



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biochimie

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Determinanți genetici și microbieni ai longevității la
Drosophila melanogaster

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT
CS I Dr. Andrei-J. Petrescu

DOCTORAND
Larisa Sârghie

2025

Cuprins

MULȚUMIRI.....	2
I. INTRODUCERE GENERALĂ ÎN CERCETAREA ÎMBĂTRÂNIRII.....	4
I.1. Introducere în cercetarea îmbătrânirii, teorii, caracteristici.....	4
I.4. Căi și mecanisme ale îmbătrânirii.....	4
I.5. Rolul organismelor model în cercetarea genetică.....	5
I.6. Modele genetice pentru studiul îmbătrânirii.....	6
I.7. <i>Drosophila melanogaster</i> ca organism model.....	7
I.7.1. Avantajele utilizării <i>Drosophila</i> în cercetarea îmbătrânirii.....	7
I.7.2. Microbiomul intestinal și îmbătrânirea la <i>Drosophila</i>	7
I.7.3. Intervenții și căi de semnalizare pentru promovarea longevității.....	10
I.7.4. Abordări de biologie sistemică în studiul îmbătrânirii.....	11
II. BAZA DE DATE SYNERGY AGE ȘI ROLUL SĂU ÎN CERCETAREA ÎMBĂTRÂNIRII.....	14
II.1. Introducere în Synergy Age.....	14
II.1.1. Prezentare generală a bazei de date.....	14
II.1.2. Selectarea interacțiunilor genice asociate îmbătrânirii.....	15
II.2. Metode.....	16
II.3. Concluzii.....	19
III. INTERACȚIUNILE GENICE DIN SYNERGYAGE: EXPLORAREA UNOR NOI CĂI ALE ÎMBĂTRÂNIRII.....	20
III.1. Introducere.....	20
III.2. Metode.....	21
III.3. Rezultate și discuții.....	24
IV.4. Concluzii.....	30
IV. INTERVENȚII GENETICE ÎN DROSOPHILA: ROLUL GENEI PARKIN ÎN MICROBIOM ȘI ÎMBĂTRÂNIRE.....	31
IV.1. Introducere.....	31
IV.2. Metode.....	34
IV.3. Rezultate.....	38
IV.4. Discuții.....	66
V.5. Concluzii.....	69
V. CONCLUZII FINALE.....	70
LISTA FIGURILOR.....	72
LISTA TABELEROR.....	73
LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PREZENTĂRIILOR.....	73
BIBLIOGRAFIE.....	74

I. INTRODUCERE GENERALĂ ÎN CERCETAREA ÎMBĂTRÂNIRII

Cercetarea îmbătrânirii a evoluat de la înțelegerea mecanismelor fundamentale ale acestui proces la explorarea strategiilor pentru prelungirea duratei de viață și a sănătății pe parcursul îmbătrânirii (*healthspan*). Teoriile clasice includ acumularea mutațiilor propusă de Medawar și pleiotropia antagonică formulată de Williams, care explică îmbătrânirea ca rezultat al compromisurilor evolutive. Cadrul conceptual al „trăsăturilor distinctive ale îmbătrânirii” (*hallmarks of aging*) identifică procese biologice cheie, precum instabilitatea genomică, disfuncția mitocondrială și epuizarea celulelor stem, drept ținte pentru intervenții terapeutice.

Îmbătrânirea este determinată de rețele complexe de căi interconectate, inclusiv stresul oxidativ, declinul mitocondrial și semnalizarea insulină/IGF (*insulin/IGF signaling*, IIS). Daunele provocate de speciile reactive de oxigen (ROS) accelerează îmbătrânirea, în timp ce reducerea activității IIS prelungeste durata de viață, așa cum se observă la mutații *daf-2* (*Caenorhabditis elegans*) și *InR* (*Drosophila melanogaster*). Înțelegerea acestor mecanisme oferă direcții pentru dezvoltarea unor intervenții anti-îmbătrânire.

Organismele model, precum *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* și șoarecii (*Mus musculus*), sunt esențiale în studiul îmbătrânirii. *Drosophila* este intens utilizată datorită ciclului său de viață scurt, instrumentelor genetice avansate și similitudinii de aproximativ 70% cu genele umane implicate în boli. Aceasta a contribuit la elucidarea rolului căilor IIS, TOR și a interacțiunilor microbiomului intestinal în îmbătrânire. Modificările asociate vârstei în compoziția microbiomului influențează răspunsurile imune, iar studiile pe *Drosophila* arată că echilibrul microbiomului afectează atât durata de viață, cât și sănătatea organismului.

Prin investigarea căilor de îmbătrânire la organisme model, cercetătorii vizează dezvoltarea unor strategii direcționate pentru încetinirea îmbătrânirii și prevenirea bolilor asociate vârstei. *Drosophila melanogaster* rămâne un sistem model esențial pentru testarea abordărilor genetice și farmacologice în cercetarea îmbătrânirii.

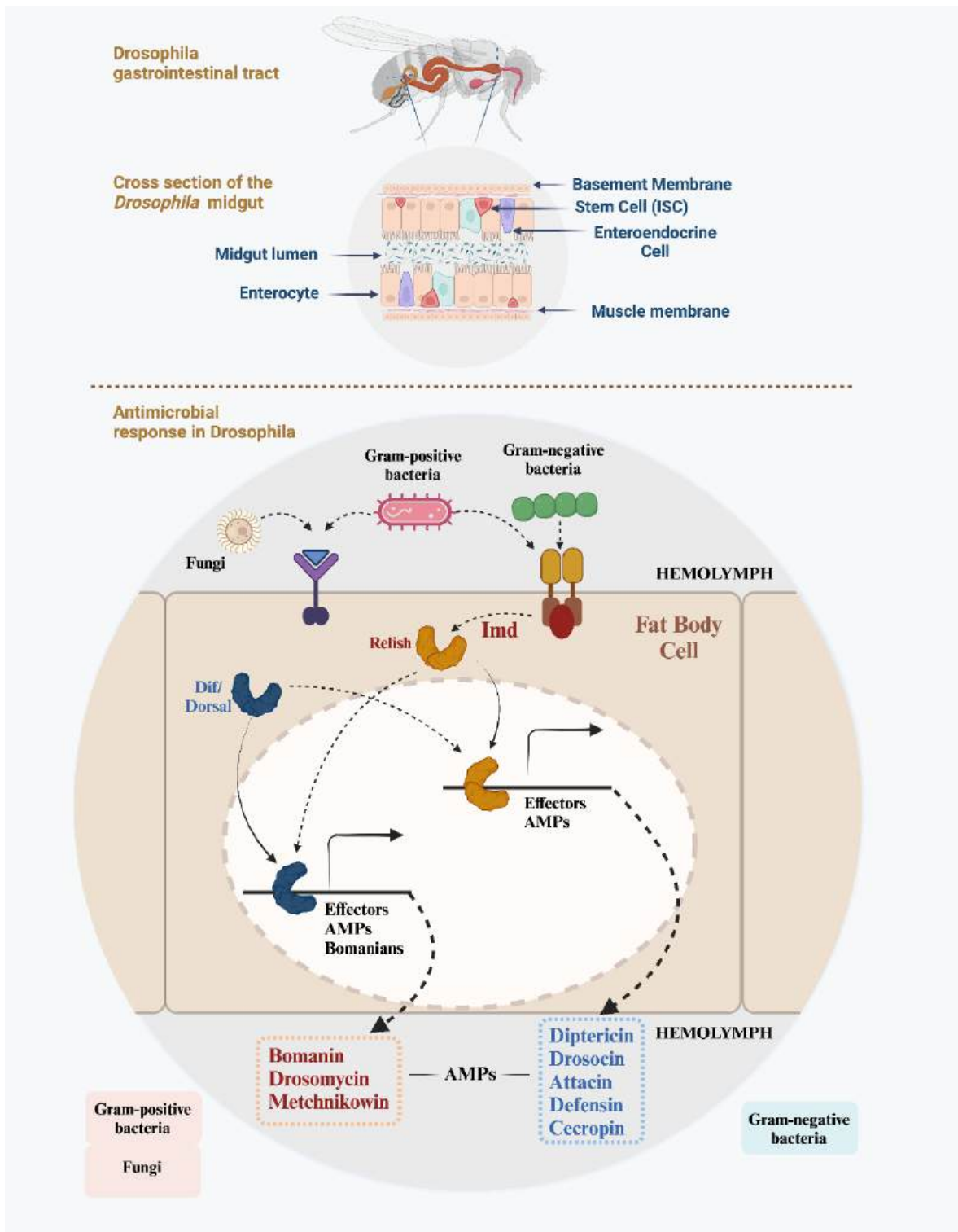


Figura I.1. Tractul gastrointestinal și mecanismul peptidelor antimicrobiene (AMPs) în răspunsul imun la *Drosophila*. Adaptat din Hanson și Lemaitre, 2020, „New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond,” *Current Opinion in Immunology*, 62, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.11.008>. Creat în BioRender. Sarghie, L. (2024) <https://BioRender.com/q02f682>.

II. BAZA DE DATE SYNERGYAGE ȘI ROLUL SĂU ÎN CERCETAREA ÎMBĂTRÂNIRII

Unele dintre rezultatele discutate în acest capitol au fost publicate anterior în: Bunu, G., Toren, D. et al., *Scientific Data* 7, 366 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00710-z>

II.1. Introducere în SynergyAge

SynergyAge este o bază de date curatoriată care documentează interacțiunile dintre gene asociate longevității (*longevity-associated genes*, LAGs), evidențiind efectele sinergice și antagonice asupra duratei de viață. Predicția interacțiunilor dintre mutațiile genice este dificilă din cauza fenomenului de epistază, problemă pe care SynergyAge o abordează prin integrarea datelor despre durata de viață obținute din experimente pe *C. elegans*, *D. melanogaster* și *M. musculus*. Interacțiunile genetice sunt clasificate ca aditive, dependente, sinergice sau antagonice, oferind perspective asupra reglementării procesului de îmbătrânire.

Baza de date include o platformă interactivă pentru analiza rețelelor genice, facilitând proiectarea studiilor de longevitate și modelarea predictivă. Prin catalogarea datelor privind durata de viață și facilitarea comparațiilor între specii, SynergyAge reprezintă o resursă esențială pentru cercetarea îmbătrânirii.

În timpul studiilor mele, am contribuit la curatorierea bazei de date SynergyAge (Bunu et al., 2020), concentrându-mă pe datele privind *D. melanogaster* și parțial pe *C. elegans*. Rolul meu a implicat colectarea și verificarea studiilor privind durata de viață, standardizarea interacțiunilor genice și asigurarea consistenței în denumirile genelor și detaliile studiilor. Prin clasificarea acestor interacțiuni, am urmărit să îmbunătățesc accesibilitatea bazei de date, transformând-o într-un instrument practic pentru explorarea influenței genetice asupra îmbătrânirii.

II.2. Metode

Pentru a evalua impactul combinării a două mutații genetice, s-au realizat măsurători ale duratei de viață pentru patru tulpini: tip sălbatic (*wild type*, WT), două mutanți simpli (G1 și G2) și dublul mutant (G1;G2). Efectul fiecărui mutant asupra longevității a fost calculat ca procent de diferență față de tipul sălbatic, utilizând următoarele formule:

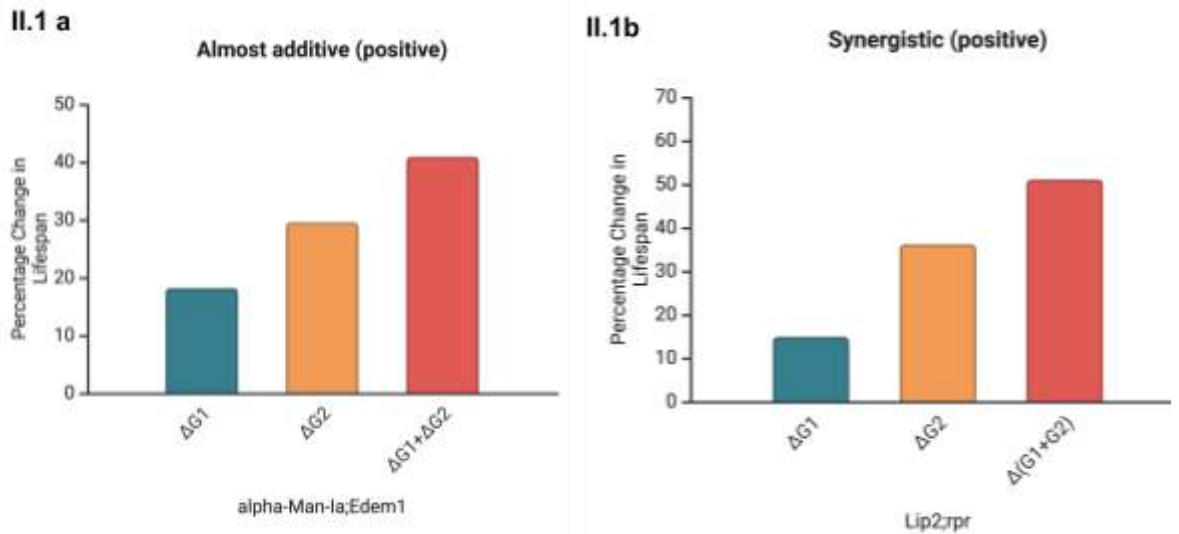
$$\Delta G1 = \frac{(\text{lifespan}(G1) - \text{lifespan}(WT)) \times 100}{\text{lifespan}(WT)}$$

$$\Delta G2 = \frac{(\text{lifespan}(G2) - \text{lifespan}(WT)) \times 100}{\text{lifespan}(WT)}$$

Aşa cum este menţionat în *Bunu et al., 2020*, în cazurile în care ambele mutaţii au avut un impact pozitiv asupra duratei de viaţă ($\Delta G1 \times \Delta G2 > 0$), efectele combinate au fost evaluate şi clasificate astfel:

- **Fully synergistic** if $|\Delta(G1, G2)| > |\Delta G1| + |\Delta G2|$ $|\Delta(G1, G2)| > |\Delta G1| + |\Delta G2|$
- **Additive** if $|\Delta(G1, G2)| \approx |\Delta G1| + |\Delta G2|$ $|\Delta(G1, G2)| \approx |\Delta G1| + |\Delta G2|$
- **Almost additive** when $|\Delta(G1, G2)|$ lies between $\max(|\Delta G1|, |\Delta G2|)$ and $|\Delta G1| + |\Delta G2|$
- **Dependent (antagonistic)** if $|\Delta(G1, G2)| < \max(|\Delta G1|, |\Delta G2|)$ but greater than $\min(|\Delta G1|, |\Delta G2|)$
- **Fully antagonistic** if $|\Delta(G1, G2)| < \min(|\Delta G1|, |\Delta G2|)$

Mai multe astfel de interacţiuni epistatice au fost curatoriate în baza de date SynergyAge. Pentru a exemplifica, mai jos sunt incluse diverse reprezentări grafice (Figura II.1), care ilustrează aceste interacţiuni în combinaţii specifice de gene asociate longevităţii (LAGs) la *Drosophila*.



