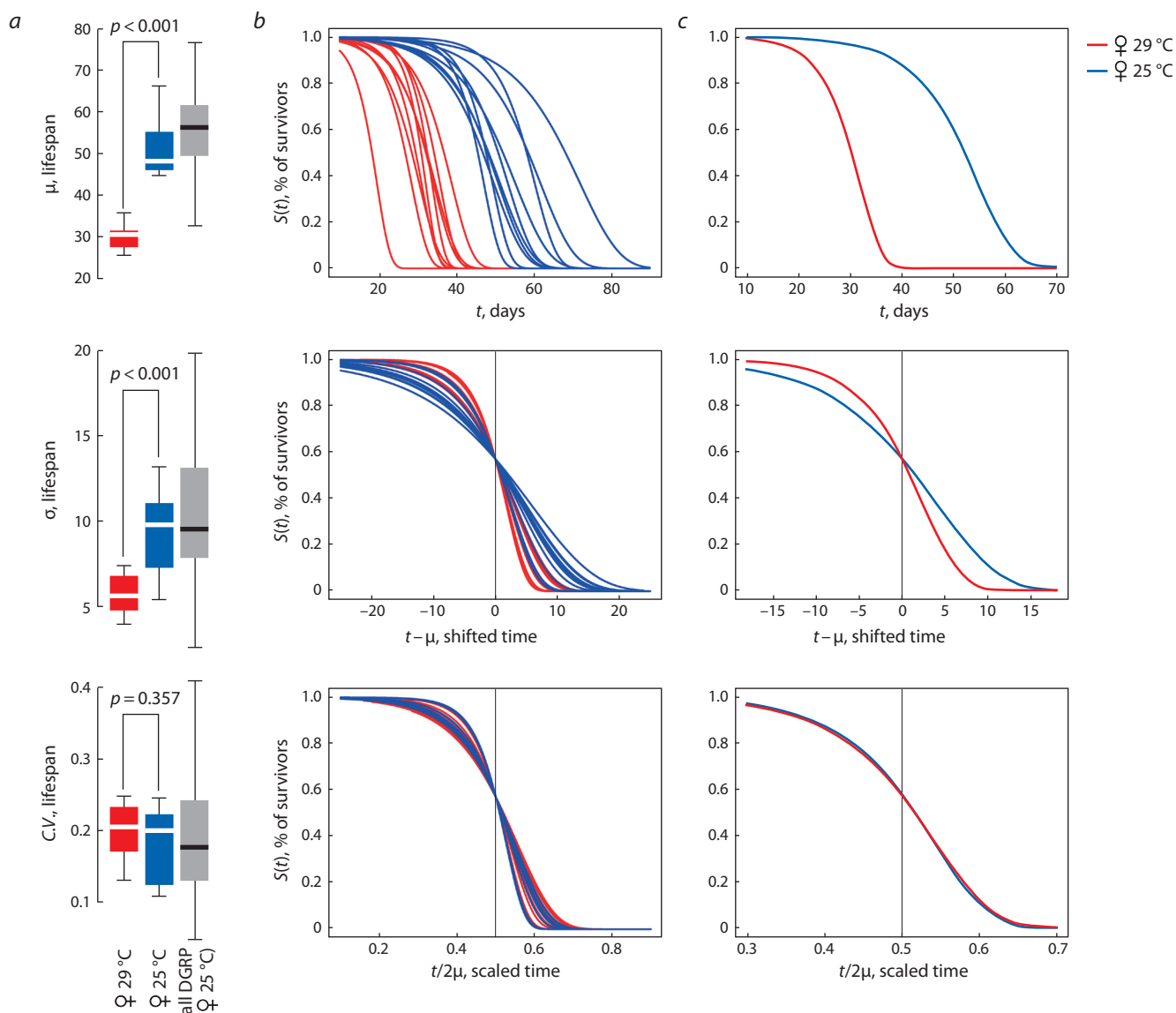


Fig. 5. Time scaling of survival curves with temperature.

(a) Boxplots of lifespan parameters: μ , σ , and C.V. for females of DGRP strains grown at 29 °C (red boxes), for females of the same strains grown at 25 °C (blue boxes), and for females of other DGRP strains grown at 25 °C (gray boxes) (Ivanov et al., 2015). The comparisons are based on paired Student's t test. Boxes correspond to the 1st and the 3rd interquartile ranges, lines indicate medians, and whiskers define the sample range without outliers. It is evident that the absolute steepness (σ) of the survival curves changes with temperature, whereas normalized steepness (C.V.) does not. (b) Gumbel survival curves calculated from estimated μ and σ parameters for DGRP strains grown at 29 °C (red lines) and 25 °C (blue lines). (c) Gumbel survival curves calculated from averaged μ and σ parameters for DGRP strains grown at 29 °C (red lines) and 25 °C (blue lines).

