

Генетическое и фармакологическое подавление piwi модулирует продолжительность жизни и радиоустойчивость *Drosophila melanogaster*

Прошкина Е.*, Уляшева Н., Пакшина Н., Коваль Л., Юшкова Е.,
Соловьёв И., Шапошников М., Москалев А.

Институт биологии ФИЦ КомиНЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

* proshkina.e.n@ib.komisc.ru

Ключевые слова: PIWI; Argonaute; продолжительность жизни; радиоустойчивость; γ -излучение; *Drosophila melanogaster*

Мотивация и цель: Белки подсемейства PIWI семейства Argonaute и взаимодействующие с ними piwiРНК играют решающую роль в подавлении активности мобильных генетических элементов (МГЭ), которые являются одной из эндогенных причин геномной нестабильности. С возрастом происходит снижение эффективности данного механизма, в результате чего изменяется активность МГЭ и частота транспозиций, нарушаются структура и стабильность генома. Такие изменения связаны со старением и развитием возрастных заболеваний. В то же время стрессовые факторы, включая ионизирующие излучения, могут влиять на баланс активности МГЭ и усиливать возрастные изменения [1].

Как правило, функции белков PIWI и piwiРНК описывают в связи с поддержанием клеток зародышевой линии и половых желез. Однако в настоящее время расширяется понимание их функций в соматических тканях и регуляции продолжительности жизни (ПЖ) организма. Например, piwi подавляет возрастную экспрессию транспозонов в стволовых клетках кишечника дрозофилы и поддерживает эпителиальный гомеостаз [2]. Мутация гена piwi вызывает истощение жирового тела, нарушение липидного обмена и иммунитета, увеличение уровня повреждений ДНК у мух [3]. Также у дрозофилиной модели таупатии показано снижение активности piwi и дифференциальные изменения экспрессии piwiРНК в головах [4]. В то же время установлены как отрицательные, так и положительные эффекты мутаций piwi на ПЖ дрозофилы [3, 5].

В данной работе изучен вклад активности гена piwi в различных тканях имаго в регуляцию ПЖ и радиоустойчивости *Drosophila melanogaster*. Кроме того, проведен поиск потенциальных препаратов, способных модулировать активность белков PIWI, и оценен их геропротекторный и радиопротекторный потенциал.

Методы и алгоритмы: Исследование проводили на модели плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Для анализа возрастной динамики экспрессии генов и оценки геропротекторных и радиопротекторных свойств потенциальных ингибиторов PIWI использовали линию дикого типа Canton-S. В экспериментах по изучению влияния нокдауна гена piwi на ПЖ и радиоустойчивость особей получали путем скрещивания линий с UAS- и GAL4- конструкциями. UAS-линия экспрессирует двуцепочечную РНК для РНК-интерференции piwi под контролем

промотора UAS. GAL4-линии несут кондиционный (мифепристон-индуцируемый) драйвер GAL4-GeneSwitch в определенных тканях (*elav* – в нервной системе, *S106* – в жировом теле, *TIGS-2* – в кишечнике, *Mhc* – в мышцах). Полученные в результате скрещивания самцы и девственные самки были помещены в пробирки со средой, содержащей индуктор кондиционного GAL4 мифепристон (RU486, Sigma-Aldrich, США). Контрольные особи были получены в результате такого же скрещивания, но содержались на среде без мифепристона.

При анализе ПЖ мух содержали в стандартных условиях [6] до конца жизни. При изучении устойчивости к γ -излучению (120, 700 или 800 Гр) дрозофилы 15 сут находились в условиях, аналогичных экспериментам на ПЖ, после чего подвергались воздействию ионизирующего излучения и были помещены в пробирки без мифепристона, этанола или потенциальных ингибиторов PIWI. На основе полученных данных строили кривые дожития, рассчитывали медианную, среднюю ПЖ и возраст 90 % смертности. Статистическую значимость различий оценивали с помощью непараметрических критериев Колмогорова–Смирнова, Мантеля–Кокса, Гехана–Бреслоу–Вилкоксона, метода Ванг–Аллисона.

Анализ экспрессии генов с помощью метода ПЦР «в реальном времени» проводили на 15-е сутки жизни имаго с использованием целых дрозофил либо их частей (головы, тораксы или брюшки). Выделение РНК, проведение обратной транскрипции и постановку ПЦР выполняли с использованием реактивов и по методикам, описанным ранее [6]. Для оценки статистической значимости различий использовали критерий Манна–Уитни.