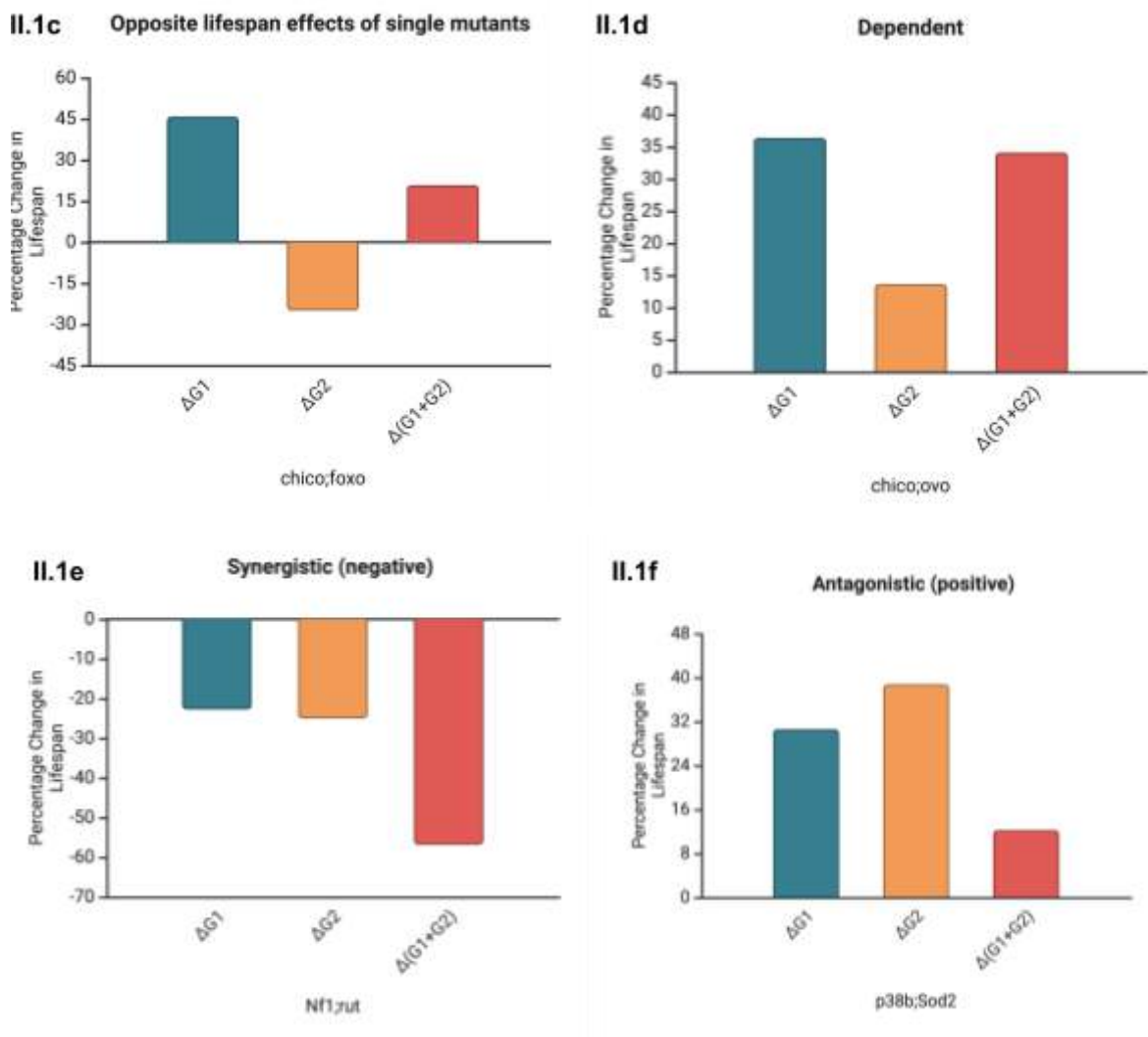


Figura II.1. Reprezentări grafice ale interacțiunilor sinergice și antagonice selectate între gene asociate longevității la *Drosophila* (a) aproape aditivă (pozitivă), (b) complet sinergică (pozitivă), (c) efecte opuse ale mutanților simpli, (d) interacțiuni dependente, (e) synergism negativ și (f) antagonism pozitiv.

Creat în BioRender. **Sarghie, L. (2024)** <https://BioRender.com/q02f682>.

II.3. Concluzii

Prin integrarea datelor despre mutanți simpli și combinați, SynergyAge permite înțelegerea efectelor sinergice și antagonice dintre genele asociate longevității. Interfața sa interactivă facilitează explorarea datelor complexe, identificarea tiparelor relevante și vizualizarea interacțiunilor care pot ghida cercetările viitoare.

În cazul *Drosophila*, unde datele sunt încă limitate, acest studiu a evidențiat tipuri cheie de interacțiuni, demonstrând modul în care SynergyAge poate orienta cercetarea chiar și în prezența unor lacune de date. Prin designul intuitiv și curatorierea riguroasă,

SynergyAge oferă nu doar perspective imediate, ci și sprijin pentru dezvoltarea unor experimente direcționate, contribuind la descifrarea mecanismelor genetice ale îmbătrânirii.

III. INTERACȚIUNILE GENICE DIN SYNERGY AGE: EXPLORAREA UNOR NOI CĂI ÎN ÎMBĂTRÂNIRE

O parte din aceste rezultate au fost acceptate pentru publicare în Vol. 28, No. 5 (2023) al revistei *Romanian Biotechnological Letters*.

III.1. Introducere

Drosophila melanogaster a jucat un rol esențial în cercetarea îmbătrânirii, cu aproape 200 de gene asociate longevității documentate în baza de date GenAge (Tacutu et al., 2018). În timp ce *C. elegans* are peste 1.770 de interacțiuni genetice înregistrate care influențează durata de viață, *Drosophila* rămâne relativ neexplorată, cu doar 27 de combinații genetice studiate (Bunu et al., 2020). Extinderea acestor cercetări ar putea identifica căi conservate ale îmbătrânirii.

Acest studiu utilizează SynergyAge pentru a investiga interacțiunile genice în *Drosophila*, concentrându-se pe *InR* și *GaO*, ortologi ai *daf-2* și *odr-3* din *C. elegans*. Este primul studiu care evaluează experimental rolul *GaO* în îmbătrânirea *Drosophila*. Deoarece *InR* reglează calea conservată de semnalizare insulină/IGF-1 (*IIS*), reducerea activității sale prelungește durata de viață prin sporirea rezistenței la stres (Krishnan et al., 2024). *GaO*, implicat în dezvoltarea sistemului nervos și apoptoză, poate influența, de asemenea, longevitatea.

Inspirat de studiile pe *C. elegans* care au evidențiat extinderea sinergică a duratei de viață, acest studiu testează dacă manipularea combinată a *InR* și *GaO* la *Drosophila* poate prelungi durata de viață, oferind perspective asupra mecanismelor conservate ale îmbătrânirii.

III.2. Metode

Acest studiu integrează multiple surse de date pentru a investiga interacțiunile genice care influențează longevitatea la *Drosophila melanogaster*. Interacțiunile proteină-proteină au fost obținute din BioGRID, iar interacțiunile genetice sinergice asociate duratei de viață au fost identificate folosind baza de date SynergyAge.

Compararea între specii (*Caenorhabditis elegans* și *Drosophila*) a fost realizată utilizând pachetul *orthogene*.

Pentru vizualizarea datelor, Cytoscape (v3.10.1) a fost utilizat pentru cartografierea și analiza interacțiunilor genetice complexe. Tulpinile experimentale de *Drosophila*, inclusiv mutații *GαO* și *InR*, au fost obținute de la Bloomington Drosophila Stock Center, cu linia Canton-S utilizată ca martor. Musculițele au fost crescute pe mediu Nutri-Fly™ Bloomington Formulation.

Pentru generarea mutațiilor dubli și tripli în experimentele de durată de viață, s-au realizat încrucișări genetice specifice în condiții controlate. Aceasta a inclus obținerea mutațiilor *GαO* - *InR*, *GαO* - *eIF*, *eIF* - *InR* și *GαO* - *eIF* - *InR*. Strategiile de încrucișare, designul experimental și selecția mutațiilor au fost riguros planificate și sunt rezumate în Figura III.1.

Testele de longevitate au fost efectuate pe grupuri sincronizate de *Drosophila melanogaster* (număr egal de masculi și femele), menținute la o densitate de 27–32 de indivizi per fiolă. Musculițele au fost transferate la intervale de 2–3 zile pe mediu proaspăt, iar mortalitatea a fost înregistrată pe parcursul întregii lor vieți. Transferurile s-au realizat fără anestezie pentru a evita stresul, în special la indivizii vârstnici. Pentru analiza datelor, s-a calculat durata mediană de viață, iar curbele de supraviețuire Kaplan-Meier au fost generate. Compararea grupurilor s-a realizat prin testul log-rank, iar modelul Gompertz-Makeham a fost aplicat pentru a evalua dacă modificările duratei de viață se datorează unor schimbări în rata îmbătrânirii sau în starea generală de sănătate.

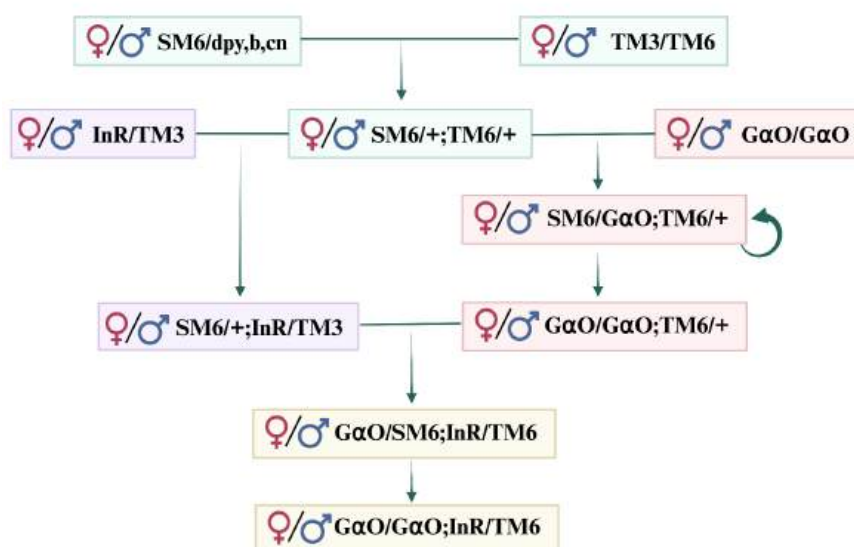


Figura III.1. Încrucișări pentru generarea mutantului dublu *GαO - InR*.

Liniile drepte cu săgeți indică încrucișări între linii genetice distincte, în timp ce buclele reprezintă împerecherea în cadrul aceleiași linii. Această figură a fost publicată anterior în *Romanian Biotechnological Letters*, în curs de apariție. Creat în BioRender. **Sarghie, L. (2024)** <https://BioRender.com/q02f682>.

III.3. Rezultate și Discuție

Această secțiune prezintă analiza rețelelor construite pentru investigarea genelor asociate longevității (*LAGs*) prin identificarea interacțiunilor proteină-proteină și relațiilor sinergice prezise. Aceste rețele oferă un cadru pentru înțelegerea căilor potențial implicate în reglarea duratei de viață la *Drosophila melanogaster*, cu accent pe interacțiuni esențiale precum cele dintre *InR* și *GαO*. Prin examinarea structurilor rețelelor, a nodurilor cheie și a conexiunilor dintre gene, ne propunem să identificăm mecanisme genetice relevante pentru îmbătrânire. De asemenea, sunt discutate rezultatele privind durata de viață pentru mutații simple și duble ai genelor *GαO* și *InR*, evidențiind modul în care aceste modificări genetice influențează longevitatea. Compararea între mutații cu o singură genă și mutantul dublu *GαO - InR* permite evaluarea efectelor combinate, pentru a determina dacă acestea sunt aditive, sinergice sau independente în reglarea longevității.

O rețea esențială (Figura III.2d) evidențiază *LAGs* cu interacțiuni directe cu *GαO* și *InR*, obținute din baza de date BioGRID. Analiza interacțiunilor de gradul întâi scoate în evidență conexiunile genetice primare care ar putea juca un rol în reglarea duratei de viață la *Drosophila*.

