

Влияние делеций генов биосинтеза сероводорода *CBS*, *CSE* и *MST* при ограниченном потреблении серосодержащих аминокислот (метионина и цистеина) на жизнеспособность *Drosophila melanogaster*

Горбунова А.А.*, Шапошников М.В., Бабак Т.В., Коваль Л.А., Москалев А.А.

Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Республика Коми, Россия

* gorbunova.a@ib.komisc.ru

Ключевые слова: сероводород; делеции; цистатионин-β-синтаза; цистатионин-γ-лиаза; 3-меркаптопируват-сульфуртрансфераза; метионин; цистеин

Мотивация и цель: Эндогенный синтез сероводорода (H₂S) – биологический процесс, происходящий внутри клеток и тканей организма, который включает серию ферментативных реакций по пути транссульфурации. Этот путь отвечает за метаболизм серосодержащих аминокислот, таких как метионин и цистеин. Цистатионин-β-синтаза (CBS) – один из основных ферментов пути транссульфурации. Он катализирует превращение гомоцистеина и серина, производных метионина, в цистатионин. На следующем этапе транссульфурации цистатионин-γ-лиаза (CSE) катализирует распад цистатионина на цистеин и α-кетобутират. Затем подключается 3-меркаптопируватсульфуртрансфераза (3MST), работающий совместно с цистеинаминотрансферазой (CAT). CAT сначала превращает цистеин и α-кетоглутарат в глутамат и 3-меркаптопируват. Затем 3MST катализирует перенос атома серы от 3-меркаптопирувата к подходящему акцептору, что приводит к образованию H₂S.

Целью настоящего исследования было изучение влияния делеции генов *CBS*, *CSE* и *MST* в различных сочетаниях на продолжительность жизни, стрессоустойчивость и двигательную активность *D. melanogaster* при контроле содержания метионина и цистеина в их рационе.

Фон: Ранее в работах нашего коллектива [1] и в совместных исследованиях с коллегами из Института молекулярной Биологии РАН им. Энгельгардта было показано, что усиленная экспрессия генов *CBS* и *CSE*, а также делеция этих генов вела к увеличению продолжительности жизни, но при этом контроля за содержанием метионина и цистеина в составе диеты не было [2].

Методы: В работе использовали лабораторные линии *D. melanogaster* из коллекции ИМБ РАН им. Энгельгардта, гомозиготные по делециям генов *CBS* (обозначена как *CBS*^{-/-}) и 3-*MST* (3-*MST*^{-/-}), а также гибридная линия с делециями двух генов *CBS* и *CSE* (*CBS*^{-/-}; *CSE*^{-/-}). В качестве контроля использовалась линия 58492 (BDSC_58492, Блумингтон, США, обозначена как (*CBS*^{+/+}, *CSE*^{+/+})).

Контрольных и экспериментальных мух содержали на синтетической питательной среде, без дрожжей, с точно контролируемым составом углеводов, аминокислот, липидов, витаминов и микроэлементов (смесь TD.210411, ENVIGO, США), отличающейся содержанием серосодержащих аминокислот метионина (Met) и цистеина (Cys): контрольная среда, содержащая обе аминокислоты (Met⁺, Cys⁺);

среда, содержащая только метионин (Met⁺, Cys⁻); среда, содержащая только цистеин (Met⁻, Cys⁺) и среда, с дефицитом обеих аминокислот (Met⁻, Cys⁻).

Для оценки продолжительности жизни каждый день подсчитывали количество умерших мух. Замену питательной среды на свежую проводили три раза в неделю. Для индукции окислительного стресса двухнедельных мух содержали на питательной среде с добавлением 20 mM параквата (Merk, Германия). При оценке устойчивости к гипертермии, двухнедельных мух содержали при температуре 35 °C. Обработку паракватом и воздействие гипертермии проводили до гибели всех особей. Возрастные изменения подвижности исследовали путем оценки спонтанной двигательной активности мух с помощью монитора локомоторной активности LAM25H (Trikinetics, США) один раз в неделю.

Для определения статистической значимости различий в медианной и максимальной продолжительности жизни использовали точный критерий Фишера. Лог-ранговый тест использовался для оценки статистической значимости различий между кривыми выживаемости. Двусторонний дисперсионный анализ (ANOVA) вместе с апостериорным тестом Тьюки HSD был проведен для установления статистической значимости отклонений в двигательной активности.

