

Уровень экспрессии GSK3 в отдельных группах дофаминергических нейронов влияет на продолжительность жизни и поведение *Drosophila melanogaster*

Веселкина Е.^{1*}, Рощина Н.^{1, 2}, Тростников М.³, Пасюкова Е.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

³ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

* veselkinaer123@gmail.com

Ключевые слова: продолжительность жизни; плодовитость; пищевое поведение; дофаминергические нейроны; *Drosophila melanogaster*

Мотивация и цель: Дофаминергические (ДА) нейроны являются важной частью нервной системы. И у *Drosophila melanogaster*, и у млекопитающих ДА нейроны выполняют сходные функции: участвуют в контроле: пищевого поведения, подвижности, циркадных ритмов, памяти, формировании мотивации. В течение жизни дофаминергическая система изменяется. Даже у здоровых людей к пожилому возрасту наблюдается снижение количества дофамина и ДА нейронов. С потерей ДА нейронов связаны многие нейродегенеративные заболевания [1,2]. Дофаминергическая система *D. melanogaster* устроена относительно просто и включает в себя всего 125 ДА нейронов на полушарие головного мозга; клеточные тела ДА нейронов сгруппированы в кластеры и легко визуализируются [3,4]. Относительная простота устройства дофаминергической системы *D. melanogaster*, при функциональной схожести с дофаминергической системой млекопитающих, делает ее прекрасным модельным объектом для изучения вклада отдельных генов в контроль различных свойств и функций ДА нейронов. Мы исследовали роль ДА нейронов в контроле продолжительности жизни (ПЖ).

Важное значение в поддержании стабильности дофаминергической системы играет ген *shaggy* (*sgg*), кодирующий высоконсервативную протеинкиназу киназу гликогенсинтазы 3 (Glycogen Syntase Kinase 3, GSK3). GSK3 фосфорилирует транскрипционные факторы CREB и NURR1 [5,6], которые, в свою очередь, регулируют работу гена *pale*, кодирующего тирозингидроксилазу, ключевой фермент биосинтеза дофамина.

Ранее мы показали, что эктопическая экспрессия дополнительной копии гена *shaggy*, кодирующей основной транскрипт *sggRB*, во всех ДА нейронах приводила к летальному эффекту. Парадоксальным образом, экспрессия той же дополнительной копии гена *shaggy* во всей нервной системе, включая ДА нейроны, не вызывала летальности, что может говорить о существовании непонятных пока компенсаторных эффектов, вызванных увеличением экспрессии *shaggy* в других типах нейронов. Эти данные кажутся еще более интересными ввиду того, что эктопическая экспрессии дополнительной копии основного транскрипта с однонуклеотидной заменой в каталитическом центре, *sggRB-A81T*, приводящая к снижению активности фермента в клетке вследствие доминантно

негативного эффекта [7,8], вызывала статистически значимое увеличение ПЖ самок.

В последнее время все больше данных свидетельствует о том, что отдельные нервные клетки могут определять те или иные специфические типы поведения. Это свидетельствует о существенной дифференцировке и специализации нервных клеток, в том числе, нейронов одной эргичности. Перед нами встала задача понять, может ли изменение в работе одного гена, гена *shaggy*, в отдельных группах ДА нейронов привести к изменениям ПЖ, повлиять на функциональное состояние нервной системы и поведение.

Материалы и методы: Для оценки влияния экспрессии sggRB-A81T в отдельных кластерах ДА нейронов на функциональное состояние нервной системы и ПЖ мы использовали модификацию классической бинарной экспрессионной системы GAL4-UAS [9], Split_GAL4, которая позволяет индуцировать экспрессию конструкции только в отдельных группах дофаминергических неронов [10]. ПЖ и количество съеденной пищи оценивали, как описано в [11]. Визуализацию нейронов проводили с помощью конфокального микроскопа, GAL4-UAS-GFP и антител к pc82. Интерес к пище оценивали, как описано в [12]. Количество съеденной пищи учитывали, как описано [13]. Статистическую обработку всех данных проводили стандартными методами [11].