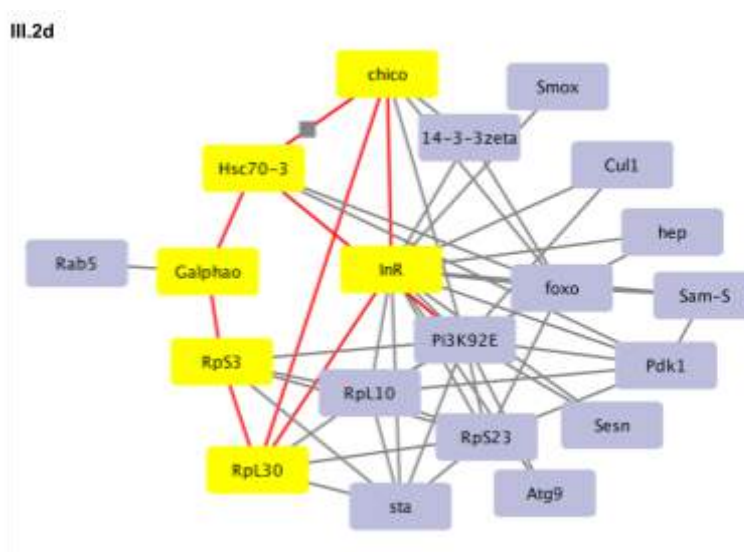


Figura III.2. Prezentare generală a rețelelor de gene asociate longevității (LAGs) la *Drosophila melanogaster* (a) interactomul complet al *Drosophila*, (b) ortologi *C. elegans* ai genelor LAGs, (c) combinații specifice de LAGs la *Drosophila* din SynergyAge și (d) interacțiunile de gradul întâi ale *GαO* și *InR*.

În continuare, am examinat durata de viață a mutațiilor *Drosophila melanogaster* pentru *GαO*, *InR* și mutantul dublu *GαO; InR*, în comparație cu martorul tip sălbatic *Canton-S* (Figura III.3). Controlul *Canton-S* a atins o durată maximă de viață de 42 de zile. În contrast, mutantul *InR* a prezentat o creștere moderată la 62 de zile (Figura III.3a; $p < 0.0001$), în timp ce mutantul *GαO* a avut o extindere mai semnificativă, atingând 72 de zile (Figura III.3b; $p < 0.0001$). De menționat, mutantul dublu *GαO; InR* a avut o durată de viață intermediară, de 65 de zile, mai scurtă decât cea a mutantului *GαO*, dar mai lungă decât cea a mutantului *InR* (Figura III.3c; $p < 0.0001$).

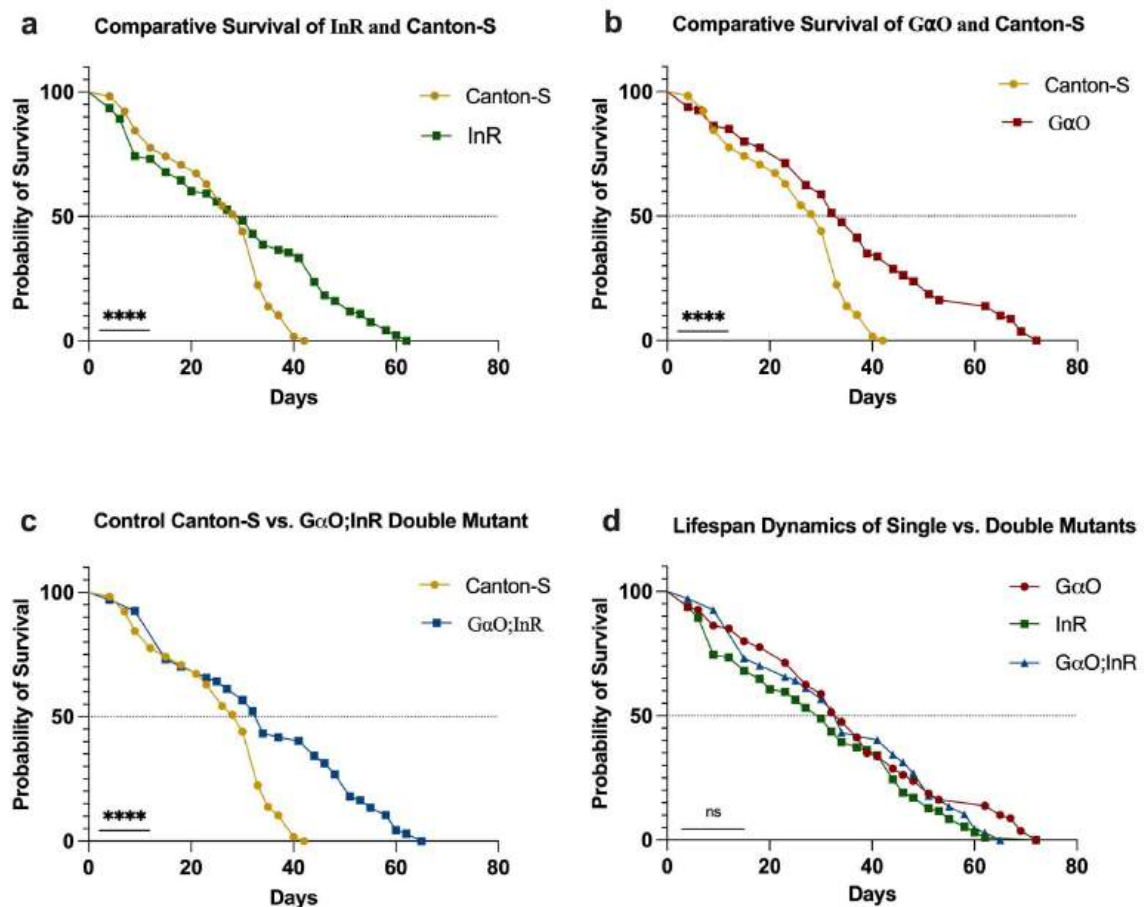


Figura III.3. Curbe de supraviețuire și analiză comparativă a duratei de viață (a) Durata de viață a *Canton-S* și mutantului *InR*; (b) Compararea duratei de viață între *Canton-S* și mutantul *GαO*; (c) Compararea duratei de viață între *Canton-S* și mutantul

dublu *GαO; InR*; (d) Compararea supraviețuirii între mutanții simpli *InR*, *GαO* și mutantul dublu *GαO; InR*. Această figură a fost publicată anterior în *Romanian Biotechnological Letters*, în curs de apariție.

Analiza statistică a evidențiat diferențe semnificative în durata de viață între mutanții simpli *InR* și *GαO* comparativ cu martorul *Canton-S* ($p < 0.0001$), precum și între mutantul dublu *GαO; InR* și martor. Deși ambii mutanți simpli au prezentat o prelungire a duratei de viață, mutantul *GαO* a trăit mai mult decât *InR* ($p = 0.0145$). Totuși, durata de viață a mutantului *GαO* nu a fost semnificativ diferită de cea a mutantului dublu *GαO; InR* ($p > 0.05$), indicând o interacțiune dependentă, mai degrabă decât sinergică.

Mutantul *GαO* a atins o durată de viață de 72 de zile, subliniind rolul semnalizării prin receptori cuplați la proteine G (GPCR) în reglarea longevității, o cale cunoscută pentru influența sa asupra activității neuronale și metabolismului (Krishnan et al., 2024; Devambez et al., 2013). Mutantul *InR*, cu o durată de viață de 62 de zile, se aliniază cu funcția căii de semnalizare insulină/IGF-1 (*IIS*), un regulator bine stabilit al îmbătrânirii (Bai et al., 2013; Kaletsky și Murphy, 2010).

Faptul că mutantul dublu *GαO; InR* (65 de zile) nu a prezentat o extindere suplimentară a longevității față de *GαO* sugerează mecanisme dependente sau suprapuse, mai degrabă decât efecte independente. Lipsa unui efect sinergic este în concordanță cu modelele din baza de date SynergyAge, care indică frecvența ridicată a interacțiunilor non-aditive în căile de îmbătrânire. Acest rezultat sugerează că *IIS* și GPCR pot convergea către ținte comune, explicând lipsa unui efect aditiv asupra longevității.

Întrucât ambele căi influențează metabolismul, răspunsul la stres și semnalizarea neuronală, interacțiunea lor ar putea implica mecanisme comune de reglare. Aceste rezultate contribuie la o înțelegere mai profundă a interacțiunilor genetice în îmbătrânire și evidențiază necesitatea studierii suprapunerilor dintre aceste căi. Cercetările viitoare ar trebui să exploreze interacțiunea moleculară dintre *GαO* și *InR* și modul în care factorii de mediu, precum microbiomul intestinal, ar putea influența aceste efecte genetice asupra longevității.

IV.4. Concluzii

Acest studiu evidențiază modul în care anumite căi genetice interacționează pentru a influența îmbătrânirea la *Drosophila melanogaster*. Analiza mutanților simpli *GaO* și *InR*, alături de mutantul dublu *GaO; InR*, a arătat că, deși fiecare mutație extinde individual durata de viață, combinarea lor nu oferă un beneficiu suplimentar față de *GaO* singur. Aceasta sugerează că aceste gene acționează pe căi suprapuse, având o limită comună a extinderii longevității, în special prin intermediul semnalizării IIS și GPCR.

Analizele de rețea, susținute de datele din SynergyAge, indică faptul că aceste efecte non-aditive sunt o caracteristică comună a căilor de îmbătrânire, demonstrând complexitatea și interconectarea mecanismelor genetice în reglarea longevității. Aceste constatări contribuie la o mai bună înțelegere a modului în care genele *Drosophila* influențează îmbătrânirea și subliniază importanța explorării conexiunilor moleculare dintre *GaO* și *InR*.

De asemenea, cercetările viitoare ar trebui să analizeze cum factorii externi, precum microbiomul intestinal, pot interacționa cu aceste căi genetice pentru a influența durata de viață, deschizând noi direcții în cercetarea îmbătrânirii.

IV. INTERVENȚII GENETICE ÎN *DROSOPHILA*: ROLUL GENEI *PARKIN* ÎN MICROBIOM ȘI ÎMBĂTRÂNIRE

Aceste rezultate fac parte dintr-un manuscris pregătit pentru publicare, bazat pe cercetări desfășurate la University of California, Los Angeles (UCLA), în cadrul laboratorului Dr. David Walker, în Departamentul de Biologie Integrativă și Fiziologie. Studiul a fost susținut de o bursă Fulbright acordată de guvernul României.

IV.1. Introducere

Gena *Parkin* (*PARK2*), un regulator esențial al mitofagiei și degradării proteinelor, joacă un rol protector împotriva stresului oxidativ și neurodegenerării (Kitada et al., 1998; Narendra et al., 2008). Mutațiile în *PARK2* sunt asociate cu boala Parkinson cu debut precoce (PD) și afectează funcția mitocondrială, accelerând îmbătrânirea și progresia bolii (Clark et al., 2006). În timp ce PD este corelată cu alterări ale microbiomului intestinal (Khedr et al., 2021), impactul supraexprimării *Parkin* asupra compoziției microbiomului rămâne neexplorat.

Acest studiu a investigat efectele supraexprimării *Parkin* la *Drosophila melanogaster*, utilizând musculițele daGS>UAS-*Parkin*, analizate la zilele 10, 30, 45 și 60. Secvențierea *16S rRNA* a relevat că *Parkin* modulează compoziția microbiomului într-o manieră dependentă de vârstă. Musculițele control mai vârstnice (ziua 60) au prezentat o încărcătură microbiană mai mare (*Acetobacter*, *Lactobacillus*) comparativ cu musculițele cu supraexprimare *Parkin*, în timp ce musculițele tinere cu *Parkin* supraexprimat (ziua 10) au arătat o creștere a *Acetobacter*, *Enterobacter* și *Lactobacillus* (Figura IV.2). Analizele ulterioare au indicat că musculițele cu supraexprimare *Parkin* aveau mai puține specii bacteriene până la ziua 45, iar *Commensalibacter* a contribuit la stabilizarea microbiomului intestinal (Figura IV.4). Analiza diversității beta a confirmat influența *Parkin* asupra structurii microbiomului, în special asupra genurilor implicate în fermentație (Figurile IV.11 și IV.12).

Experimentele de transplant microbian la musculițe *Canton-S* axenice au arătat că microbiomul provenit de la musculițele control vârstnice (zilele 30 și 60) a redus durata de viață, în timp ce microbiomul provenit de la musculițele cu supraexprimare *Parkin* a menținut stabilitatea longevității (Figura IV.13). În plus, analiza peptidelor antimicrobiene (AMP) a arătat că microbiomul control a indus răspunsuri inflamatorii, în timp ce microbiomul provenit de la musculițele cu supraexprimare *Parkin* a prevenit activarea imună (Figura IV.14).

Aceste descoperiri sugerează că *Parkin* modelează compoziția microbiomului, reducând modificările inflamatorii asociate vârstei și menținând stabilitatea microbiană, evidențiind un potențial rol al *Parkin* în reglarea îmbătrânirii, dincolo de controlul calității mitocondriale.

IV.2. Metode

Acest studiu a investigat impactul supraexprimării genei *parkin* și al îmbătrânirii asupra microbiomului intestinal, longevității și răspunsurilor imune la *Drosophila melanogaster*. Schema experimentală este rezumată în Figura IV.1, care prezintă cele două componente principale ale experimentului: prelevarea de probe din intestinul mediu pentru analiza microbiomului, evaluarea duratei de viață și a răspunsului imun.