Результаты: При анализе продолжительности жизни линий *D. melanogaster* с делециями по исследуемым генам при различном содержании аминокислот в питательной среде, было отмечено, что продолжительность жизни контрольной линии (CBS^{+/+}, CSE^{+/+}) и линии 3-MST^{-/-} была выше при содержании на среде с добавлением метионина (Met⁺, Cys⁺) и (Met⁺, Cys⁻) по сравнению с вариантами сред с дефицитом метионина (Met⁻, Cys⁺) и (Met⁻, Cys⁻). Было обнаружено, что отсутствие метионина, резко сокращает продолжительность жизни мух. Для особей линии с двойной делецией (CBS^{-/-}; CSE^{-/-}) наибольшая продолжительность жизни наблюдалась при содержании на контрольном варианте среды (Met⁺, Cys⁺), за ним следовал вариант с цистеиновой средой (Met⁻, Cys⁺). Наименьшую продолжительность жизни имели варианты, содержащиеся на средах с дефицитом обеих аминокислот (Met⁻, Cys⁻) и с добавлением метионина, но с дефицитом цистеина (Met⁺, Cys⁻). Последнее наблюдение можно объяснить накоплением гомоцистеина, токсичного промежуточного продукта метаболизма в пути транссульфурации, что может приводить к различным физиологическим нарушениям. Кроме того, у особей линии CBS^{-/-} наибольшая продолжительность жизни наблюдалась в вариантах, содержащихся на питательной среде с цистеином, независимо от добавки метионина (Met⁻, Cys⁺) и (Met⁺, Cys⁺). Наименьшую продолжительность жизни имели мухи в варианте с добавлением метионина, но с дефицитом цистеина (Met⁺, Cys⁻).

В условиях окислительного стресса самки контрольной линии (CBS^{+/+}, CSE^{+/+}) продемонстрировали лучшую выживаемость на среде с дефицитом метионина (Met⁻, Cys⁺), в то время как самцы имели лучшую выживаемость на среде с добавлением метионина (Met⁺, Cys⁻). Особи обоих полов линии CBS^{-/-} имели лучшую выживаемость на контрольной среде (Met⁺, Cys⁺). У линии с двойной делецией (CBS^{-/-}; CSE^{-/-}) контрольная среда (Met⁺, Cys⁺) и среда с дефицитом метионина (Met⁻, Cys⁺) обеспечивали наилучшие условия выживания. У линии 3-MST^{-/-} самцы имели лучшую выживаемость на контрольной среде (Met⁺, Cys⁺) и среде с добавлением метионина и дефицитом цистеина (Met⁺,

Cys-), тогда как самки имели лучшую выживаемость при добавлении какой-либо аминокислоты.

При изучении воздействия гипертермии было отмечено, что линия *CBS*^{-/-} имела самую высокую выживаемость на питательной среде с дефицитом метионина (Met⁻, Cys⁺).

Также установлено, что двигательная активность *D. melanogaster* существенно варьирует в зависимости от наличия или отсутствия аминокислот, их сочетаний, возраста и пола. В частности, влияние метионина на двигательную активность различалось у самцов и самок контрольной линии (*CBS*^{+/+}, *CSE*^{+/+}). У самок добавление в рацион метионина снижало двигательную активность. У самцов, наоборот, присутствие метионина в среде ее повышало.

Выводы: Согласно полученным результатам, на продолжительность жизни, выживаемость и двигательную активность *D. melanogaster* влияет взаимодействие между ферментами, продуцирующими сероводород (*CBS*, *CSE* и *3MST*) и пищевыми серосодержащими аминокислотами (метионином и цистеином).

Присутствие метионина и цистеина в рационе *D. melanogaster* оказывает существенное влияние на продолжительность жизни. В частности, было обнаружено, что отсутствие метионина резко сокращает продолжительность жизни контрольной линии мух (*CBS*^{+/+}, *CSE*^{+/+}) и линии *3-MST*^{-/-}. Результаты также показывают, что линия с двойной делецией (*CBS*^{-/-}; *CSE*^{-/-}) и линия с одиночной делецией (*CBS*^{-/-}) по-разному реагируют на присутствие или отсутствие метионина и цистеина в их рационе. У линии с двойной делецией вариант контрольной среды (Met⁺, Cys⁺) имел наибольшую продолжительность жизни, за ним следовал вариант с добавлением цистеина (Met⁻, Cys⁺). Это говорит о том, что наличие цистеина более важно для долголетия мух на этом генетическом фоне, чем присутствие метионина. Наименьшую продолжительность жизни имели варианты с дефицитом обеих аминокислот (Met⁻, Cys⁻) и вариант с добавлением метионина (Met⁺, Cys⁻), что могло быть связано с накоплением гомоцистеина. В целом, исследование подчеркивает важность сбалансированной диеты, включающей как метионин, так и цистеин, для долголетия *D. melanogaster* и предполагает, что генетический фон мух может влиять на их реакцию на различные диетические условия.