между изменчивостью в продолжительности жизни с самой продолжительностью жизни.

Отсюда возникает вопрос о том, что первично, а что вторично: увеличение продолжительности жизни приводит к увеличению фенотипической робастности либо, наоборот, фенотипическая робастность определяет увеличение продолжительности жизни? В нашем понимании причинно-следственных связей, мы склоняемся ко второй интерпретации. Действительно, 1) нам не известно ни одного гена, единственной функцией которого был бы контроль над продолжительностью жизни. Большинство известных генов, регулирующих продолжительность жизни, в первую очередь, участвуют в таких процессах,

как репарация ДНК (включая репликацию теломер), метаболизм и т. д., которые и определяют общую стабильность и устойчивость биологической системы (Kenyon et al., 1993; Ayyadevara et al., 2008; Garinis et al., 2008; Zane et al., 2014; Ivanov et al., 2015; Proshkina et al., 2015; Pan, Finkel, 2017; Van Raamsdonk, 2017); 2) нам не известно ни одного внешнего фактора, который бы напрямую регулировал исключительно продолжительность жизни. Так, например, диета влияет прежде всего на метаболизм и, следовательно, на продолжительность жизни.

Таким образом, мы полагаем, что стабильные биологические системы могут отличаться повышенной фенотипической робастностью и, как следствие, увеличенным

временем жизни. Это мы и наблюдаем при сопоставлении фенотипической изменчивости продолжительности жизни со средней продолжительностью жизни.

