

Изменение экспрессии транскрипционного фактора *Stc* в нервной системе и мышечной ткани увеличивает продолжительность здоровой жизни дрозофилы

Симоненко А.В.^{1*}, Рощина Н.В.^{1, 2}, Пасюкова Е.Г.¹

¹ Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

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

* symonenko@gmail.com

Ключевые слова: дрозофила; *shuttle craft*; продолжительность жизни; подвижность; регуляция транскрипции; нервная система; нейрогенез; миозин; РНК-интерференция

Мотивация и цель: Увеличение здоровой продолжительности жизни является важнейшей целью исследований в биологии и медицине, имеющей значение для развития и подъема уровня благополучия человеческого общества в целом. Как показывают современные данные, если вплоть до возраста поздней зрелости долголетия можно достичь соблюдением здорового образа жизни, в пожилом возрасте решающую роль в определении качества и продолжительности жизни человека начинают играть генетические факторы.

В наших исследованиях генетического контроля продолжительности жизни основное внимание сосредоточено на белках-регуляторах транскрипции, поскольку именно они оказывают влияние сразу на многие гены, запуская в онтогенезе каскады генетической регуляции. Мы считаем важнейшими системами, определяющими продолжительность жизни организма, нервную, поскольку нейроны сохраняются в течение всего срока жизни и играют ключевую роль в регуляции основных функций организма, и мышечную, которая составляет основную часть массы тела (от 36 до 70 % у человека и 75 % у модельного объекта дрозофилы), внося важнейший вклад в общий метаболизм и реакцию организма на факторы внешней среды.

Мы исследуем влияние на продолжительность жизни уровня экспрессии в этих тканях гена *shuttle craft (stc)*, кодирующего транскрипционный фактор *Stc*, который влияет на развитие аксонов мотонейронов у дрозофилы [1].

Методы и алгоритмы: Для изменения экспрессии *stc* использовали бинарную систему Gal4-UAS [2]. Для индукции РНК-и нокдауна *stc* использовали линию с трансгеном, кодирующим двухцепочечную РНК *stc* (полученные из Vienna Drosophila Resource Centre линия VDRC_47973 и контрольная линия VDRC_60000), и линии драйверы, обеспечивающие паннейрональную экспрессию, экспрессию в центральной нервной системе эмбриона, мотонейронах и мышцах (полученные из Bloomington Drosophila Stock Center, линии BDSC_257750, BDSC_8165, BDSC_8816, BDSC_25756, соответственно). При необходимости за несколько поколений до использования в экспериментах линии были излечены от внутриклеточного паразита *Wolbachia*, влияющего на продолжительность жизни, развитие и метаболизм дрозофилы.

Уровень нокдауна *stc* у экспериментальных особей и его влияние на экспрессию возможных мишеней *Stc* проверяли при помощи кПЦР с использованием SYBR

Green I в системе MiniOpticon (Bio-Rad, США). Для оценки значимости отличий в количестве мРНК использовали процедуру ANOVA.

Продолжительности жизни измеряли у девственных мух одного пола, помещенных по 5 штук в пробирки со стандартным кормом, содержащим сахар, дрожжи, изюм и манную крупу, при температуре 25 °C и влажности 60 %, с чередованием света/темноты через 12 часов. Регистрацию погибших особей производили ежедневно, живых мух переносили на свежий корм еженедельно. Для оценки статистической значимости различий между кривыми выживания использовали тест Манна-Уитни, для оценки поздних эффектов – тест Флеминга-Харрингтона. Расчеты выполняли в программе OASIS 2 [3]. Для коррекции на множественность сравнений использовали поправку Бонферрони.

Измерение подвижности каждые десять дней проводили в пробирках диаметром 25 мм, содержащих по 5 девственных мух одного пола/возраста/генотипа, в горизонтальном положении помещенных в *Drosophila* Population Monitor (TriKinetics, США). Значимость отличий между средними значениями количества пересечений мухами трех светодиодных колец в течение пяти минут определяли, используя процедуру ANOVA.