Результаты и обсуждение: Мы оценили влияние измененной экспрессии *shaggy*, которая обеспечивала доминантно негативный эффект в отдельных кластерах ДА нейронов на ПЖ девственных самок и самцов *D. melanogaster*. У самцов влияние на ПЖ оказывает экспрессия в кластере *pal*, достоверно снижая ее. У самок изменение экспрессии *shaggy* в кластере *rrm2* приводит к увеличению ПЖ девственных самок, но этот эффект проявляется только в отсутствие экспрессии *shaggy* в других кластерах, что может говорить о разнонаправленном вкладе разных групп ДА нейронов в контроль ПЖ. ДА нейроны гетерогенны. Это связано, с одной стороны, с тем, куда проецируется определенный нейрон, а с другой стороны, с тем, что нейроны значительно отличаются по уровню синтеза дофамина и, следовательно, по функциональному статусу. Поскольку синтез дофамина зависит от активности GSK3, можно предположить, что активность этой протеинкиназы различна в разных ДА нейронах. Тогда экспрессия одной и той же дополнительной копии в разных ДА нейронах может оказывать разное воздействие на их функцию и, далее, на ПЖ. В то же время, возможно, что характер влияния на ПЖ зависит от того, куда проецируются нейроны.

Известно, что дофамин может выполнять две функции, он является нейромедиатором и гормоном. ДА нейроны сильно связаны с репродуктивной функцией [14]. Мы выяснили, что у скрещенных самок изменение экспрессии *shaggy* в отдельных кластерах ДА нейронов приводит к увеличению ПЖ. Чтобы ответить на вопрос, не связано ли это с эффектом *trade off*, когда увеличение продолжительности жизни приводит к снижению плодовитости, мы оценили плодовитость самок на 5, 30 и 50 день их жизни. Оказалось, что измененная экспрессия *shaggy* в различных кластерах ДА нейронов не влияет на репродуктивную функцию, а в некоторых случаях даже улучшает ее. Таким образом, локальные изменения экспрессии *shaggy* в кластерах ДА нейронов приводят к увеличению ПЖ самок, не снижая их плодовитости.

ДА нейроны определяют характер пищевого поведения и особенности обоняния мух. Мы предположили, что увеличение ПЖ связано с ограничением в

потреблении калорий из-за потери интереса к пище у мух с измененной экспрессией *shaggy* в отдельных кластерах ДА нейронов. Однако мы не обнаружили снижения интереса к пище у мух с повышенной ПЖ, а дополнительная экспрессия *sggRB-A81T* в нейронах кластера *pal* приводила даже к увеличению потребления пищи.

Выводы: Мы доказали, что изменения в работе одного гена в отдельных кластерах ДА нейронов могут влиять на ПЖ. Мы также еще раз продемонстрировали половой диморфизм в контроле ПЖ: ПЖ самцов и самок зависит от разных ДА нейронов с измененной экспрессией *shaggy*. Изменение ПЖ не объясняется ни компенсаторным ослаблением репродуктивной функции, ни снижением потребления пищи и, вследствие этого, уменьшения калорийности питания. Поиск молекулярных и клеточных механизмов влияния GSK3 на ПЖ будет продолжен.

