

Метилсульфонилметан (МСМ) вызывает повышение экспрессионного (генетического) шума, но не влияет на плодовитость и продолжительности жизни *D. melanogaster*

Орбант М.О.¹, Бабочкина Т.И.¹, Фёдорова С.А.^{1, 2*}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

* fsveta@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: генетический шум; экспрессионный шум; МСМ; ДМСО₂; фенотип

Мотивация и цель: Развитие любого организма обусловлено скоординированной пространственно-временной экспрессией генов, в результате которой формируется генетически предопределенный фенотип [1, 2]. Однако все этапы реализации генетической информации (транскрипция, трансляция, посттрансляционные модификации, транспорт молекул) подвержены стохастическим флуктуациям. Такие случайные колебания, возникающие при реализации генетической программы, называются генетическим (экспрессионным) шумом и могут быть важным источником вариаций на морфологическом уровне, что проявляется в вариациях фенотипов (так называемый шум развития).

Экспрессионный шум играет важную роль во многих биологических процессах: например, он повышает чувствительность эмбриональных стволовых клеток мышцы к сигналам дифференцировки/дедифференцировки [3], с ним связывают устойчивость клеток к химиотерапии [4]. Таким образом, изучение влияния экспрессионного шума на реализацию наследственных признаков и способов манипулирования его вариабельностью является актуальной задачей.

Целью данной работы было оценка влияния экспрессионного шума на шум развития на модели *Drosophila melanogaster*. Для этого мы исследовали влияние разных концентраций МСМ на экспрессию некоторых генов оогенеза, плодовитость и продолжительность жизни *D. melanogaster*.

Методы и алгоритмы: В работе использовали БАД метилсульфонилметан (МСМ, ДМСО₂) – нетоксичное вещество, которое часто применяется для снятия воспалительных процессов в суставах и связках. МСМ является метаболитом ДМСО, влияющим на экспрессию генов и на температуру плавления ДНК [5, 6]. В работе использовали МСМ в концентрациях в корме 0, 0.01, 0.1 и 1 мг/мл.

Экспрессию генов оценивали при помощи количественного ПЦР в реальном времени (экспрессия на уровне РНК). Количество белка оценивали по интенсивности свечения химерного белка pABP2-GFP в ядрах питающих клеток и ооцитов *D. melanogaster*, для этого использовали линию мух с белковой ловушкой – искусственным экзоном, кодирующим EGFP, встроенным в ген *pAbp2*. Получившийся химерный белок экспрессируется под нативным промотором и позволяет визуализировать белковый продукт гена в реальном времени.

В качестве фенотипических признаков оценивали плодовитость самок, выживаемость мух от эмбриона до стадии имаго и продолжительности жизни взрослых мух.

Для всех экспериментов проведено не менее двух биологических повторов.

Результаты: Для оценки экспрессии генов на уровне мРНК выделяли РНК из 50 яичников мух, содержащихся на корме без МСМ, на корме с концентрациями МСМ 0.01, 0.1 и 1 мг/мл. При помощи qPCR исследовали экспрессию двух разных групп генов: повсеместно экспрессирующиеся гены (*myc*, *sep1*, *hyd*, *stat-92*) и тканеспецифичные гены (*pKa*, *Cup*, *hop*, *pABP2*), нормированных на экспрессию гена *rpl32*. И повсеместно экспрессирующиеся, и яичник-специфичные гены демонстрировали разнонаправленное изменение уровня экспрессии в разных биологических повторах (проведено два биологических повтора), не зависящее от дозы МСМ.

Для оценки экспрессии генов на уровне белка оценивали уровень светимости химерного белка при помощи линии мух с белковой ловушкой. Измеряли разницу в интенсивности свечения ядер соседних питающих клеток или ооцитов на одномоментно сфотографированном препарате, что позволило нам снизить технические проблемы нормировки. Для анализа выбирали только ядра клеток зародышевой линии из овариол 6–7-й стадии, потому что к этой стадии они заканчивают эндоцикл и имеют одинаковую плоидность. Дозозависимой разницы в интенсивности свечения химерного белка в ядрах клеток зародышевой линии не выявлено.