Результаты: Учитывая, что у дрозофилы *Stc* был описан как нейрональный транскрипционный фактор [1], мы проанализировали влияние на продолжительность жизни паннейронального нокдауна *stc*. Такой нокдаун обусловил сокращение продолжительности жизни самцов на 13-15 % ($P < 0.0001$). Мы исследовали последствия селективного нокдауна *stc* в эмбриональной нервной системе, и оказалось, что он увеличивает продолжительность жизни взрослых самцов на 12 % ($P < 0.0001$). При этом подвижность таких самцов не отличалась от подвижности контрольных, а в возрасте сорок дней даже превышала ее ($P = 0.004$), что является индикатором сохранения хорошего функционального состояния нервной и двигательной систем. Таким образом, можно предположить, что, поскольку в отличие от паннейронального нокдауна *stc*, селективный нокдаун в нервной системе на стадии эмбриогенеза полезен, то отрицательный вклад может вносить нокдаун *stc* на более поздних стадиях развития. Исходя из известной функции *stc* в развитии мотонейронов, мы определили влияние на продолжительность жизни селективного нокдауна в мотонейронах, и оказалось, что он не оказывал достоверного влияния на продолжительность жизни самцов ($P = 0.795$). Вопрос о том, какие нейроны ответственны за снижение продолжительности жизни при паннейрональном нокдауне *stc*, остается пока открытым.

Для определения возможных мишеней транскрипционного фактора *Stc*, обуславливающих продление жизни, мы проанализировали изменения транскриптома в случае нокдауна *stc* в эмбриональной нервной системе и проверили их с помощью кПЦР. Среди выделенных нами мишеней оказались гены, определяющие развитие нервной системы (*N*, *Nej*, *Unc-115a*). Также, как возможные мишени *Stc* были определены несколько генов, участвующих в развитии мышечной системы, в частности, ген *Mhc*, кодирующий одну из субъединиц миозина. Учитывая этот факт, мы изучили влияние на продолжительность жизни нокдауна *stc* в миоцитах. Оказалось, что селективное снижение экспрессии *stc* в мышцах самцов увеличивает продолжительность их жизни на 19 % ($P < 0.0001$).

Выводы: Мы показали, что селективный нокдаун нейронального транскрипционного фактора *Stc* в эмбриональной нервной системе дрозофилы обуславливает увеличение здоровой продолжительности жизни имаго с сохранением высокого функционального статуса нервной и мышечной систем. Также положительное влияние на продолжительность жизни оказывает снижение экспрессии *Stc* в мышечных клетках. Возможными мишенями *Stc*, опосредующими эти эффекты, является ряд генов, участвующих в развитии нервной системы, а также основной мышечный белок миозин.

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

Changes in the expression of the *Stc* transcription factor in the nervous system and muscle tissue increase the healthspan of *Drosophila*

Symonenko A.V.^{1*}, Roshina N.V.^{1,2}, Pasyukova E.G.¹

¹ National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

* symonenko@gmail.com

Key words: *Drosophila*; shuttle craft; lifespan; locomotion; transcription regulation; nervous system; neurogenesis; myosin; RNA interference

Motivation and Aim: Increasing healthy lifespan is a crucial goal of research in biology and medicine, with significant implications for the development and enhancement of the well-being of human society as a whole. According to contemporary data, while longevity can be achieved up to late adulthood through a healthy lifestyle, genetic factors play a decisive role in determining the quality of life and lifespan in old age.

In our studies on the genetic control of lifespan, we focus primarily on transcriptional regulator proteins, as they influence multiple genes at once, triggering cascades of genetic regulation during ontogenesis. We consider the nervous system, which maintains neurons throughout life and plays a key role in regulating fundamental functions of the body, and the muscular system, which constitutes the majority of body mass (36–70 % in humans and 75 % in the model organism *Drosophila*), contributing significantly to overall metabolism and the organism's response to environmental factors, as the most critical systems determining lifespan.

We investigate the impact on lifespan of the expression level of the *shuttle craft* (*stc*) gene, which encodes the transcription factor *Stc*, known to affect the development of motor neuron axons in *Drosophila* [1], in these tissues.