Компьютерный поиск потенциальных лигандов *piwi* дрозофилы и PIWI1 человека, моделирование межмолекулярных взаимодействий и подбор концентраций проводили с помощью онлайн-инструментов DockThor (<https://www.dockthor.lncc.br/v2>) и AmDock (<https://github.com/Valdes-Tresanco-MS/AMDock>).

Результаты: Установлено, что с возрастом происходит одновременное повышение активности ретротранспозонов (в 2–12 раз, $p < 0.05$) и гена *piwi* (в 2–7 раз, $p < 0.05$) в головах, брюшках и во всем теле дрозофил. Это может указывать как на дерегуляцию биогенеза *piwi*РНК, так и на компенсаторный ответ на возрастающую с возрастом активность МГЭ и нарушение структуры хроматина.

В то же время нокдаун гена *piwi* в жировом теле и нервной системе увеличивал медианную ПЖ на 2–12 % ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными особями. Но подавление активности *piwi* в кишечнике и мышцах, напротив, укорачивало жизнь мух. Как правило, повышенная ПЖ сопровождается усилением устойчивости организма к повреждающим факторам, таким как γ -излучение. Однако у дрозофил с нокдауном *piwi* эта связь была неоднозначна. У особей со сниженной активностью *piwi* в жировом теле наблюдали повышенную устойчивость к γ -излучению в дозе 700 Гр, тогда как нейрональный нокдаун этого гена увеличивал радиорезистентность мух. Кроме того, нокдаун *piwi* в нервной системе и в жировом теле повышал активность ретротранспозонов в 2–7 раз ($p < 0.05$) в головах и брюшках соответственно. Вместе с этим у них была повышена экспрессия генов антиоксидантной защиты (*Sod1*, *Prx5*), ответа на повреждение ДНК (*Gadd45*, *spn-B*, *Ku80*) и протеостаза (*Hsp27*, *Hsp68*, *Atg1*) до 8 раз ($p < 0.05$). Мы предположили, что фармакологическое ингибирование PIWI также может оказывать влияние на ПЖ и радиоустойчивость организма. Проведенный компьютерный поиск позволил составить список фармакологических препаратов,

которые потенциально могут связываться с белком piwi дрозофилы и PIWIL1 человека. Среди данных соединений были выбраны пять веществ для скрининга геропротекторных свойств на модели дрозофилы – метопролол, атенолол, мизопростол, имипенем и финголимод. Для них был подобран спектр концентраций 1–5000 мкмоль/л, основываясь на компьютерном анализе и данных литературы. Все изученные препараты оказали положительное влияние на показатели ПЖ организма, но в некоторых случаях этот эффект присутствовал только при определенных концентрациях. Наиболее выраженное и воспроизводимое увеличение ПЖ вызывали метопролол в концентрациях 1–5000 мкмоль/л (3–9 %, $p < 0.0001$) и имипенем в концентрациях 1–100 мкмоль/л (4–14 %, $p < 0.0001$) у самок. В то же время потенциальные ингибиторы PIWI преимущественно снижали устойчивость дрозофил к воздействию γ -излучения. Защитное действие к облучению в дозе 120 Гр оказывали β -блокаторы атенолол и метопролол. Они повышали выживаемость дрозофил на 5–13 % ($p < 0.001$). Финголимод повышал выживаемость самок дрозофил после облучения в дозе 800 Гр на 18–32 % ($p < 0.001$). Кроме того, изученные препараты вызывали дифференциальные изменения активности генов антиоксидантной защиты (*Sod1*), ответа на повреждение ДНК (*Gadd45*, *mus210*, *Brca2*, *Ku80*) и протеостаза (*Hsp27*, *Hsp68*, *Atg1*, *Atg5*, *Ire*) до 5 раз ($p < 0.05$).

Выводы: Мы впервые показали, что нокдаун гена *piwi* в нервной системе и жировом теле вызывает увеличение ПЖ дрозофил и повышает активность генов, связанных со стресс-ответом и долголетием. При этом подавление *piwi* в жировом теле стимулирует устойчивость организма к γ -излучению, а нейрональный нокдаун снижает ее. Нами идентифицированы потенциальные ингибиторы белков PIWI. Для пяти из них (атенолола, метопролола, имипенема, финголимода и мизопростола) показаны геропротекторные свойства. Наиболее выраженное и воспроизводимое увеличение ПЖ вызывают метопролол и имипенем у самок. Влияние потенциальных ингибиторов PIWI на радиостойкость неоднозначно, зависит от концентрации препарата и дозы облучения.

Финансирование: Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме «Генетические и функциональные исследования эффектов геропротекторных интервенций на модели *Drosophila melanogaster*» (№ 122040600022-1).