Для оценки плодовитости самок содержали в индивидуальных пробирках на корме с разными концентрациями МСМ и ежедневно подсчитывали количество яиц, отложенных каждой самкой. Достоверных различий в плодовитости самок, содержащихся на разных концентрациях МСМ в корме, не обнаружено.

Выживаемость до стадии имаго анализировали, подсчитывая количество эмбрионов в пробирке, затем – количество куколок и вылупившихся имаго в этой же пробирке. Выживаемость подсчитывали как % эмбрионов, развившихся до стадии взрослых мух. Продолжительность жизни измеряли, содержа по 10 самцов или самок в пробирках с различными концентрациями МСМ в корме.

Мух перекидывали на свежий корм 1 раз в 4 дня, а 1 раз в 2 дня фиксировали количество погибших мух, выстраивая кривые дожития. Проведено два биологических повтора, по 100–120 мух для каждой концентрации МСМ в каждом повторе. В диапазоне концентраций МСМ в корме 0.01–1 мг/мл дозозависимого влияния на выживаемость и продолжительность жизни не выявлено.

Выводы: Мы показали, что МСМ, как и его предшественник ДМСО, снижает температуру плавления ДНК. В связи с этим мы ожидали, что добавление МСМ в корм приведет к повышению экспрессионного шума и, возможно, к увеличению шума развития. Однако наше исследование не выявило дозозависимого влияния МСМ на экспрессию генов как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Более того, хотя мы и фиксировали разнонаправленные колебания экспрессии генов, достоверных различий на уровне фенотипа (плодовитость самок, выживаемость эмбрионов до стадии имаго, продолжительность жизни взрослых мух) не выявлено.

Финансирование: Исследование поддержано бюджетным проектом FWNR-2022-0015.

Methylsulfonylmethane (MSM) increases the expression (genetic) noise, but has no effect on the fertility and life span of *D. melanogaster*

Orbant M.O.¹, Babochkina T.I.¹, Fedorova S.A.^{1, 2*}

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

² Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* fsveta@bionet.nsc.ru

Key words: genetic noise; expression noise; MSM; DMSO₂; phenotype

Motivation and Aim: The development of any organism is driven by the coordinated spatiotemporal expression of genes. The result is a genetically predetermined phenotype is formed [1, 2]. However, stochastic fluctuations occur at all stages of the realisation of genetic information (transcription, translation, post-translational modifications, transport of molecules). These random fluctuations are referred to as genetic (expression) noise, and can be an important source of variation at the morphological level, which manifests itself in variations in phenotypes (the so-called developmental noise).

Expression noise plays an important role in many biological processes: for example, it increases the sensitivity of mouse embryonic stem cells to differentiation/dedifferentiation signals [3] and is associated with cell resistance to chemotherapy [4]. Therefore the study of the influence of expression noise on the realisation of heritable traits and the development of the ways to manipulate its variability is an urgent current task.

The aim of this work was to assess the influence of expression noise on developmental noise in the *Drosophila melanogaster* model. To do this, we studied the effect of different concentrations of MSM on the gene expression (oogenesis genes), the fertility and the lifespan of *D. melanogaster*.

Methods and Algorithms: We used the dietary supplement methylsulfonylmethane (MSM, DMSO₂), which is a non-toxic substance and is commonly used in the treatment of rheumatoid diseases to alleviate inflammatory processes in joints and ligaments. MSM (DMSO₂) is a metabolite of DMSO that affects gene expression and DNA melting temperature [5, 6]. In our study, we used dietary MSM at concentrations of 0 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, and 1 mg/ml.

Gene expression was assessed by quantitative real-time PCR (RNA level expression). The amount of protein was assessed by the fluorescence intensity of the chimeric protein pABP2-GFP in the nuclei of *D. melanogaster* nurse cells and oocytes; using a fly strain with a protein trap – an artificial exon encoding EGFP, inserted into the second intron of the *pAbp2* gene. The resulting chimeric protein is expressed under the native promoter, allowing real-time visualization of the gene product.