Финансирование: Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

The expression level of GSK3 in specific groups of dopaminergic neurons influences the lifespan and behavior of *Drosophila melanogaster*

Veselkina E.^{1*}, Roshina N.^{1, 2}, Trostnikov M.³, Pasyukova E.¹

¹ National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

² N. I. Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

³ Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russia

* veselkinaer123@gmail.com

Key words: lifespan; fertility; feeding behaviour; dopaminergic neurons; *Drosophila melanogaster*

Motivation and Aim: Dopaminergic (DA) neurons are an important part of the nervous system. In both *Drosophila melanogaster* and mammals, DA neurons perform similar functions: they are involved in regulating feeding behavior, mobility, circadian rhythms, memory, and motivation. The dopaminergic system changes throughout life. Even in healthy individuals, a decrease in the amount of dopamine and DA neurons is observed in old age. Loss of DA neurons is associated with many neurodegenerative diseases. The dopaminergic system of *D. melanogaster* is relatively simple, consisting of only 125 DA neurons per hemisphere of the brain; the cell bodies of DA neurons are clustered and easily visualized. The relative simplicity of the dopaminergic system in *D. melanogaster*, along with its functional similarity to the dopaminergic system of mammals, makes it an excellent model for studying the contribution of individual genes in controlling various properties and functions of DA neurons. We investigated the role of DA neurons in regulating lifespan.

The gene *shaggy* (*sgg*), encoding the highly conserved protein kinase glycogen synthase kinase 3 (GSK3), plays a crucial role in maintaining the stability of the dopaminergic system. GSK3 phosphorylates the transcription factors CREB and NURR1, which in turn regulate the function of the pale gene, encoding tyrosine hydroxylase, a key enzyme in dopamine biosynthesis.

Previously, we have shown that the ectopic expression of an additional copy of the *shaggy* gene, encoding the main transcript *sggRB*, in all DA neurons led to a lethal effect.

Paradoxically, the expression of the same additional copy of the *shaggy* gene in the entire nervous system, including DA neurons, did not cause lethality, indicating the presence of as yet unknown compensatory effects resulting from increased *shaggy* expression in other types of neurons. These findings are even more intriguing considering that ectopic expression of an additional copy of the main transcript with a single-nucleotide replacement in the catalytic center, sggRB-A81T, resulting in reduced enzyme activity within the cell due to a dominant negative effect, led to a statistically significant increase in the lifespan of females.

Recently, an increasing amount of data suggests that individual nerve cells can determine specific types of behavior. This indicates significant differentiation and specialization of nerve cells, including neurons of the same type. The task before us is to understand whether changes in the function of a single gene, the *shaggy* gene, in specific groups of DA neurons can lead to changes in DA, affect the functional state of the nervous system, and behavior.

Methods and Algorithms: To assess the impact of sggRB-A81T expression in specific clusters of DA neurons on the functional state of the nervous system and behavior, we used a modification of the classical binary expression system GAL4-UAS [9], called Split_GAL4, which allows for the induction of construct expression only in specific groups of dopaminergic neurons [10]. Lifespan and the amount of consumed food were evaluated as described in [11]. Neuron visualization was performed using a confocal microscope, GAL4-UAS-GFP, and antibodies to nc82. Interest in food was assessed as described in [12]. Food consumption was also assessed [13]. Statistical analysis of all data was conducted using standard methods [11].

Results and discussion: We evaluated the impact of altered *shaggy* expression, which provided a dominantly negative effect in specific clusters of DA neurons, on the lifespan of virgin female and male *D. melanogaster*. In males, the influence on lifespan is seen through expression in the pal cluster, significantly reducing it. In females, the alteration of *shaggy* expression in the ppm2 cluster leads to an increase in the lifespan of virgin females, but this effect is only evident in the absence of *shaggy* expression in other clusters, suggesting a diverse contribution of different neuron groups to lifespan control. DA neurons are heterogeneous. This is due, on one hand, to where a specific neuron projects, and on the other hand, to the significant differences in dopamine synthesis levels and, therefore, functional status among neurons. Since dopamine synthesis depends on GSK3 activity, it can be assumed that the activity of this protein kinase varies in different DA neurons. Therefore, the expression of the same additional copy in different DA neurons may have different effects on their function and, subsequently, on lifespan. At the same time, it is possible that the nature of the influence on DA content depends on where the neurons project.