Genetic and pharmacological piwi suppression modulates lifespan and radioresistance of *Drosophila melanogaster*

Proshkina E.*, Ulyasheva N., Pakshina N., Koval L., Yushkova E., Solovyov I., Shaposhnikov M., Moskalev A.

Institute of Biology, FRC Komi SC UB RAS, Syktyvkar, Russia

* proshkina.e.n@ib.komisc.ru

Key words: PIWI; Argonaute; lifespan; radioresistance; γ -radiation; *Drosophila melanogaster*

Motivation and Aim: Proteins of the PIWI subfamily of the Argonaute family and their interacting piwiRNAs play a crucial role in suppressing the activity of transposable elements (TEs), which are one of the endogenous causes of genomic instability. With

age, the effectiveness of this mechanism decreases, as a result of which the activity of TEs and the frequency of transpositions change, and the genome structure and stability is disrupted. Such changes are associated with aging and the development of age-related diseases. At the same time, stress factors, including ionizing radiation, can affect the balance of TE activity and enhance age-related changes [1].

Usually, the functions of PIWI proteins and piwiRNAs are described in relation to the maintenance of germline and gonad cells. However, the understanding of their functions in somatic tissues and the regulation of lifespan of an organism is currently expanding. For example, piwi suppresses age-related transposon expression in *Drosophila* intestinal stem cells and maintains epithelial homeostasis [2]. Mutation of the *piwi* gene causes depletion of the fat body, impaired lipid metabolism and immunity, and an increase in the level of DNA damage in flies [3]. Also, the *Drosophila* model of tauopathy showed a decrease in piwi activity and differential changes in piwiRNA expression in heads [4]. At the same time, both negative and positive effects of *piwi* mutations on the lifespan of *Drosophila* have been established [3, 5].

In this work, we studied the contribution of *piwi* gene activity in various imago tissues to the regulation of lifespan and radioresistance of *Drosophila melanogaster*. In addition, a search was carried out for potential drugs capable of modulating the activity of PIWI proteins, and their geroprotective and radioprotective potential was assessed.

Methods and Algorithms: The study was carried out on a model of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. To analyze the age-related dynamics of gene expression and evaluate the geroprotective and radioprotective properties of potential PIWI inhibitors, the wild-type strain Canton-S was used. In experiments to study the effect of *piwi* gene knockdown on lifespan and radioresistance, individuals were obtained by crossing flies with UAS and GAL4 constructs. The UAS strain expresses double-stranded RNA for *piwi* RNA-interference under the control of the UAS promoter. GAL4 strains carry the conditional (mifepristone-inducible) GAL4-GeneSwitch driver in certain tissues (*elav* – in the nervous system, *S106* – in the fat body, *TIGS-2* – in the intestines, *Mhc* – in muscles). The resulting males and virgin females were placed in tubes containing medium with the conditional GAL4 inducer mifepristone (RU486, Sigma-Aldrich). Control individuals were obtained as a result of the same crossing, but were kept on medium without mifepristone.

When analyzing the lifespan of flies, they were kept under standard conditions [6] until the end of life. When studying resistance to γ -radiation (120, 700, or 800 Gy), *Drosophila* were kept for 15 days under conditions similar to the lifespan experiments, after which they were exposed to radiation and were placed in tubes without mifepristone, ethanol, or potential PIWI inhibitors. Based on the obtained data, survival curves were constructed; median, average lifespan, and age of 90 % mortality were calculated. The statistical significance of differences was assessed using nonparametric Kolmogorov–Smirnov, Mantel–Cox, Gehan–Breslow–Wilcoxon tests, and the Wang–Allison method.

Analysis of gene expression using the real-time PCR method was carried out on the 15th day of adult life using whole flies or their parts (head, thorax or abdomen). RNA isolation, reverse transcription, and PCR were performed using reagents and methods described previously [6]. To assess the statistical significance of differences, the Mann–Whitney test was used.

A computer search for potential ligands of *Drosophila* piwi and human PIWIL1, modeling of intermolecular interactions and selection of concentrations were carried out

using the online tools DockThor (<https://www.dockthor.lncc.br/v2>) and AmDock (<https://github.com/Valdes-Tresanco-MS/AMDock>).

Results: It has been established that there is an age-related simultaneous increase in the activity of retrotransposons (2–12 times, $p < 0.05$) and the *piwi* gene (2–7 times, $p < 0.05$) in the heads, abdomens, and whole body of fruit flies. This may indicate both deregulation of piwiRNA biogenesis and a compensatory response to TE activity and disruption of chromatin structure that increase with age.