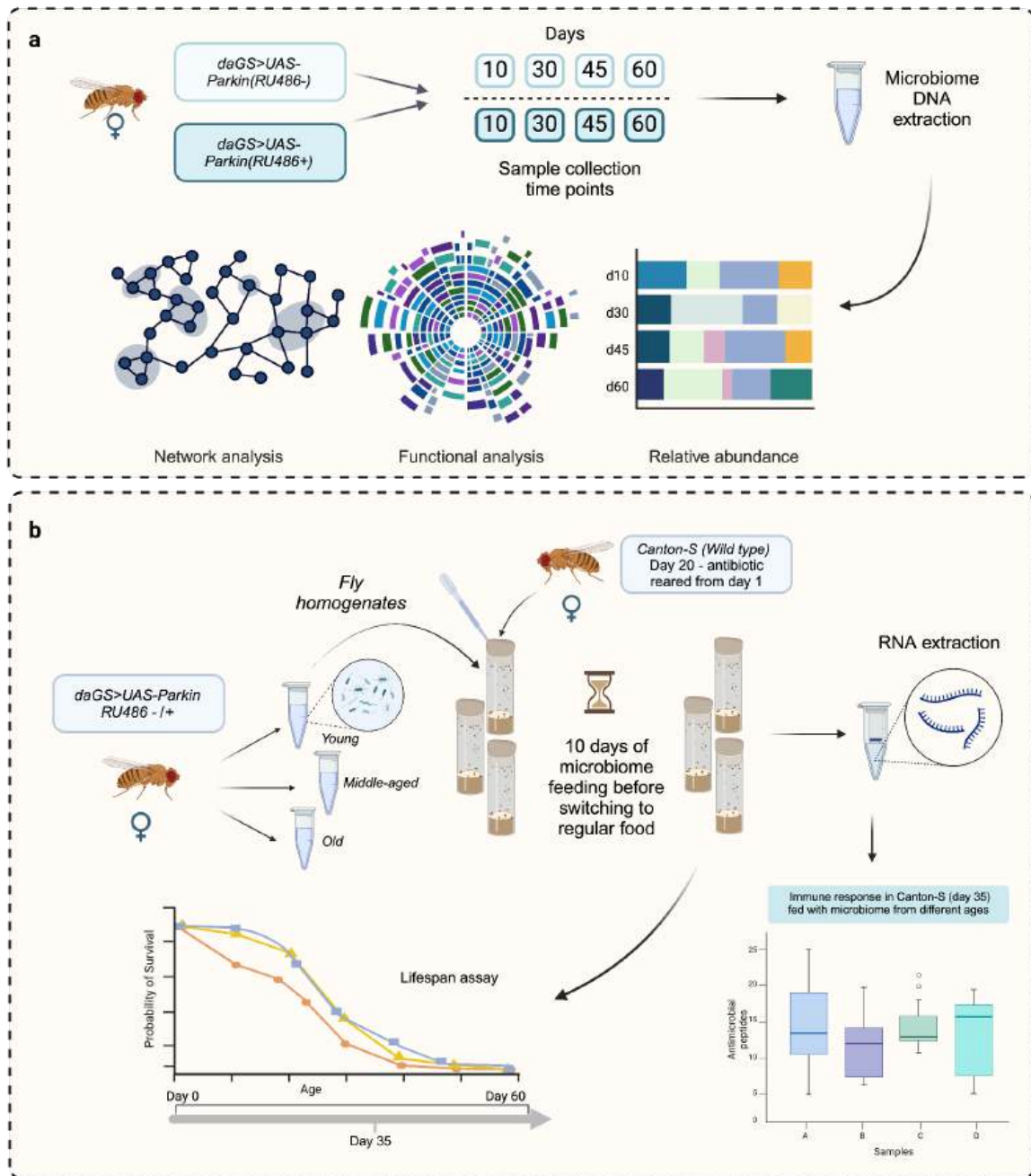


Figura IV.1. Diagramă a fluxului experimental (a) Disecția intestinului mediu și analiza microbiomului: Ilustrare a prelevării probelor de intestin mediu de la *Drosophila melanogaster* martor (neindus) și cu supraexprimare *Parkin* (indus) la diferite vârste (zilele 10, 30, 45 și 60), urmată de extracția ADN microbial, analiza abundenței relative, secvențiere metagenomică și analiza de rețea a genelor asociate microbiomului. (b) Evaluarea duratei de viață și a răspunsului imun: Reprezentare a testului de longevitate și a evaluării peptidelor antimicrobiene (AMP), unde musculițele *Canton-S* axenice, după reintroducerea microbiomului de la probe de vârste diferite, sunt monitorizate pentru

durata de viață și expresia genelor *AMP* după extracția ARN-ului la ziua 35. Creat în BioRender. Sarghie, L. (2024) <https://BioRender.com/q02f682>.

Acest studiu a utilizat musculițe tip sălbatic *Canton-S* și musculițe *daGS>UAS-Parkin*, unde supraexprimarea *Parkin* a fost indusă prin sistemul RU486 GeneSwitch. Musculițele au fost crescute pe mediu pe bază de cornmeal, iar femelele de trei zile au fost sincronizate pentru experimente.

Durata de viață a fost evaluată prin administrarea RU486 (5 µg/ml), cu grupuri de control tratate cu etanol. Musculițele au fost menținute în grupuri de 27–32 indivizi per fiolă, transferate la fiecare 2–3 zile, și monitorizate până la sfârșitul ciclului de viață. Pentru reintroducerea microbiomului, musculițele *Canton-S* axenice au fost generate printr-un tratament antibiotic de 20 de zile, confirmat prin teste de cultură. Microbiomele provenite de la musculițe *daGS>UAS-Parkin* tinere, de vârstă medie și vârstnice (RU486+/-) au fost reintroduse, iar musculițele au fost menținute timp de 10 zile înainte de revenirea la dieta standard.

Compoziția microbiomului a fost analizată prin secvențiere 16S rRNA. ADN-ul microbial a fost extras din intestinul mediu disecat, iar regiunea V4 a 16S rRNA a fost secvențiată pe platforma Illumina MiSeq. Analiza bioinformatică (DADA2, Picrust2) a oferit perspective taxonomice și funcționale. qPCR a fost utilizată pentru cuantificarea abundenței microbiene (*total 16S*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Enterobacter*), iar răspunsul imun a fost evaluat prin expresia genelor *AMP* (*Drosomycin*, *Diptericin*), normalizată la *Actin 5C*. Analizele statistice au inclus: diveristatea alfa (*phyloseq*), diveristatea beta (*Bray-Curtis*, *PCoA*), analiza diferențială a abundenței (*DESeq2*).

Compararea diversității a fost realizată prin PERMANOVA și ANOVA. Predicțiile metagenomice au utilizat DeepNOG și COGdb pentru a analiza modificările funcționale în genomurile metagenomice asamblate (*MAGs*) sub efectul supraexprimării *Parkin*.

IV.3. Rezultate

Supraexprimarea *Parkin* modulează compoziția microbiomului intestinal de-a lungul etapelor de viață la *Drosophila*, influențând abundența unor genuri bacteriene cheie în timp. Analiza qPCR a *16S rRNA total*, *Lactobacillus*, *Acetobacter* și *Enterobacter* la zilele 10, 30, 45 și 60 a comparat dinamica microbiomului între musculițele control (RU486-) și cele cu supraexprimare *Parkin* (RU486+) (Figura IV.2a-d).

Rezultatele au evidențiat un efect dependent de vârstă al supraexprimării *Parkin*. La musculițele tinere (ziua 10, Figura IV.2c, d) – grupul cu *Parkin* supraexprimat a avut o

abundență microbiană mai mare, sugerând un rol timpuriu în susținerea diversității microbiene și a homeostaziei intestinale. La vârsta mijlocie (ziua 30) – musculițele control au prezentat niveluri crescute de *Enterobacter* și *Lactobacillus*, indicând o fază de tranziție în reglarea microbiomului. La musculițele vârstnice (ziua 60, Figura IV.2a, b, d) – grupul control a menținut o abundență mai mare de *Acetobacter* și *Lactobacillus*, în timp ce musculițele cu *Parkin* supraexprimat au prezentat o reducere a acestora, sugerând că *Parkin* modifică mediul intestinal, limitând persistența bacteriană la gazdele îmbătrânite.

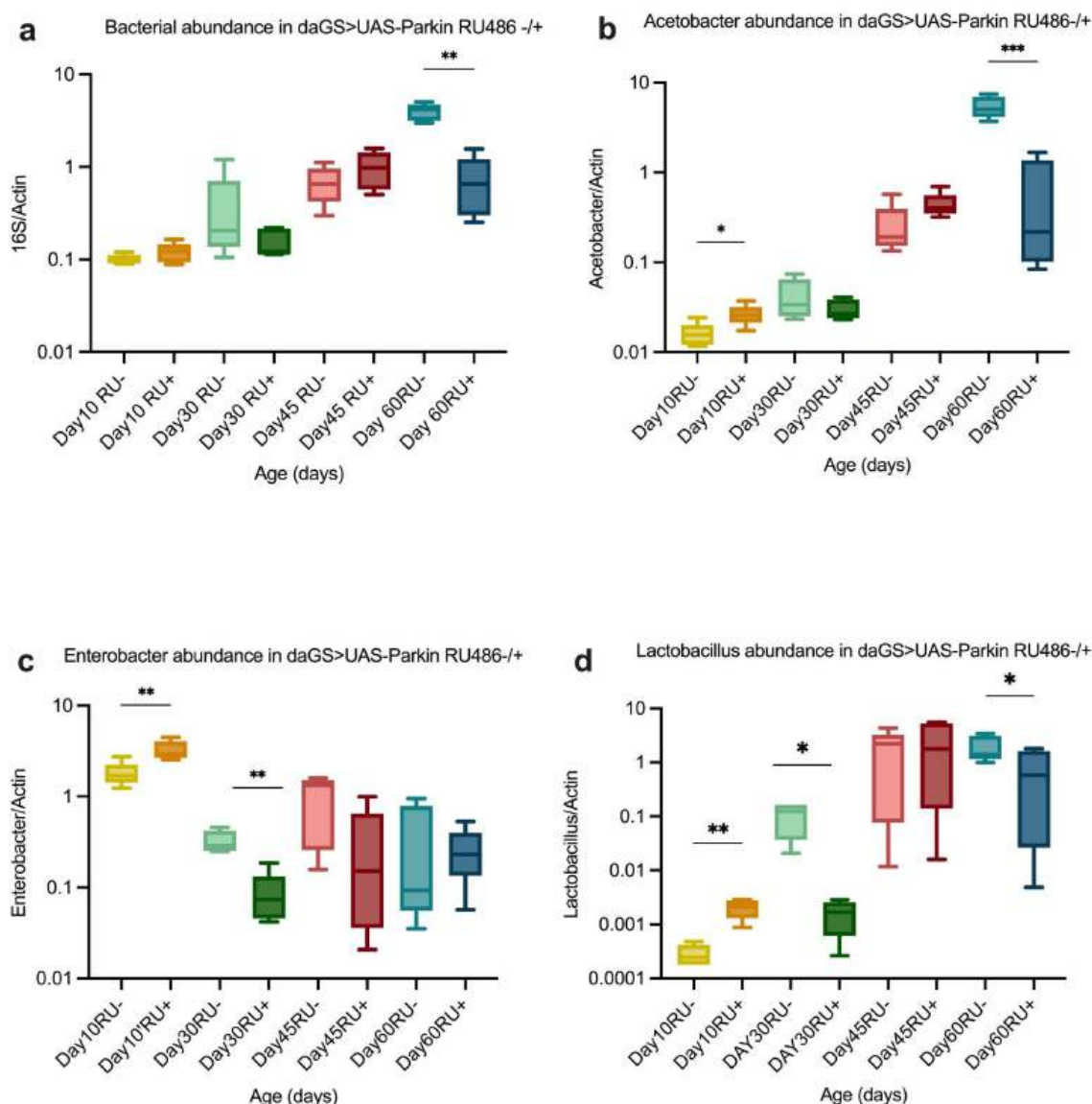


Figura IV.2. Cuantificarea abundenței bacteriene la musculițele cu supraexprimare *Parkin* și cele de control, la diferite vârste. Abundența bacteriană a fost măsurată prin qPCR pentru: (a) gena *16S* totală, (b) *Acetobacter*, (c) *Enterobacter*, (d) *Lactobacillus*.

Probe au fost colectate la patru puncte temporale (*zilele 10, 30, 45 și 60*) de la musculițele daGS>UAS-Parkin, în două condiții: supraexprimare *Parkin* (*indusă*), control (*neindus*). Supraexprimarea *Parkin* a fost activată din prima zi de viață.

Pentru a confirma că modificările observate în microbiom au fost rezultatul direct al supraexprimării *Parkin* și nu un artefact al tratamentului cu RU486, a fost generată o linie de control prin încrucișarea tulpinii W1118 cu driverul Ligand-Bound GeneSwitch (*daGS*). Această tulpină de control W1118/*daGS* a fost supusă aceluiași protocol de tratament cu RU486, utilizat pentru inducerea expresiei *Parkin* în grupurile experimentale. Probe din musculițele W1118/*daGS* control au fost colectate la aceleași puncte temporale (*zilele 10, 30, 45 și 60*), oferind o bază fiabilă de comparație cu probele de la musculițele cu expresie indusă de *Parkin* (Figura IV.3).

Rezultatele obținute din acest control au indicat nicio diferență semnificativă în compoziția microbiomului între musculițele netratate (*neinduse*) și cele tratate cu RU486 (*induse*), confirmând că tratamentul RU486 singur nu a alterat structura microbiomului. Cu toate acestea, în grupul W1118/*daGS* control, s-a observat o tendință subtilă, dependentă de vârstă, în compoziția microbiomului, reflectând o schimbare naturală a populațiilor microbiene pe măsură ce musculițele îmbătrânesc.