Acknowledgments

The purchase of laboratory animals was supported by State Budgeted Project 0324-2017-0004 (Bioresource Collections). A.V.P. acknowledges the support of data analysis and interpretation by the Russian Science Foundation, project 16-14-10288. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ayyadevara S., Alla R., Thaden J.J., Shmookler Reis R.J. Remarkable longevity and stress resistance of nematode PI3K-null mutants. *Ageing Cell*. 2008;7:13-22. DOI 10.1111/j.1474-9726.2007.00348.x.
- Garinis G.A., van der Horst G.T., Vijg J., Hoeijmakers J.H. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat. Cell Biol*. 2008;10:1241-1247. DOI 10.1038/ncb1108-1241.
- Gompertz B. On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality, and on a New Mode of Determining the Value of Life Contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1825;115:513-583. DOI 10.1098/rstl.1825.0026.
- Greenwood F.R.S. "Laws" of mortality from the biological point of view. *J. Hyg*. 1928;28:267-294. DOI 10.1017/S002217240000961X.
- Gumbel E.J. *Statistics of extremes*. N. Y.: Columbia University Press, 1958.
- Huang W., Massouras A., Inoue Y., Peiffer J., Ramia M., Tarone A.M., Turlapati L., Zichner T., Zhu D., Lyman R.F., Magwire M.M., Blankenburg K., Carbone M.A., Chang K., Ellis L.L., Fernandez S., Han Y., Highnam G., Hjelm C.E., Jack J.R., Javaid M., Jayaseelan J., Kalra D., Lee S., Lewis L., Munidasa M., Ongeri F., Patel S., Perales L., Perez A., Pu L., Rollmann S.M., Ruth R., Saada N., Warner C., Williams A., Wu Y.Q., Yamamoto A., Zhang Y., Zhu Y., Anholt R.R., Korbel J.O., Mittelman D., Muzny D.M., Gibbs R.A., Barbadilla A., Johnston J.S., Stone E.A., Richards S., Deplancke B., Mackay T.F. Natural variation in genome architecture among 205 *Drosophila melanogaster* genetic reference panel lines. *Genome Res*. 2014;24:1193-1208. DOI 10.1101/gr.171546.113.
- Hulbert A.J., Pamplona R., Buffenstein R., Buttemer W.A. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev*. 2007;87:1175-1213. DOI 10.1152/physrev.00047.2006.
- Ivanov D.K., Escott-Price V., Ziehm M., Magwire M.M., Mackay T.F., Partridge L., Thornton J.M. Longevity GWAS using the *Drosophila* Genetic Reference Panel. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci*. 2015;70:1470-1478. DOI 10.1093/gerona/glv047.
- Kapahi P., Kaerberlein M., Hansen M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Res. Rev*. 2017;39:3-14. DOI 10.1016/j.arr.2016.12.005.
- Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc*. 1958;53:457-481. DOI 10.2307/2281868.
- Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 1993;366:461-464. DOI 10.1038/366461a0.
- Lopez-Otin C., Galluzzi L., Freije J.M., Madeo F., Kroemer G. Metabolic control of longevity. *Cell*. 2016;166:802-821. DOI 10.1016/j.cell.2016.07.031.
- Mackay T.F., Richards S., Stone E.A., Barbadilla A., Ayroles J.F., Zhu D., Casillas S., Han Y., Magwire M.M., Cridland J.M., Richardson M.F., Anholt R.R., Barron M., Bess C., Blankenburg K.P., Carbone M.A., Castellano D., Chaboub L., Duncan L., Harris Z., Javaid M., Jayaseelan J.C., Jhangiani S.N., Jordan K.W., Lara F., Lawrence F., Lee S.L., Librado P., Linheiro R.S., Lyman R.F., Mackey A.J., Munidasa M., Muzny D.M., Nazareth L., Newsham I., Perales L., Pu L.L., Qu C., Ramia M., Reid J.G., Rollmann S.M., Rozas J., Saada N., Turlapati L., Worley K.C., Wu Y.Q., Yamamoto A., Zhu Y., Bergman C.M., Thornton K.R., Mittelman D., Gibbs R.A. The *Drosophila melanogaster* genetic reference panel. *Nature*. 2012;482:173-178. DOI 10.1038/nature10811.
- Mair W., Goymer P., Pletcher S.D., Partridge L. Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. *Science*. 2003;301:1731-1733. DOI 10.1126/science.1086016.
- Markov A.V., Naimark E.B., Yakovleva E.U. Temporal scaling of age-dependent mortality: dynamics of aging in *Caenorhabditis elegans* is easy to speed up or slow down, but its overall trajectory is stable. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81:906-911. DOI 10.1134/S0006297916080125.
- Missov T.I., Lenart A., Nemeth L., Canudas-Romo V., Vaupel J.W. The Gompertz force of mortality in terms of the modal age at death. *Demographic Res*. 2015;32:1031-1048. DOI 10.4054/DemRes.2015.32.36.
- Moore D.F. *Applied Survival Analysis Using R*. Springer International Publishing, 2016.
- Pan H., Finkel T. Key proteins and pathways that regulate lifespan. *J. Biol. Chem*. 2017;292:6452-6460. DOI 10.1074/jbc.R116.771915.
- Proshkina E.N., Shaposhnikov M.V., Sadritdinova A.F., Kudryavtseva A.V., Moskalev A.A. Basic mechanisms of longevity: A case study of *Drosophila* pro-longevity genes. *Ageing Res. Rev*. 2015;24:218-231. DOI 10.1016/j.arr.2015.08.005.
- Rigby R.A., Stasinopoulos D.M. Generalized additive models for location, scale and shape. *J. Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*. 2005;54:507-554. DOI 10.1111/j.1467-9876.2005.00510.x.
- Rogina B. INDI-A New link to metabolic regulation in animals and humans. *Front. Genet*. 2017;8:66. DOI 10.3389/fgene.2017.00066.
- Shaw R.F., Bercaw B.L. Temperature and life-span in poikilothermous animals. *Nature*. 1962;196:454-457. DOI 10.1038/196454a0.
- Speakman J.R. Body size, energy metabolism and lifespan. *J. Exp. Biol*. 2005;208:1717-1730. DOI 10.1242/jeb.01556.
- Stasinopoulos D.M., Rigby R.A. Generalized additive models for location scale and shape (GAMLSS). *J. Stat. Softw*. 2007;23:46. DOI 10.18637/jss.v023.i07.
- Stroustrup N., Anthony W.E., Nash Z.M., Gowda V., Gomez A., Lopez-Moyado I.F., Apfeld J., Fontana W. The temporal scaling of *Caenorhabditis elegans* ageing. *Nature*. 2016;530:103-107. DOI 10.1038/nature16550.
- Tacutu R., Craig T., Budovsky A., Wuttke D., Lehmann G., Taranukha D., Costa J., Fraifeld V.E., de Magalhães J.P. Human ageing genomic resources: integrated databases and tools for the biology and genetics of ageing. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:D1027-D1033. DOI 10.1093/nar/gks1155.
- Therneau T.M., Grambsch P.M. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. N. Y.: Springer-Verlag, 2000.
- Van Raamsdonk J.M. Mechanisms underlying longevity: A genetic switch model of aging. *Exp. Gerontol*. 2017. Ahead of print. DOI 10.1016/j.exger.2017.08.005.
- Vermeij W.P., Dolle M.E., Reiling E., Jaarsma D., Payan-Gomez C., Bombardieri C.R., Wu H., Roks A.J., Botter S.M., van der Eerden B.C., Youssef S.A., Kuiper R.V., Nagarajah B., van Oostrom C.T., Brandt R.M., Barnhoorn S., Imholz S., Pennings J.L., de Bruin A., Gyenis A., Pothof J., Vijg J., van Steeg H., Hoeijmakers J.H. Restricted diet delays accelerated ageing and genomic stress in DNA-repair-deficient mice. *Nature*. 2016;537:427-431. DOI 10.1038/nature19329.
- Zane L., Sharma V., Misteli T. Common features of chromatin in aging and cancer: cause or coincidence? *Trends Cell Biol*. 2014;24:686-694. DOI 10.1016/j.tcb.2014.07.001.