As phenotypic traits, we assessed female fertility, fly survival from the embryo to the imago stage, and the lifespan of adult flies.

At least 2 biological replicates were performed for each experiment.

Results: In order to assess gene expression at the mRNA level, RNA was isolated from 50 ovaries of flies from the following groups: maintained on the diet without MSM, on the diet with MSM at concentrations of 0.01, 0.1 and 1 mg/ml. Using qPCR, we studied

the expression of two different groups of genes: ubiquitously expressed genes (*myc*, *sep1*, *hyd*, *stat-92*) and tissue-specific genes (*pKa*, *Cup*, *hop*, *pABP2*), normalized to the expression of the *rpl32* gene. Both ubiquitously expressed and ovary-specific genes showed multidirectional changes in expression levels in different biological replicates (2 biological replicates were performed), independent of MSM dose.

To assess gene expression at the protein level, the fluorescence intensity level of the chimeric protein was assessed using a protein trap fly line. We measured the difference in the fluorescence intensity of the nuclei from neighboring nurse cell or oocyte nuclei on a simultaneously photographed preparation, which allowed us to reduce the technical problems of normalization. Only germ cell nuclei from stage 6–7 ovarioles were selected for analysis, as they have completed the endocycle at this stage and have the same ploidy. No dose-dependent difference in the fluorescence intensity of the chimeric protein in the nuclei of germline cells was observed.

To assess fecundity, females were kept in individual tubes with different concentrations of MSM in the diet and the number of eggs laid by each female was counted daily. No significant differences were found in the fertility of females kept on different concentrations of MSM in the diet.

Survival to the adult stage was analysed by counting the number of embryos in a test tube, then the number of pupae and hatched adults in the same test tube. Survival was calculated as the percentage of embryos that developed into adult flies. Longevity was measured by keeping 10 males or females in test tubes containing different concentrations of MSM in the diet.

Flies were transferred to fresh food every 4 days and the number of dead flies was recorded every 2 days to construct survival curves. Two biological replicates were performed, with 100–120 flies for each MSM concentration in each replicate. There was no dose-dependent effect on survival and longevity over the range of MSM concentrations in the diet from 0.01–1 mg/ml.

Conclusion: We have shown that MSM, like its precursor DMSO, reduces DNA melting temperature. In this context, we expected that the addition of MSM to the diet would lead to an increase in expression noise and possibly an increase in developmental noise. However, our study did not show a dose-dependent effect of MSM on gene expression at both mRNA and protein levels. Furthermore, although we observed multidirectional fluctuations in gene expression, no significant differences were found at the phenotypic level (fecundity of females, survival of embryos to the adult stage, lifespan of adult flies). **Funding:** The study was supported by the budget project FWNR-2022-0015.

Список литературы/References

1. Waddington C. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*. 1942;150:563-565. doi 10.1038/150563a0
2. Dong P., Liu Z. Shaping development by stochasticity and dynamics in gene regulation. *Open Biol*. 2017;7:170030. doi 10.1098/rsob.170030
3. Desai R.V. et al. A DNA repair pathway can regulate transcriptional noise to promote cell fate transitions. *Science*. 2021;373(6557):eabc6506. doi 10.1126/science.abc6506
4. Jordan F.H. et al. Memory of stochastic single-cell apoptotic signalling promotes chemoresistance in neuroblastoma. *Sci Adv*. 2023;9(9):eabp8314. doi 10.1126/sciadv.abp8314
5. Stephens K.E. et al. Epigenetic regulation and measurement of epigenetic changes. *Biol Res Nurs*. 2013;15(4):373-381. doi 10.1177/1099800412444785
6. Butawan M. et al. Methylsulfonylmethane: Applications and Safety of a Novel Dietary Supplement. *Nutrients*. 2017;9(3):290. doi 10.3390/nu9030290