Aceste constatări sugerează că, deși îmbătrânirea afectează compoziția microbiomului intestinal, modificările specifice observate în grupul experimental pot fi atribuite expresiei *Parkin* și nu unor efecte secundare ale RU486. Această abordare de control consolidează concluzia conform căreia *Parkin* influențează în mod unic dinamica microbiomului intestinal pe parcursul îmbătrânirii.

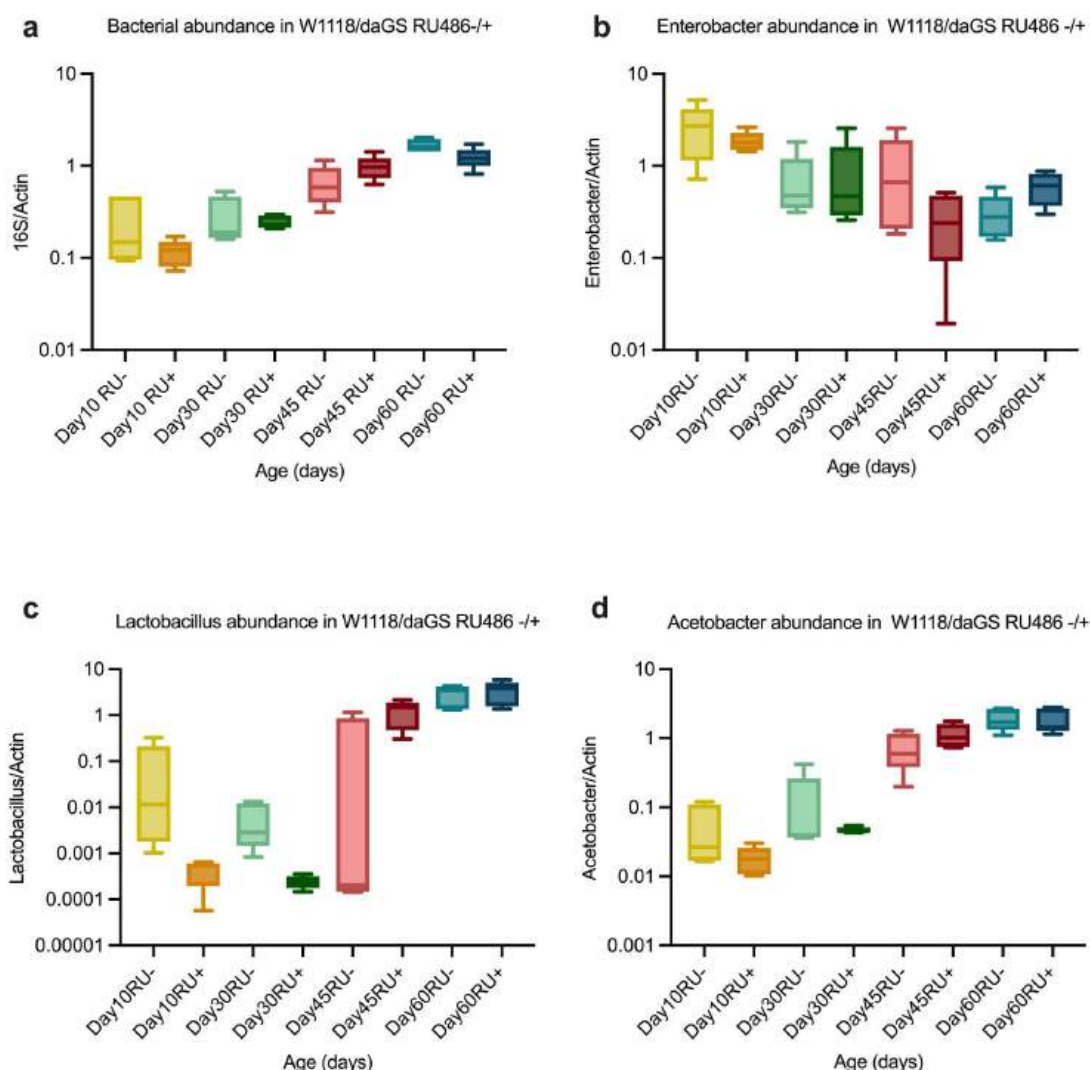


Figura IV.3. Compoziția microbiomului la tulpina de control *W1118* netratată și tratată cu RU486. Abundența bacteriană a fost măsurată prin qPCR pentru: (a) gena *16S* totală, (b) *Acetobacter*, (c) *Enterobacter*, (d) *Lactobacillus*.

Probe au fost colectate de la tulpina de control W1118/daGS la patru puncte temporale (zilele 10, 30, 45 și 60), atât în condiții netratate (*control*), cât și tratate cu RU486. Diversitatea alfa a fost evaluată utilizând Observed Richness, indicele de diversitate Shannon, Indicele de diversitate Inverse Simpson. Comparând datele din secvențierea Whole Genome Sequencing (WGS) și 16S rRNA sequencing. Secvențierea *16S rRNA* a detectat mai multe taxoni unici, în special în probele cu abundență microbiană scăzută (exemplu: S01 - 94 vs. 76 taxoni; S08 - 71 vs. 7 taxoni), demonstrând o sensibilitate mai mare pentru taxonii rari. Indicele Shannon și Inverse Simpson au indicat că WGS a identificat comunități microbiene mai uniform distribuite în probele timpurii (S01, S02), în timp ce *16S* a evidențiat o diversitate mai mare în probele tardive (S07,

S08). Aceasta sugerează că WGS a capturat taxonii dominanți, în timp ce 16S a oferit un profil taxonomic mai extins.

Aceste rezultate subliniază caracterul complementar al celor două metode. *16S rRNA* este mai eficient în detectarea taxonilor rari, în timp ce WGS oferă o perspectivă mai echilibrată asupra structurii comunităților microbiene. Alegerea metodei optime depinde de obiectivele specifice ale cercetării.

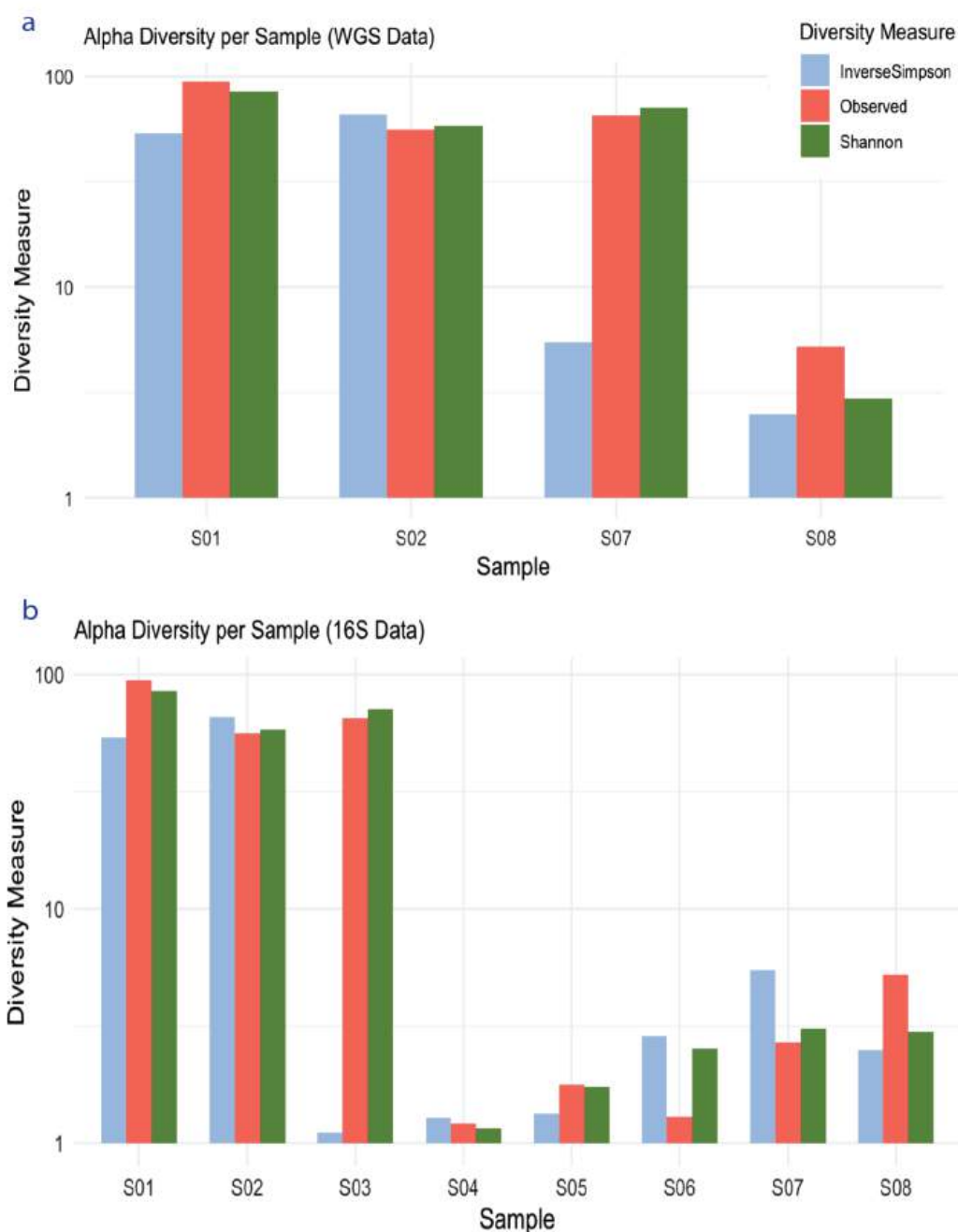


Figura IV.5. Metrice de diversitate alfa derivate din secvențierea genomului întreg (WGS) și secvențierea genei *16S rRNA* în probele analizate. Panourile (a) și (b) prezintă Richness observată, indicele Shannon și indicele Inverse Simpson pentru datele

obținute prin WGS și *16S rRNA*, oferind o analiză comparativă a diversității microbiene alfa.

Pentru a înțelege mai bine diferențele dintre comunitățile microbiene, am analizat abundența relativă a celor 25 de taxoni bacterieni predominanți, utilizând atât WGS, cât și secvențierea *16S rRNA* (Figura IV.6.a și b). Aceste analize evidențiază profiluri microbiene distincte între probe și demonstrează modul în care fiecare metodă de secvențiere surprinde compoziția comunităților microbiene în mod diferit.

În setul de date WGS (Figura IV.6.a), *Acetobacter pasteurianus* a fost specia dominantă în probele S01 și S02, sugerând o prezență semnificativă a acestuia în aceste medii microbiene. Pe de altă parte, *Lactobacillus brevis* a fost taxonul cel mai abundent în proba S08, ceea ce o diferențiază de celelalte probe. Interesant, rezultatele secvențierii *16S rRNA* (Figura IV.6.b) au identificat, de asemenea, *Lactobacillus brevis* ca fiind un component major în S08, indicând un model consistent între cele două metode de secvențiere. Acest rezultat sugerează că proba S08 prezintă o semnătură microbiană distinctă, unde *Lactobacillus brevis* joacă un rol ecologic important.

Dominanța *Lactobacillus brevis* în proba S08 ar putea fi influențată de factori de mediu, interacțiuni cu gazda sau alte presiuni selective care favorizează creșterea sa în acest eșantion. Concordanța între datele WGS și *16S rRNA* pentru acest taxon consolidează încrederea în relevanța sa biologică.

Dincolo de identificarea speciilor individuale, aceste rezultate relevă diferențe clare în compoziția microbiană între probe, demonstrând faptul că WGS și *16S rRNA* oferă perspective complementare asupra diversității comunităților microbiene. WGS surprinde un profil funcțional mai larg, secvențind genomuri întregi, în timp ce *16S rRNA* rămâne eficient pentru clasificarea taxonomică, în special pentru grupurile bacteriene dominante. Aceste constatări evidențiază impactul metodei de secvențiere asupra studiilor microbiomului și subliniază importanța interpretării rezultatelor în funcție de avantajele și limitările fiecărei abordări.