At the same time, knockdown of the *piwi* gene in the fat body and nervous system increased the median lifespan by 2–12 % ($p < 0.05$) compared to control individuals. But suppression of *piwi* activity in the intestines and muscles, on the contrary, shortened the lives of flies. As a rule, increased lifespan is accompanied by increased resistance to damaging factors, such as γ -radiation. However, in *piwi* knockdown fruit flies, this association was ambiguous. In individuals with reduced *piwi* activity in the fat body, increased resistance to γ -radiation at a dose of 700 Gy was observed, while neuronal knockdown of this gene increased the radioresistance of flies. In addition, knockdown of *piwi* in the nervous system and fat body increased retrotransposon activity by 2–7 times ($p < 0.05$) in the heads and abdomens, respectively. However, they had increased expression of genes for antioxidant defense (*Sod1*, *Prx5*), DNA damage response (*Gadd45*, *spn-B*, *Ku80*) and proteostasis (*Hsp27*, *Hsp68*, *Atg1*) up to 8 times ($p < 0.05$). We hypothesized that pharmacological inhibition of PIWI may also have an effect on lifespan and radioresistance of an organism. A computer search allowed us to compile a list of pharmacological drugs that can potentially bind to the *Drosophila* piwi protein and human PIWIL1. Among these compounds, five substances were selected to screen for geroprotective properties in the *Drosophila* model – metoprolol, atenolol, misoprostol, imipenem, and fingolimod. A concentration range of 1–5000 $\mu\text{mol/l}$ was selected for them, based on computer analysis and literature data. All the drugs studied had a positive effect on the lifespan, but in some cases this effect was present only at certain concentrations. The most pronounced and reproducible increase in lifespan was caused by metoprolol at concentrations of 1–5000 $\mu\text{mol/l}$ (3–9 %, $p < 0.0001$) and imipenem at concentrations of 1–100 $\mu\text{mol/l}$ (4–14 %, $p < 0.0001$) in females. At the same time, potential PIWI inhibitors predominantly reduced the resistance of *Drosophila* to γ radiation. The β -blockers atenolol and metoprolol had a protective effect against radiation at a dose of 120 Gy. They increased the survival rate of *Drosophila* by 5–13 ($p < 0.001$). Fingolimod increased the survival of *Drosophila* females after irradiation at a dose of 800 Gy by 18–32 % ($p < 0.001$). In addition, the studied drugs caused differential changes in the activity of antioxidant defense genes (*Sod1*), response to DNA damage (*Gadd45*, *mus210*, *Brca2*, *Ku80*) and proteostasis (*Hsp27*, *Hsp68*, *Atg1*, *Atg5*, *Ire*) up to 5 times ($p < 0.05$).

Conclusion: We have shown for the first time that knockdown of the *piwi* gene in the nervous system and fat body causes an increase in the lifespan of *Drosophila* and increases the activity of genes associated with stress-response and longevity. In this case, suppression of *piwi* in the fat body stimulates the resistance to γ -radiation, and neuronal knockdown reduces it. We have identified potential inhibitors of PIWI proteins. Five of them (atenolol, metoprolol, imipenem, fingolimod and misoprostol) have shown geroprotective properties. The most pronounced and reproducible increase in lifespan cause by metoprolol and imipenem in females. The effect of potential PIWI inhibitors on radioresistance is ambiguous and depends on the drug concentration and radiation dose.

Funding: The study was carried out within the framework of the state task on the theme “Genetic and functional studies of the effects of geroprotective interventions on the *Drosophila melanogaster* model” (No. 12204060022-1).

Список литературы/References

1. Yushkova E., Moskalev A. Transposable elements and their role in aging. *Ageing Res Rev.* 2023;86:101881. doi 10.1016/j.arr.2023.101881
2. Tang X. et al. Piwi maintains homeostasis in the *Drosophila* adult intestine. *Stem Cell Rep.* 2023;18(2):503-518. doi 10.1016/j.stemcr.2023.01.001
3. Jones B.C. et al. A somatic piRNA pathway in the *Drosophila* fat body ensures metabolic homeostasis and normal lifespan. *Nat Commun.* 2016;7:13856. doi 10.1038/ncomms13856
4. Sun W. et al. Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies. *Nat Neurosci.* 2018;21(8):1038-1048. doi 10.1038/s41593-018-0194-1
5. Ma Z. et al. Epigenetic drift of H3K27me3 in aging links glycolysis to healthy longevity in *Drosophila*. *Elife.* 2018;7:e35368. doi 10.7554/eLife.35368
6. Proshkina E. et al. Tissue-specific knockdown of genes of the Argonaute family modulates lifespan and radioresistance in *Drosophila melanogaster*. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2396. doi 10.3390/ijms22052396