Оптимальные условия для выживания при окислительном стрессе и гипертермии различались, у разных линий и полов, что указывает на то, что влияние различных факторов на выживаемость является сложным и может зависеть от генетического фона и факторов, специфичных для пола. Это подчеркивает важность рассмотрения пола как биологической переменной в исследованиях, изучающих влияние пищевых компонентов на физиологические и поведенческие результаты. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы полностью понять основные механизмы и потенциальное применение этих результатов.

Финансирование: Работа выполнена в рамках гранта РНФ № 17-74-30030.

Effect of deletions of the *CBS*, *CSE* and *MST* hydrogen sulfide biosynthesis genes under restricted intake of sulfur-containing amino acids (methionine and cysteine) on the viability of *Drosophila melanogaster*

Gorbunova A.A.*, Shaposhnikov M.V., Babak T.V., Koval L.A., Moskalev A.A.

Institute of Biology, Federal Research Center Komi Scientific Center, Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Komi Republic, Russia

* gorbunova.a@ib.komisc.ru

Key words: hydrogen sulfide; deletions; cystathionine- β -synthase; cystathionine- γ -lyase; 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase; methionine; cysteine

Motivation and Aim: Endogenous hydrogen sulfide (H_2S) synthesis is a biological process occurring within the cells and tissues of the body that involves a series of enzymatic reactions via the transsulfuration pathway. This pathway is responsible for the metabolism of sulfur-containing amino acids such as methionine and cysteine. Cystathionine- β -synthase (CBS) is one of the major enzymes of the transsulfuration pathway. It catalyzes the conversion of homocysteine and serine derivatives of methionine to cystathionine. In the next step of transsulfuration, cystathionine- γ -lyase (CSE) catalyzes the breakdown of cystathionine into cysteine and α -ketobutyrate. Then 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST), working in conjunction with cysteine aminotransferase (CAT), is involved. CAT first converts cysteine and α -ketoglutarate to glutamate and 3-mercaptopyruvate. 3MST then catalyzes the transfer of a sulfur atom from 3-mercaptopyruvate to a suitable acceptor, resulting in the formation of H_2S . The aim of the present study was to investigate the effect of deletion of *CBS*, *CSE* and *MST* genes in different combinations on longevity, stress tolerance and locomotor activity of *D. melanogaster* while controlling methionine and cysteine content in their diet.

Background: Earlier in the works of our team [1] and in joint studies with colleagues from the Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, it was shown that enhanced expression of *CBS* and *CSE* genes, as well as deletion of these genes, led to an increase in life span, but at the same time the content of methionine and cysteine in the diet was not controlled experimentally [2].

Methods and Algorithms: Laboratory lines of *D. melanogaster* from the Engelhardt IMB RAS collection homozygous for deletions of *CBS* (designated as *CBS*^{-/-}) and 3-MST (*3-MST*^{-/-}) genes, as well as a hybrid line with deletions of two genes *CBS* and *CSE* (*CBS*^{-/-}; *CSE*^{-/-}). Line 58492 (BDSC_58492, Bloomington, USA, designated as (*CBS*^{+/+}, *CSE*^{+/+})) was used as control.

Control and experimental flies were maintained on synthetic nutrient medium, without yeast, with precisely controlled composition of carbohydrates, amino acids, lipids, vitamins and trace elements (mix TD.210411, ENVIGO, USA), differing in the content of the sulfur-containing amino acids methionine (Met) and cysteine (Cys): control medium containing both amino acids (Met⁺, Cys⁺); medium containing only methionine (Met⁺, Cys⁻); medium containing only cysteine (Met⁻, Cys⁺) and medium deficient in both amino acids (Met⁻, Cys⁻).

The number of flies that died was counted each day to assess longevity. The nutrient medium was replaced with fresh medium three times a week. For induction of oxidative stress, two-week-old flies were maintained on nutrient medium supplemented with 20 mM paraquat (Merk, Germany). For evaluation of resistance to hyperthermia, two-week-old flies were kept at 35 °C. Paraquat treatment and exposure to hyperthermia were carried out until all individuals were killed. Age-related changes in motility were investigated by assessing the spontaneous locomotor activity of flies using a LAM25H locomotor activity monitor (Trikinetics, USA) once a week.

Fisher's exact test was used to determine the statistical significance of differences in median and maximum life expectancy. Log-rank test was used to assess the statistical significance of differences between survival curves. Two-way analysis of variance (ANOVA) along with Tukey's HSD posterior test was performed to establish the statistical significance of variance in motor activity.