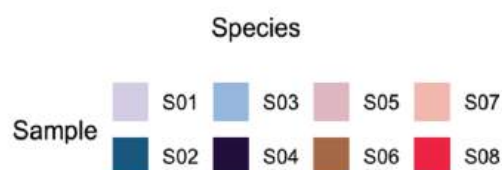
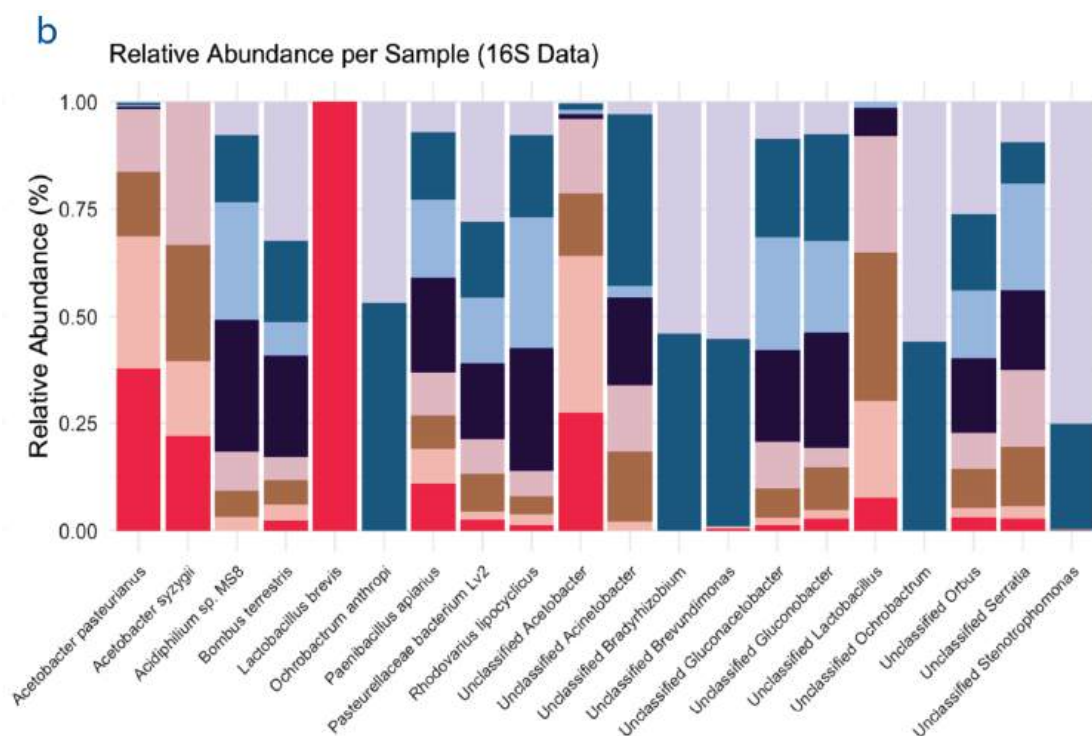
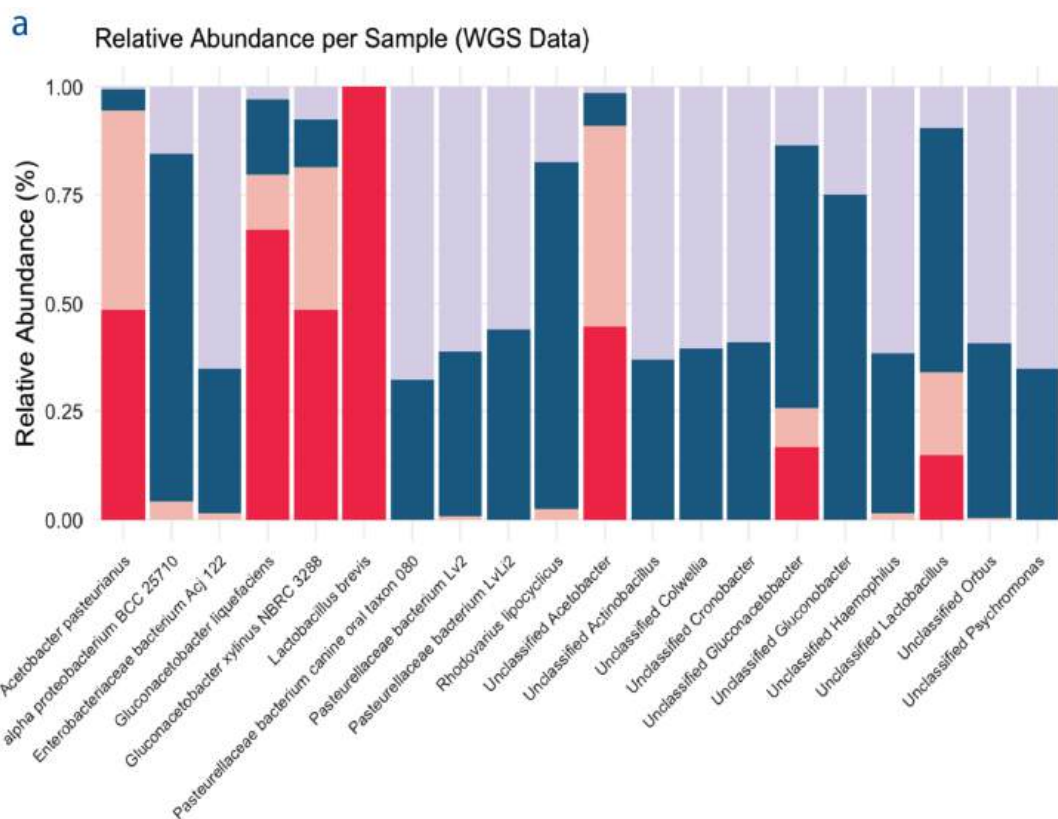


Figura IV.6. Abundența relativă a celor 25 de taxoni bacterieni predominanți identificați prin secvențierea genomului întreg (WGS) și secvențierea genei *16S rRNA*.

Panourile (a) și (b) prezintă abundența relativă (%) a celor 25 de taxoni bacterieni cei mai frecvenți, identificați prin secvențierea (WGS) și a genei *16S rRNA*.

Datele WGS au identificat 50 de gene unice asociate vârstei, fiecare având roluri metabolice distincte în funcție de stadiul de viață. La ziua 10, genele implicate în metabolismul sulfului (*SsuD*), semnalizare (*GGDEF*) și transport ionic (*ZntA*) au fost predominante. La ziua 30, funcțiile metabolice s-au orientat către metabolismul oxidativ (*LpdA*, *Acs*) și replicarea ADN-ului (*DnaE*, *GyrA*). La ziua 45, genele asociate cu repararea ADN-ului (*XerD*, *UvrA*) și rezistența la metale grele (*ArsR*) au indicat adaptarea la stresul de mediu. Până la ziua 60, microbiomul a favorizat expresia genelor responsabile de menținerea peretelui celular (*MltE*), homeostazia ionică (*NhaP*), plierea proteinelor (*GroEL*) și sinteza de ATP (*AtpF*), sugerând o tranziție către stabilitatea celulară și producția de energie în stadiile avansate ale vieții.

Aceste rezultate ilustrează modul în care metabolismul microbial se adaptează dinamic pe parcursul îmbătrânirii. Comunitățile microbiene din stadiile timpurii sunt axate pe creștere și semnalizare, în timp ce microbiomul îmbătrânit se reorientează către mecanisme de rezistență la stres și întreținere celulară.

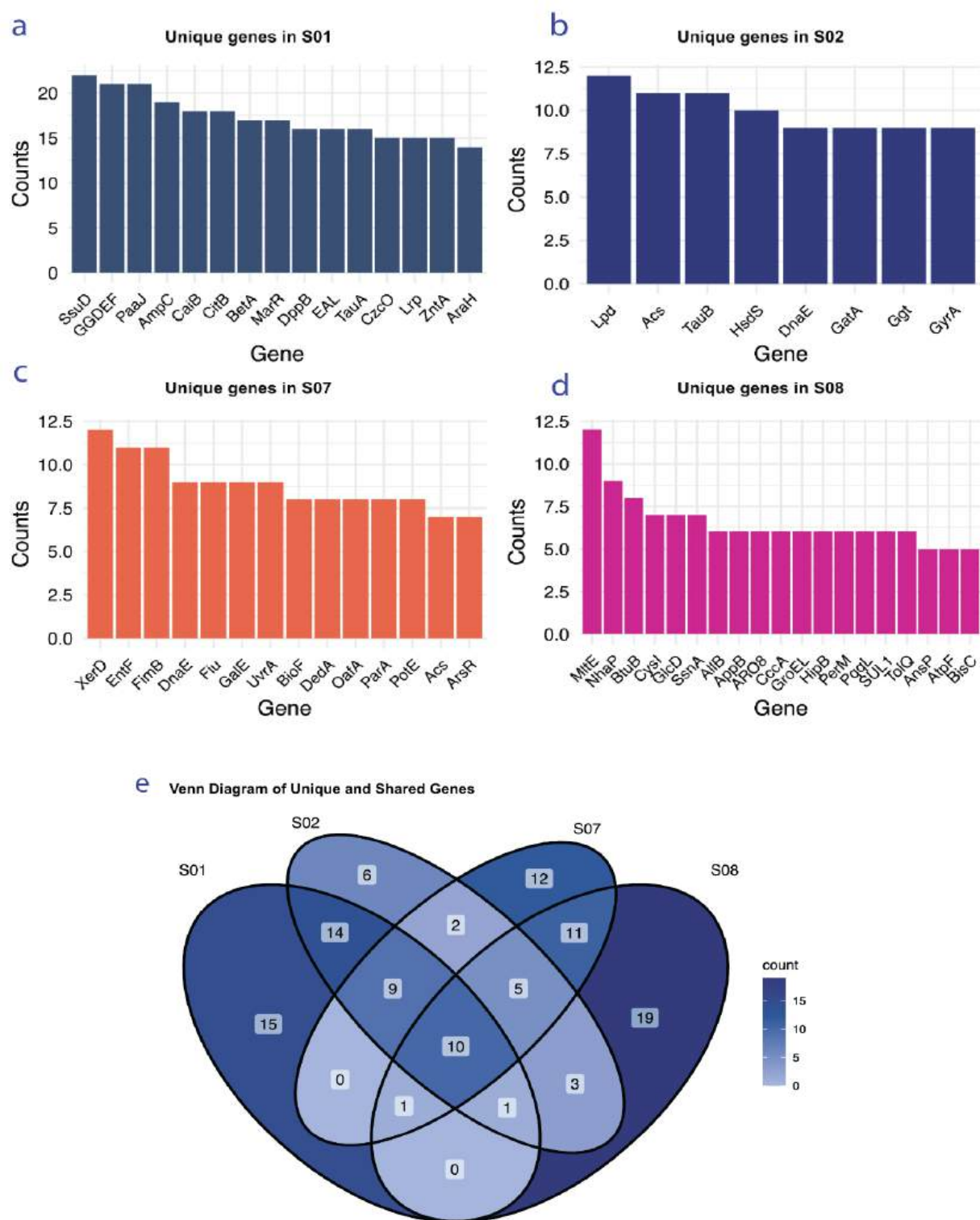


Figura IV.10. Predicția funcțiilor metabolice în probele analizate. Panourile (a)–(d) evidențiază primele 10 gene unice identificate în fiecare probă WGS, relevând funcții metabolice esențiale, precum metabolismul sulfului, repararea ADN-ului, producția de energie și răspunsul la stres. Aceste rezultate sugerează că comunitățile microbiene suferă adaptări funcționale în funcție de vârstă. Panoul (e) prezintă o diagramă Venn care

ilustrează distribuția genelor comune și unice între probe. Această reprezentare evidențiază genele centrale, comune mai multor probe, precum și seturi specifice de gene care reflectă cerințele metabolice distincte ale fiecărei comunități microbiene.

În timp ce supraexprimarea *Parkin* extinde durata de viață și susține funcția mitocondrială la *Drosophila*, efectele sale asupra microbiomului intestinal și longevității gazdei rămân neclare. Acest studiu a investigat modul în care microbiomele provenite de la musculițe cu supraexprimare *Parkin* (OE) și de la musculițe martor influențează organismele gazdă fără microbiom.

Musculițele *Canton-S* au fost supuse unui tratament antibiotic de 20 de zile pentru eliminarea microbiomului, procedură care nu a avut niciun impact asupra longevității. După această depleție microbiană, musculițele au fost expuse la microbiome prelevate de la musculițe martor sau de la musculițe cu *Parkin-OE* la zilele 10, 30 și 60. Analiza longevității nu a indicat diferențe semnificative pentru microbiomul tinerilor (ziua 10). Totuși, microbiomele prelevate de la musculițe de vârstă mijlocie (ziua 30) și vârstnice (ziua 60) din grupul martor au redus semnificativ durata de viață a gazdelor axenice. În contrast, musculițele expuse la microbiome provenite de la donatori *Parkin-OE* și-au menținut longevitatea la toate vârstele.

Aceste rezultate sugerează că supraexprimarea *Parkin* menține stabilitatea microbiomului, prevenind modificările asociate îmbătrânirii care ar putea influența negativ durata de viață.

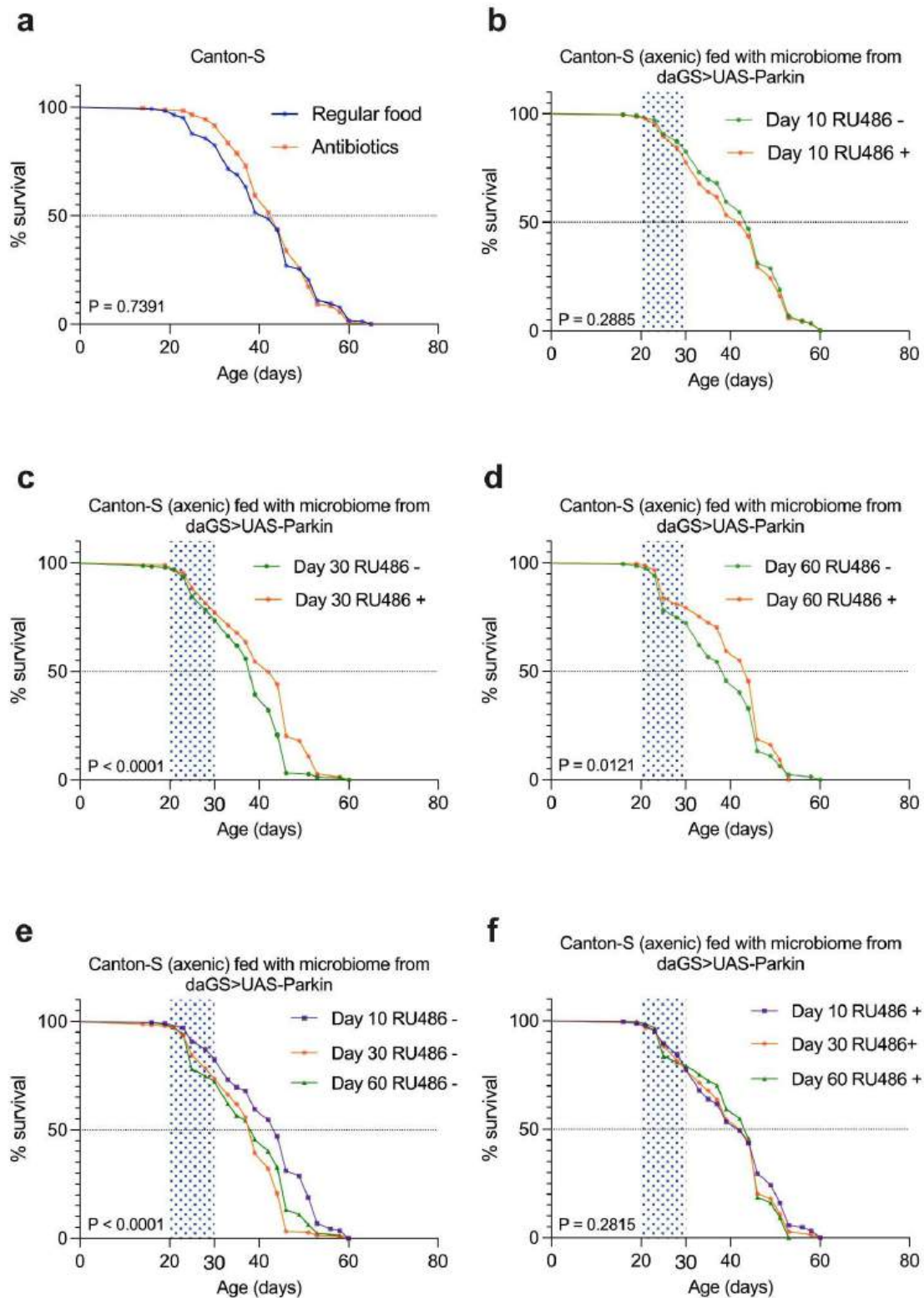


Figura IV.13. Test de longevitate al musculițelor *Canton-S* după reintroducerea microbiomului de la musculițe martor și cu *Parkin* indus la diferite vârste. Această figură prezintă testul de longevitate realizat pe musculițe *Canton-S* axenice, crescute pe antibiotice timp de 20 de zile înainte de reintroducerea microbiomului de la musculițe