Methods and Algorithms: To alter *stc* expression, we used the binary Gal4-UAS system [2]. For RNAi-induced *stc* knockdown, we utilized a transgenic line encoding double-stranded *stc* RNA (obtained from the Vienna *Drosophila* Resource Centre, line VDRC_47973 and control line VDRC_60000), and driver lines targeting pan-neuronal expression, expression in the embryonic central nervous system, motor neurons, and muscles (obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center, lines BDSC_257750, BDSC_8165, BDSC_8816, BDSC_25756, respectively). If necessary, lines were treated

for the intracellular parasite *Wolbachia*, which affects lifespan, development, and metabolism of *Drosophila*, several generations before use in experiments.

The level of *stc* knockdown in experimental specimens and its effect on the expression of potential *Stc* targets were verified using qPCR with SYBR Green I in a MiniOpticon system (Bio-Rad, USA). The significance of differences in mRNA quantities was assessed using ANOVA.

Lifespan was measured in virgin flies of one sex, placed five per vial with standard medium containing sugar, yeast, raisins, and semolina, at a temperature of 25°C and humidity of 60 %, with a 12-hour light/dark cycle. The registration of dead individuals was carried out daily, and live flies were transferred to fresh food weekly. Statistical significance of differences between survival curves was assessed using the Mann-Whitney test, and late effects were evaluated using the Fleming-Harrington test. Calculations were performed in the OASIS 2 program [3]. Bonferroni correction was applied for multiple comparisons.

Locomotion was measured every ten days in 25 mm diameter tubes containing five virgin flies of the same sex/age/genotype, placed horizontally in a *Drosophila* Population Monitor (TriKinetics, USA). The significance of differences between mean values of the total fly crossings of three LED rings within five minutes was determined using ANOVA.

Results: Given that in *Drosophila*, *Stc* has been described as a neuronal transcription factor [1], we analyzed the impact of pan-neuronal *stc* knockdown on lifespan. This knockdown resulted in a 13–15 % reduction in male lifespan ($P < 0.0001$). We investigated the effects of selective *stc* knockdown in the embryonic nervous system and found that it increased the adult male lifespan by 12 % ($P < 0.0001$). Moreover, the mobility of these males was comparable to the controls, and at the age of forty days, it even surpassed that of the controls ($P = 0.004$), indicating the maintenance of good functional status of the nervous and motor systems. Thus, it can be hypothesized that, unlike the pan-neuronal knockdown, selective knockdown in the nervous system during the embryonic stage is beneficial, suggesting that *stc* knockdown specifically in adults may have a negative impact. Based on the known function of *stc* in motor neuron development, we examined the effect of selective knockdown in motor neurons and found that it did not significantly affect male lifespan ($P = 0.795$). The question of which neurons are responsible for the reduced lifespan with pan-neuronal *stc* knockdown remains still open.

To identify potential targets of the *Stc* transcription factor that might contribute to lifespan extension, we analyzed transcriptome changes resulting from *stc* knockdown in the embryonic nervous system and validated these findings using qPCR. Among the identified targets were genes involved in nervous system development (*N*, *Nej*, *Unc-115a*). Additionally, several genes involved in muscle system development, particularly the *Mhc* gene encoding one of the myosin subunits, were identified as possible *Stc* targets. Considering this, we studied the impact of *stc* knockdown in myocytes on lifespan. It was found that selective reduction of *stc* expression in male muscles increased their lifespan by 19 % ($P < 0.0001$).

Conclusion: We have shown that selective knockdown of the neuronal transcription factor *Stc* in the embryonic nervous system of *Drosophila* results in an increased healthspan of the imago while maintaining a high functional status of the nervous and muscular systems. Additionally, reducing the expression of *Stc* in muscle cells positively

affects lifespan. Potential targets of Stc mediating these effects include several genes involved in nervous system development, as well as the primary muscle protein myosin. *Funding:* The work was carried out within the state assignment of NRC “Kurchatov Institute”.

Список литературы/References

1. Stroumbakis N.D., Li Z., Tolias P.P. A homolog of human transcription factor NF-X1 encoded by the *Drosophila shuttle craft* gene is required in the embryonic central nervous system. *Mol Cell Biol.* 1996;16(1):192-201. doi 10.1128/MCB.16.1.192
2. 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. doi 10.1242/dev.118.2.401
3. Han S.K., Lee D., Lee H. et al. OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget.* 2016;7(35):56147-56152. doi 10.18632/oncotarget.11269