It is known that dopamine can perform two functions, it acts as a neurotransmitter and a hormone. DA neurons are strongly linked to reproductive function [14]. We found that in crossed females, changes in *shaggy* expression in individual clusters of DA neurons lead to increased lifespan. To answer the question of whether this is not related to a trade-off effect, where increased lifespan leads to decreased fertility, we evaluated the fertility of females on days 5, 30, and 50 of their lives. It turned out that the altered expression of *shaggy* in different clusters of DA neurons does not affect reproductive function and in some cases even improves it. Thus, local changes in *shaggy* expression in DA neuron clusters lead to increased lifespan in females without reducing their fertility.

DA neurons determine the character of the feeding behavior and olfactory sensitivity of flies. We hypothesized that the increase in lifespan is associated with a limitation in calorie consumption due to a loss of interest in food in flies with altered *shaggy* expression in individual clusters of DA neurons. However, we did not find a decrease in interest in food in flies with increased lifespan, and additional expression of *sggRB-A81T* in the *pal* cluster neurons even led to an increase in food consumption.

Conclusion: We have demonstrated that changes in the function of a single gene in individual clusters of DA neurons can affect lifespan. We have also once again shown sexual dimorphism in lifespan control: the lifespan of males and females depends on different DA neurons with altered *shaggy* expression. The change in lifespan is not explained by compensatory weakening of reproductive function, nor by reduced food consumption and, as a result, reduced caloric intake. The search for molecular and cellular mechanisms of the influence of GSK3 on lifespan will continue.

Funding: The work was carried out as part of the fulfillment of the state assignment of the NRC Kurchatov Institute.

Список литературы/References

1. Morgan D.G., May P.C., Finch C.E. Dopamine and serotonin systems in human and rodent brain: effects of age and neurodegenerative disease. *J Am Geriatr Soc.* 1987;35(4):334-345
2. Zhou Z.D. et al. Role of dopamine in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2023;12(1):44
3. Mao Z., Davis R.L. Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Front Neural Circuits.* 2009;3:5
4. Nässel D.R., Elekes K. Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tissue Res.* 1992;267(1):147-167
5. Ilouz R. et al. Identification of novel glycogen synthase kinase-3 β substrate-interacting residues suggests a common mechanism for substrate recognition. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30621-30630
6. Garcia-Yague A.J. et al. α -Synuclein Induces the GSK-3-Mediated Phosphorylation and Degradation of NURR1 and Loss of Dopaminergic Hallmarks. *Mol Neurobiol.* 2021;58(12):6697-6711
7. Bourouis M. Targeted increase in shaggy activity levels blocks wingless signaling. *Genesis.* 2002;34(1-2):99-102
8. Trostnikov M.V. et al. Modulated Expression of the Protein Kinase GSK3 in Motor and Dopaminergic Neurons Increases Female Lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Front Genet Frontiers.* 2020;11:668
9. Brand A.H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 1993;118(2):401-415
10. Xie T. et al. A Genetic Toolkit for Dissecting Dopamine Circuit Function in *Drosophila*. *Cell Rep.* 2018;23(2):652-665
11. Tsybul'ko E. et al. The Mitochondria-Targeted Plastoquinone-Derivative SkQ1 Promotes Health and Increases *Drosophila melanogaster* Longevity in Various Environments. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017;72(4):499-508
12. Landayan D., Feldman D.S., Wolf F.W. Satiation state-dependent dopaminergic control of foraging in *Drosophila*: 1. *Sci Rep.* 2018;8(1):5777
13. Roshina N.V. et al. Embryonic expression of shuttle craft, a *Drosophila* gene involved in neuron development, is associated with adult lifespan. *Aging (Albany NY).* 2014;6(12):1076-1093
14. Kuo S.-Y. et al. PPL2ab neurons restore sexual responses in aged *Drosophila* males through dopamine: 1. *Nat Commun.* 2015;6(1):7490