Results: When analyzing the life span of *D. melanogaster* lines with deletions in the studied genes at different content of amino acids in the nutrient medium, it was noted that the life span of the control line (*CBS*^{+/+}, *CSE*^{+/+}) and the *3-MST*^{-/-} line was higher when the medium was supplemented with methionine (Met⁺, Cys⁺) and (Met⁺, Cys⁻) compared to the variants of the medium with methionine deficiency (Met⁻, Cys⁺) and (Met⁻, Cys⁻). Lack of methionine was found to drastically reduce the lifespan of flies. For individuals of the line with double deletion (*CBS*^{-/-}; *CSE*^{-/-}), the longest life span was observed when kept on control medium (Met⁺, Cys⁺), followed by the variant with cysteine medium (Met⁻, Cys⁺). The shortest life span was observed for variants kept on media deficient in both amino acids (Met⁻, Cys⁻) and with the addition of methionine but deficient in cysteine (Met⁺, Cys⁻). The latter observation could be explained by the accumulation of homocysteine, a toxic metabolic intermediate in the transsulfuration pathway, which may lead to various physiological disorders. In addition, in individuals of the *CBS*^{-/-} line, the longest lifespan was observed in variants maintained on nutrient medium with cysteine, regardless of methionine supplementation (Met⁻, Cys⁺) and (Met⁺, Cys⁺). Flies in the methionine supplemented but cysteine deficient (Met⁺, Cys⁻) variant had the shortest lifespan.

Under oxidative stress conditions, control females (*CBS*^{+/+}, *CSE*^{+/+}) showed better survival on methionine-deficient medium (Met⁻, Cys⁺), while males had better survival on methionine-supplemented medium (Met⁺, Cys⁻). Individuals of both sexes of the *CBS*^{-/-} line had better survival on control medium (Met⁺, Cys⁺). In the double deletion line (*CBS*^{-/-}; *CSE*^{-/-}), control medium (Met⁺, Cys⁺) and methionine-deficient medium (Met⁻, Cys⁺) provided the best survival conditions. In the *3-MST*^{-/-} line, males had the best survival on control medium (Met⁺, Cys⁺) and methionine- and cysteine-deficient medium (Met⁺, Cys⁻), whereas females had the best survival when any amino acid was added.

When the effects of hyperthermia were studied, it was observed that *CBS*^{-/-} line had the highest survival rate on nutrient medium with methionine deficiency (Met⁻, Cys⁺).

The locomotor activity of *D. melanogaster* was also found to vary significantly depending on the presence or absence of amino acids, their combinations, age and sex. In particular, the effect of methionine on locomotor activity differed between males and control line females (*CBS*^{+/+}, *CSE*^{+/+}). In females, the addition of methionine to the diet decreased locomotor activity. In males, on the contrary, the presence of methionine in the medium increased it.

Conclusions: According to the results obtained, the longevity, survival and locomotor activity of *D. melanogaster* are influenced by the interaction between hydrogen sulfide-producing enzymes (CBS, CSE and 3MST) and dietary sulfur-containing amino acids (methionine and cysteine).

The presence of methionine and cysteine in the diet of *D. melanogaster* has a significant effect on longevity. In particular, the absence of methionine was found to dramatically reduce the lifespan of the control fly line (CBS^{+/+}, CSE^{+/+}) and the 3-MST^{-/-} line. The results also show that a line with a double deletion (CBS^{-/-}; CSE^{-/-}) and a line with a single deletion (CBS^{-/-}) respond differently to the presence or absence of methionine and cysteine in their diet. In the double deletion line, the control medium variant (Met⁺, Cys⁺) had the highest longevity, followed by the cysteine supplemented variant (Met⁻, Cys⁺). This suggests that the presence of cysteine is more important for fly longevity in this genetic background than the presence of methionine. The variants deficient in both amino acids (Met⁻, Cys⁻) and the variant with methionine supplementation (Met⁺, Cys⁻) had the lowest longevity, which could be due to homocysteine accumulation. Overall, the study emphasizes the importance of a balanced diet including both methionine and cysteine for the longevity of *D. melanogaster* and suggests that the genetic background of flies may influence their response to different dietary conditions.

Optimal conditions for survival under oxidative stress and hyperthermia differed, across lines and sexes, indicating that the effects of various factors on survival are complex and may depend on genetic background and sex-specific factors. This highlights the importance of considering sex as a biological variable in studies examining the effects of nutritional components on physiological and behavioral outcomes.

Further research is needed to fully understand the underlying mechanisms and potential applications of these findings.

Funding: The work was carried out within the framework of the Russian Science Foundation grant No. 17-74-30030.

Список литературы/References

1. Shaposhnikov M. et al. Overexpression of CBS and CSE genes affects lifespan, stress resistance and locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(11):3260-3272. doi 10.18632/aging.101630
2. Shaposhnikov M.V. et al. Deletions of the *cystathionine-β-synthase* (CBS) and *cystathionine-γ-lyase* (CSE) genes, involved in the control of hydrogen sulfide biosynthesis, significantly affect lifespan and fitness components of *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev.* 2022;203:111656. doi 10.1016/j.mad.2022.111656