martor (*neinduse*) și musculițe cu supraexprimare *Parkin* (*induse*) la zilele 10, 30 și 60, apoi menținute pe hrană standard. Panoul (a) confirmă că tratamentul cu antibiotice singur nu afectează durata de viață. Panourile (b-d) ilustrează curbele de supraviețuire comparând musculițele reintroduse la microbiomul martor față de cele cu microbiom indus, la stadiile tinere (10 zile), de vârstă mijlocie (30 zile) și vârstnice (60 zile). Panourile (e-f) prezintă comparații ale longevității musculițelor care au primit microbiom martor față de cel indus în toate grupele de vârstă.

Am examinat și modul în care transferul microbiomului a influențat răspunsul imun la musculițele *Canton-S*. După 10 zile de expunere la microbiom (zilele 20-30), musculițele au fost trecute pe o dietă standard pentru cinci zile, iar ARN-ul a fost extras în ziua 35. Expresia peptidelor antimicrobiene Drosomycin și Diptericin a fost măsurată pentru a evalua activarea imună.

Musculițele hrănite cu microbiom de la *daGS>UAS-Parkin* tinere (ziua 10) și de vârstă mijlocie (ziua 20) au prezentat niveluri similare de expresie AMP, indiferent dacă microbiomul provenea din grupul de control sau de la musculițe cu *Parkin* indus. În schimb, musculițele care au primit microbiom de la musculițe martor vârstnice (ziua 60) au prezentat niveluri semnificativ mai ridicate de Drosomycin și Diptericin comparativ cu cele care au primit microbiom de la musculițe vârstnice cu *Parkin* indus, sugerând că microbiomul îmbătrânit din grupul martor declanșează modificări pro-inflamatorii.

Un model similar a fost observat la musculițele *Canton-S* hrănite cu propriul lor microbiom corespunzător vârstei. Musculițele hrănite cu microbiom de vârstă mijlocie (ziua 20) au avut niveluri mai ridicate de expresie AMP decât cele hrănite cu microbiom de la indivizi tineri (ziua 10), indicând faptul că îmbătrânirea microbiomului poate declanșa activarea imună. Aceste descoperiri sugerează că schimbările microbiomului asociate îmbătrânirii pot induce inflamația, iar microbiomul musculițelor martor este mai predispus să declanșeze activarea imună comparativ cu cel provenit de la musculițele cu supraexprimare *Parkin*.

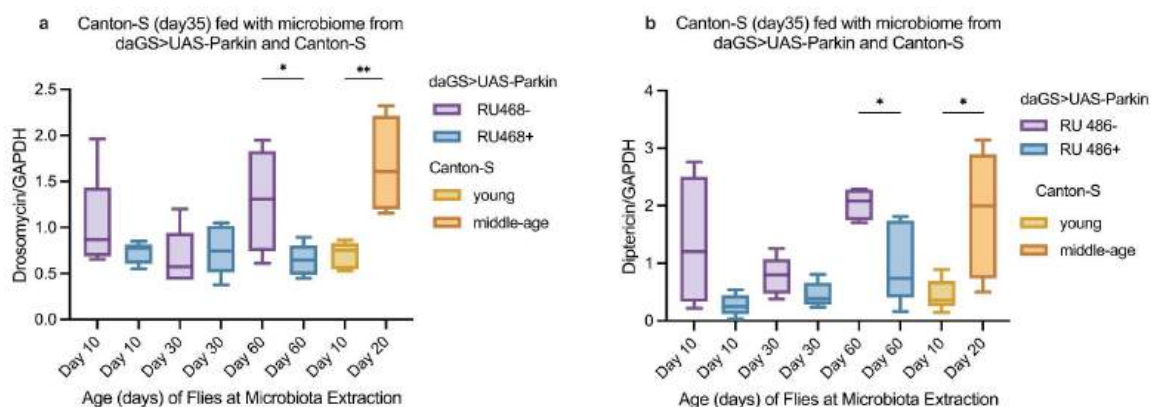


Figura IV.14. Test pentru Peptide Antimicrobiene. Evaluarea nivelurilor de Drosomycin (a) și Dipterocin (b) la musculițele *Canton-S* după manipularea microbiomului.

IV.5. Concluzii

În acest studiu, am investigat impactul supraexprimării *Parkin* asupra compoziției microbiomului intestinal la *Drosophila melanogaster* și implicațiile sale pentru sănătatea gazdei pe parcursul diferitelor etape de viață. Analizând comparativ musculițele cu supraexprimare *Parkin* și cele de control pe o perioadă de 60 de zile, am observat modul în care expresia *Parkin* modulează anumite genuri bacteriene odată cu înaintarea în vârstă.

Abundența microbiană a fost cuantificată prin qPCR pentru *16S rRNA total* și pentru taxoni bacterieni specifici, precum *Lactobacillus*, *Acetobacter* și *Enterobacter*, la multiple momente de timp. Rezultatele indică faptul că supraexprimarea *Parkin* influențează dinamic microbiomul intestinal, favorizând o diversitate microbiană mai mare la musculițele tinere și reducând abundența anumitor bacterii la musculițele vârstnice. Acest efect dependent de vârstă sugerează că *Parkin* ar putea avea un rol reglator în menținerea echilibrului microbiomului intestinal, promovând interacțiuni microbiene benefice în primele etape ale vieții și limitând selectiv anumite populații bacteriene odată cu îmbătrânirea.

Prin experimente de transplant microbial, am evaluat modul în care aceste schimbări ale compoziției microbiomului afectează durata de viață și răspunsul imun la musculițele *Canton-S* axenice. Reintroducerea microbiomului provenit atât de la musculițele de control, cât și de la musculițele cu *Parkin* supraexprimat în musculițele tratate cu antibiotice a arătat că microbiomele provenite de la musculițele control vârstnice au avut un efect pro-inflamator semnificativ, reducând durata de viață a gazdelor. În contrast, microbiomul provenit de la musculițele cu *Parkin* supraexprimat nu a declanșat aceleași efecte negative,

ceea ce sugerează un posibil rol protector al *Parkin* asupra compoziției microbiomului intestinal și longevității gazdei.

Studiul subliniază, de asemenea, diversitatea compozițiilor microbiene între probe, evidențiind *Lactobacillus brevis* ca un taxon-cheie în proba S08. Concordanța rezultatelor WGS și 16S rRNA pentru *L. brevis* confirmă relevanța sa ecologică în acest eșantion, consolidând robustețea abordării de secvențiere utilizate. Interesant este că prezența *L. brevis* în S08 este în concordanță cu descoperirile anterioare din modelele *C. elegans*, unde această bacterie a fost asociată cu rezistență crescută la stres și extinderea duratei de viață (Thiruppathi et al., 2023; Kumar et al., 2022). Mecanismele care stau la baza acestor efecte, inclusiv modularea stresului oxidativ și a căilor de semnalizare legate de longevitate, sugerează că compoziția microbiomului poate influența procesele asociate îmbătrânirii, probabil prin interacțiuni cu sistemele metabolice și imune ale gazdei. În plus, am observat modificări în diversitatea alfa și beta a microbiomului asociate cu supraexprimarea *Parkin*. Aceste schimbări, în special rolul *Commensalibacter*, care a fost predominant în microbiomul musculițelor tinere, sugerează că *Parkin* nu doar că influențează compoziția microbială, ci și capacitățile funcționale ale microbiomului intestinal pe măsură ce gazda îmbătrânește. Analiza funcțiilor metabolice ale microbiomului indus de *Parkin* a evidențiat căi specifice, precum biosinteza menaquinol-7 și degradarea nicotinatului, ceea ce indică un potențial impact asupra homeostaziei energetice și rezilienței celulare a gazdei.

Integrarea acestor rezultate, în special în ceea ce privește *L. brevis*, susține ipoteza conform căreia compoziția microbiomului joacă un rol esențial în procesele legate de îmbătrânire. Deși extrapolarea directă la *Drosophila melanogaster* necesită validare suplimentară, proprietățile geroprotectoare ale *L. brevis* observate la *C. elegans* oferă dovezi convingătoare că anumiți taxoni microbieni pot influența longevitatea gazdei prin mecanisme conservate de metabolism și răspuns la stres.

Mai mult, acest studiu este primul care explorează modul în care supraexprimarea *Parkin* influențează dinamica microbiomului intestinal și implicațiile sale mai largi pentru îmbătrânirea și longevitatea gazdei. Rezultatele oferă perspective valoroase asupra interacțiunii complexe dintre factorii genetici și microbiom, sugerând că *Parkin* poate juca un rol în reglarea sănătății intestinale și în atenuarea modificărilor microbiene asociate vârstei. Cercetările viitoare, desfășurate pe eșantioane mai mari, vor permite o înțelegere mai profundă a acestor interacțiuni și vor oferi o imagine mai clară asupra modului în care

modularea microbiomului prin *Parkin* ar putea fi valorificată pentru promovarea unei îmbătrâniri sănătoase.

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PREZENTĂRIILOR

Publicații:

1. Bunu G*, Toren D*, Ion CF, Barardo D, **Sârghie L**, Grigore LG, de Magalhães JP, Fraifeld V, Tacutu R. “SynergyAge, a curated database for synergistic and antagonistic interactions of longevity-associated genes”, *Scientific Data*, 7:366 (2020), <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00710-z>, **IF = 5.8 , Q1, AIS = 1.937**
2. **Larisa Sârghie¹**, Carmen Tanasa , Ioana Popa , Robi Tacutu. “Functional Analysis of GαO and InR in Regulating Longevity in *Drosophila melanogaster*”, was accepted for publication in Vol. 28, No. 5/2024 of *Romanian Biotechnological Letters Journal*, **Web of Science BDI**

Poster presentations

1. Sârghie, L. Aparicio, R., Walker, D.W. “Exploring the interplay between mitochondrial homeostasis, microbiota dynamics and aging”, **Aging Research and Drug Discovery**, Denmark, August 2023 - poster

BIBLIOGRAFIE

1. Anis, E, Xie, A, Brundin, L, & Brundin, P 2022, “Digesting recent findings: gut alpha-synuclein, microbiome changes in Parkinson’s disease.,” *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 33, no. 2, pp. 147–157.
2. Bai, H, Kang, P, Hernandez, AM, & Tatar, M 2013, “Activin signaling targeted by insulin/dFOXO regulates aging and muscle proteostasis in *Drosophila*.,” *PLoS Genetics*, vol. 9, no. 11, p. e1003941.
3. Barzilai, N, Huffman, DM, Muzumdar, RH, & Bartke, A 2012, “The critical role of metabolic pathways in aging.,” *Diabetes*, vol. 61, no. 6, pp. 1315–1322.
4. Binstock, RH 2004, “Anti-aging medicine and research: a realm of conflict and profound societal implications.,” *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 59, no. 6, pp. B523-33.
5. Biteau, B, Karpac, J, Supoyo, S, Degennaro, M, Lehmann, R, & Jasper, H 2010, “Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*.,” *PLoS Genetics*, vol. 6, no. 10, p. e1001159.
6. Bloem, BR, Okun, MS, & Klein, C 2021, “Parkinson’s disease.,” *The Lancet*, vol. 397, no. 10291, pp. 2284–2303.
7. Brian M. Schilder, Nathan G. Skene (2022). orthogene: Interspecies gene mapping. R package version 1.4.0, <https://doi.org/doi:10.18129/B9.bioc.orthogene>
8. Bunu, G, Toren, D, Ion, C-F, Barardo, D, Sârghie, L, Grigore, LG, de Magalhães, JP, Fraifeld, VE, & Tacutu, R 2020, “SynergyAge, a curated database for synergistic and antagonistic interactions of longevity-associated genes.,” *Scientific data*, vol. 7, no. 1, p. 366.
9. Carlson, ME, Silva, HS, & Conboy, IM 2008, “Aging of signal transduction pathways, and pathology.,” *Experimental Cell Research*, vol. 314, no. 9, pp. 1951–1961.
10. Cefalu, CA 2011, “Theories and mechanisms of aging.,” *Clinics in geriatric medicine*, vol. 27, no. 4, pp. 491–506.
11. Clark, IE, Dodson, MW, Jiang, C, Cao, JH, Huh, JR, Seol, JH, Yoo, SJ, Hay, BA, & Guo, M 2006, “*Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin.,” *Nature*, vol. 441, no. 7097, pp. 1162–1166.
12. Devambez, I, Ali Agha, M, Mitri, C, Bockaert, J, Parmentier, M-L, Marion-Poll, F, Grau, Y, & Soustelle, L 2013, “Gao is required for L-canavanine detection in

- Drosophila*,” *Plos One*, vol. 8, no. 5, p. e63484.
13. Elfil, M, Kamel, S, Kandil, M, Koo, BB, & Schaefer, SM 2020, “Implications of the gut microbiome in parkinson’s disease,” *Movement Disorders*, vol. 35, no. 6, pp. 921–933.
 14. Farrer, M, Chan, P, Chen, R, Tan, L, Lincoln, S, Hernandez, D, Forno, L, Gwinn-Hardy, K, Petrucelli, L, Hussey, J, Singleton, A, Tanner, C, Hardy, J, & Langston, JW 2001, “Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations,” *Annals of Neurology*, vol. 50, no. 3, pp. 293–300.
 15. Finch, CE & Ruvkun, G 2001, “The genetics of aging,” *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, vol. 2, pp. 435–462.
 16. Forero-Rodríguez, LJ, Josephs-Spaulding, J, Flor, S, Pinzón, A, & Kaleta, C 2021, “Parkinson’s Disease and the Metal-Microbiome-Gut-Brain Axis: A Systems Toxicology Approach,” *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, vol. 11, no. 1.
 17. Gallop, A, Weagley, J, Paracha, S-U-R, & Grossberg, G 2021, “The role of the gut microbiome in parkinson’s disease,” *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, vol. 34, no. 4, pp. 253–262.
 18. Hanson, MA & Lemaitre, B 2020, “New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond,” *Current Opinion in Immunology*, vol. 62, pp. 22–30.
 19. Hattori, N, Kitada, T, Matsumine, H, Asakawa, S, Yamamura, Y, Yoshino, H, Kobayashi, T, Yokochi, M, Wang, M, Yoritaka, A, Kondo, T, Kuzuhara, S, Nakamura, S, Shimizu, N, & Mizuno, Y 1998, “Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals,” *Annals of Neurology*, vol. 44, no. 6, pp. 935–941.
 20. Hattori, N & Mizuno, Y 2017, “Twenty years since the discovery of the parkin gene,” *Journal of Neural Transmission*, vol. 124, no. 9, pp. 1037–1054.
 21. He, Y & Jasper, H 2014, “Studying aging in *Drosophila*,” *Methods*, vol. 68, no. 1, pp. 129–133.
 22. Heinzl, S, Aho, VTE, Suenkel, U, von Thaler, A-K, Schulte, C, Deuschle, C, Paulin, L, Hantunen, S, Brockmann, K, Eschweiler, GW, Maetzler, W, Berg, D, Auvinen, P, & Scheperjans, F 2021, “Gut microbiome signatures of risk and prodromal markers of parkinson disease,” *Annals of Neurology*, vol. 90, no. 3, pp. E1–E12.

23. Hill-Burns, EM, Debelius, JW, Morton, JT, Wissemann, WT, Lewis, MR, Wallen, ZD, Peddada, SD, Factor, SA, Molho, E, Zabetian, CP, Knight, R, & Payami, H 2017, "Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome.," *Movement Disorders*, vol. 32, no. 5, pp. 739–749.
24. Hristova, VA, Beasley, SA, Rylett, RJ, & Shaw, GS 2009, "Identification of a novel Zn²⁺-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin.," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 22, pp. 14978–14986.
25. Irion, U & Nüsslein-Volhard, C 2022, "Developmental genetics with model organisms.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 119, no. 30, p. e2122148119.
26. Jafari, M 2010, "Drosophila melanogaster as a model system for the evaluation of anti-aging compounds.," *Fly*, vol. 4, no. 3, pp. 253–257.
27. Kaletsky, R & Murphy, CT 2010, "The role of insulin/IGF-like signaling in C. elegans longevity and aging.," *Disease Models & Mechanisms*, vol. 3, no. 7–8, pp. 415–419.
28. Kang, Y, Kang, X, Zhang, H, Liu, Q, Yang, H, & Fan, W 2021, "Gut microbiota and parkinson's disease: implications for faecal microbiota transplantation therapy.," *ASN Neuro*, vol. 13, p. 17590914211016216.
29. Khedr, EM, Ali, AM, Deaf, E, Hassan, HM, Alaa, A, & Gamea, A 2021, "Gut microbiota in Parkinson's disease patients: hospital-based study," *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, vol. 57, no. 1, p. 153.
30. Kishi, S, Slack, BE, Uchiyama, J, & Zhdanova, IV 2009, "Zebrafish as a genetic model in biological and behavioral gerontology: where development meets aging in vertebrates--a mini-review.," *Gerontology*, vol. 55, no. 4, pp. 430–441.
31. Kitani-Morii, F, Friedland, RP, Yoshida, H, & Mizuno, T 2021, "Drosophila as a model for microbiota studies of neurodegeneration.," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 84, no. 2, pp. 479–490.
32. Kong, Y, Wang, L, & Jiang, B 2021, "The Role of Gut Microbiota in Aging and Aging Related Neurodegenerative Disorders: Insights from Drosophila Model.," *Life (Basel, Switzerland)*, vol. 11, no. 8.
33. Koyle, M. L. *et al.* Rearing the Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Under Axenic and Gnotobiotic Conditions. *J. Vis. Exp.* (2016) doi:10.3791/54219.

34. Kriete, A, Lechner, M, Clearfield, D, & Bohmann, D 2011, “Computational systems biology of aging.,” *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, vol. 3, no. 4, pp. 414–428.
35. Krishnan, H, Ahmed, S, Hubbard, SR, & Miller, WT 2024, “Biochemical characterization of the Drosophila insulin receptor kinase and longevity-associated mutants.,” *The FASEB Journal*, vol. 38, no. 1, p. E23355.
36. Kumar, S., Praneet, N. S. & Suchiang, K. Lactobacillus brevis MTCC 1750 enhances oxidative stress resistance and lifespan extension with improved physiological and functional capacity in Caenorhabditis elegans via the DAF-16 pathway. *Free Radic. Res.* **56**, 555–571 (2022).
37. Lans, H & Jansen, G 2007, “Multiple sensory G proteins in the olfactory, gustatory and nociceptive neurons modulate longevity in Caenorhabditis elegans.,” *Developmental Biology*, vol. 303, no. 2, pp. 474–482.
38. Leclerc, V & Reichhart, J-M 2004, “The immune response of Drosophila melanogaster.,” *Immunological Reviews*, vol. 198, pp. 59–71.
39. Lee, S-H & Min, K-J 2019, “Drosophila melanogaster as a model system in the study of pharmacological interventions in aging,” *Translational Medicine of Aging*, vol. 3, pp. 98–103.
40. Lei, Q, Wu, T, Wu, J, Hu, X, Guan, Y, Wang, Y, Yan, J, & Shi, G 2021, “Roles of α -synuclein in gastrointestinal microbiome dysbiosis-related Parkinson’s disease progression (Review).,” *Molecular medicine reports*, vol. 24, no. 4.
41. Li, C, Cui, L, Yang, Y, Miao, J, Zhao, X, Zhang, J, Cui, G, & Zhang, Y 2019, “Gut microbiota differs between parkinson’s disease patients and healthy controls in northeast china.,” *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 12, p. 171.
42. Lipsky, MS & King, M 2015, “Biological theories of aging.,” *Disease-a-month : DM*, vol. 61, no. 11, pp. 460–466.
43. López-Otín, C, Blasco, MA, Partridge, L, Serrano, M, & Kroemer, G 2023, “Hallmarks of aging: An expanding universe.,” *Cell*, vol. 186, no. 2, pp. 243–278.
44. Mc Auley, MT, Guimera, AM, Hodgson, D, McDonald, N, Mooney, KM, Morgan, AE, & Proctor, CJ 2017, “Modelling the molecular mechanisms of aging.,” *Bioscience reports*, vol. 37, no. 1.
45. McCormick, MA & Promislow, DEL 2018, “Recent advances in the systems biology of aging.,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 29, no. 10, pp. 973–984.
46. Mooney, KM, Morgan, AE, & Mc Auley, MT 2016, “Aging and computational

- systems biology.,” *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, vol. 8, no. 2, pp. 123–139.
47. Narendra, D, Tanaka, A, Suen, D-F, & Youle, RJ 2008, “Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy.,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 183, no. 5, pp. 795–803.
 48. Parker-Character, J, Hager, DR, Call, TB, Pickup, ZS, Turnbull, SA, Marshman, EM, Korch, SB, Chaston, JM, & Call, GB 2021, “An altered microbiome in a Parkinson’s disease model *Drosophila melanogaster* has a negative effect on development.,” *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, p. 23635.
 49. Partridge, L, Alic, N, Bjedov, I, & Piper, MDW 2011, “Ageing in *Drosophila*: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network.,” *Experimental Gerontology*, vol. 46, no. 5, pp. 376–381.
 50. Pourbagher-Shahri, AM, Farkhondeh, T, Talebi, M, Kopustinskiene, DM, Samarghandian, S, & Bernatoniene, J 2021, “An overview of NO signaling pathways in aging.,” *Molecules*, vol. 26, no. 15.
 51. Prüßing, K, Voigt, A, & Schulz, JB 2013, “*Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer’s disease.,” *Molecular Neurodegeneration*, vol. 8, p. 35.
 52. Rana, A, Rera, M, & Walker, DW 2013, “Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 21, pp. 8638–8643.
 53. Salminen, TS & Vale, PF 2020, “*Drosophila* as a model system to investigate the effects of mitochondrial variation on innate immunity.,” *Frontiers in Immunology*, vol. 11, p. 521.
 54. Santos, SF, de Oliveira, HL, Yamada, ES, Neves, BC, & Pereira, A 2019, “The Gut and Parkinson’s Disease-A Bidirectional Pathway.,” *Frontiers in neurology*, vol. 10, p. 574.
 55. Shannon, P. et al., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), pp.2498–2504.
 56. Shaposhnikov, MV, Guvatova, ZG, Zemskaya, NV, Koval, LA, Schegoleva, EV, Gorbunova, AA, Golubev, DA, Pakshina, NR, Ulyasheva, NS, Solovev, IA, Bobrovskikh, MA, Gruntenko, NE, Menshanov, PN, Krasnov, GS, Kudryavseva, AV, & Moskalev, AA 2022, “Molecular mechanisms of exceptional lifespan increase of *Drosophila melanogaster* with different genotypes after combinations of

- pro-longevity interventions.,” *Communications Biology*, vol. 5, no. 1, p. 566.
57. Shimura, H, Hattori, N, Kubo, S i, Mizuno, Y, Asakawa, S, Minoshima, S, Shimizu, N, Iwai, K, Chiba, T, Tanaka, K, & Suzuki, T 2000, “Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase.,” *Nature Genetics*, vol. 25, no. 3, pp. 302–305.
 58. Tacutu, R, Thornton, D, Johnson, E, Budovsky, A, Barardo, D, Craig, T, Diana, E, Lehmann, G, Toren, D, Wang, J, Fraifeld, VE, & de Magalhães, JP 2018, “Human Ageing Genomic Resources: new and updated databases.,” *Nucleic Acids Research*, vol. 46, no. D1, pp. D1083–D1090.
 59. Tafesh-Edwards, G & Eleftherianos, I 2023, “The role of Drosophila microbiota in gut homeostasis and immunity.,” *Gut microbes*, vol. 15, no. 1, p. 2208503.
 60. Thiruppathi, G. *et al.* Geroprotective Effect of Levilactobacillus brevis and Weizmannia coagulans in Caenorhabditis elegans. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **16**, 589–605 (2024).
 61. Troyansky, DG 2015, *Aging in world history*. Routledge.
 62. Wallen, ZD, Stone, WJ, Factor, SA, Molho, E, Zabetian, CP, Standaert, DG, & Payami, H 2021, “Exploring human-genome gut-microbiome interaction in Parkinson’s disease.,” *npj Parkinson’s Disease*, vol. 7, no. 1, p. 74.
 63. Wangler, MF, Yamamoto, S, Chao, H-T, Posey, JE, Westerfield, M, Postlethwait, J, Members of the Undiagnosed Diseases Network (UDN), Hieter, P, Boycott, KM, Campeau, PM, & Bellen, HJ 2017, “Model organisms facilitate rare disease diagnosis and therapeutic research.,” *Genetics*, vol. 207, no. 1, pp. 9–27.
 64. Westfall, S, Lomis, N, & Prakash, S 2018, “Longevity extension in Drosophila through gut-brain communication.,” *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, p. 8362.
 65. Yashin, AI & Jazwinski, SM (eds) 2014, *Aging and Health - A Systems Biology Perspective*. S. Karger AG.
 66. Yu, M, Zhang, H, Wang, B, Zhang, Y, Zheng, X, Shao, B, Zhuge, Q, & Jin, K 2021, “Key signaling pathways in aging and potential interventions for healthy aging.,” *Cells*, vol. 10, no. 3.
 67. Zapała, B, Stefura, T, Wójcik-Pędziwiatr, M, Kabut, R, Bałajewicz-Nowak, M, Milewicz, T, Dudek, A, Stój, A, & Rudzińska-Bar, M 2021, “Differences in the Composition of Gut Microbiota between Patients with Parkinson’s Disease and Healthy Controls: A Cohort Study.,” *Journal of clinical medicine*, vol. 10, no. 23.