

На правах рукописи

МИЛЯЕВА Полина Андреевна

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
В СОМАТИЧЕСКИХ И ГЕНЕРАТИВНЫХ ТКАНЯХ
У *DROSOPHILA MELANOGASTER***

1.5.7 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2024

Работа выполнена в лаборатории генетики животных Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

Научный

руководитель:

НЕФЕДОВА Лидия Николаевна

доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры генетики Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

**Официальные
оппоненты:**

ПАСЮКОВА Елена Генриховна

доктор биологических наук, профессор, начальник лаборатории геномной изменчивости Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва

КУЛИКОВ Алексей Михайлович

доктор биологических наук, заведующий лабораторией эволюционной генетики развития, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, г. Москва

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д 002.214.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3. Тел: (499) 135-62-13, факс: (499) 132-89-62, e-mail: dissovet@vigg.ru. С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

И.И.Горячева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Drosophila melanogaster является одним из основных модельных объектов генетики, на котором активно ведутся исследования мобильных элементов и их роли в различных генетических процессах. Мобильные элементы занимают около 14% генома дрозофилы, и большая их часть представлена ретротранспозонами. Поскольку ретротранспозоны занимают значительное место в геноме, их транскрипция не может не оказывать влияние на общую архитектуру транскриптома. С одной стороны, транскрипция ретротранспозонов может приводить к их транспозиции и, как следствие, к геномным перестройкам, с другой стороны – к изменению экспрессии близлежащих генов. Таким образом, чрезмерная активация транскрипции ретротранспозонов может быть опасной для организма, а потому строго контролируется со стороны хозяйского генома. Один из наиболее изученных механизмов регуляции транскрипции ретротранспозонов – система piРНК интерференции (Saint-Leandre et al., 2020). Однако несмотря на большое количество информации, известной о системе piРНК-интерференции, полностью этот процесс до конца не изучен, и остается еще очень много нерешенных вопросов. В частности, не до конца понятна роль сплайсинга предшественников piРНК в регуляции активности ретротранспозонов.

Известно, что помимо зависимости от функциональности системы piРНК-интерференции, экспрессия ретротранспозонов может зависеть и от средовых условий, в частности, стресса, вызываемого абиотическими факторами. В связи с этим важной задачей является поиск факторов, влияющих на экспрессию ретротранспозонов, и изучение механизмов их влияния. В отдельных случаях причины стресс-активации транскрипции ретротранспозонов уже изучены. Так, при тепловом шоке изменение работы системы piРНК-интерференции могут быть вызваны активацией экспрессии белков Hsp83, Hsc70-4 и Hsp70 (Bodelón et al, 2023; Carrucci et al, 2019). Другая причина стресс-активации транскрипции ретротранспозонов – пассивная коактивация транскрипции за счет геномного окружения (Lanciano and Cristofari, 2020). Есть данные об активации транскрипции ретротранспозонов транскрипционными факторами, активирующимися при стрессе (Oliveira et al, 2021). Таким образом, механизмы ответа на стресс и транскрипция ретротранспозонов являются взаимозависимыми механизмами, однако точные причины связи между ними до сих пор не установлены.

Степень разработанности проблемы

Регуляция экспрессии ретротранспозонов с помощью piРНК-интерференции широко распространена среди животных. У самок дрозофилы контроль экспрессии ретротранспозонов в соматических тканях яичников происходит за счёт транскрипционного сайленсинга и гетерохроматинизации участков ДНК, содержащих последовательности мобильных элементов, в то время как в клетках зародышевого пути (питающие клетки яичников) идут процессы как

транскрипционного, так и посттранскрипционного подавления мобильных элементов (Théron et al., 2014). Источниками рiРНК являются протяженные скопления мобильных элементов – кластеры (Yamanaka et al., 2014). У дрозофилы кластеры делятся на два типа: одноцепочечные (например *flamenco*), транскрипция которых начинается с канонического сайта, и двуцепочечные (например *42AB*), которые не имеют собственных промоторов и транскрибируются с неканонических сайтов за счёт распознавания их белком семейства Hp1, Rhino (Wei et al., 2021). Вне зависимости от способа биогенеза рiРНК связывает белок PIWI, он же индуцирует сайленсинг на уровне транскрипции. Согласно последним исследованиям, система рiРНК принимает участие, как в регуляции некоторых генов, так и участвует в процессе онтогенеза. Особый интерес представляет изучение роли рiРНК в формировании нервной системы у дрозофилы и других животных (Kim, 2019; Wakisaka et al., 2019).

Помимо внутренних факторов на экспрессию мобильных элементов могут также влиять и внешние. Этой области посвящена масса работ по индукции экспрессии мобильных элементов в условиях стресса, как у дрозофилы, так и у других живых организмов, включая табак, рис, арабидопсис и нематоду (Feschotte et al., 2002; Hwang et al., 2019; Mhiri et al., 1997; Wessler, 1996). Индукция активности мобильных элементов может не только приводить к возникновению новых мутаций, но и влиять на транскриптом клетки хозяина. Предполагается, что индукция транскрипции отдельных мобильных элементов может происходить как за счёт активации транскрипции геномного окружения, так и за счёт привлечения определённых транскрипционных факторов, активирующихся в ответ на стресс (Arnault et al., 1991; Horváth et al., 2017; Junakovic et al., 1986; Ratner et al., 1992; Vázquez et al., 2007).

Для исследования детальных механизмов регуляции экспрессии ретротранспозонов у *D. melanogaster* целесообразно использовать мутантные линии с нарушением контроля транспозиции, такие как SS (фенотип *flamenco*), и выключением функции основных участников рiРНК-интерференции – генов *piwi* и *rhino*.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы являлось исследование влияния экзогенных факторов и мутаций в ключевых генах рiРНК-интерференции на экспрессию ретротранспозонов у *D. melanogaster*.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать влияние фенотипа *flamenco* в линии SS на экспрессию ДКП-ретротранспозонов, LINE-элементов и кластеров рiРНК в тканях яичников, корпуса, головы самок имаго и ЦНС личинок.

2. Охарактеризовать влияние нокдауна *rhino* на экспрессию отдельных ретротранспозонов и кластеров рiРНК в тканях яичников, головы и корпуса самок дрозофилы.
3. Охарактеризовать влияние отсутствия функции *piwi* на экспрессию отдельных ретротранспозонов и кластеров рiРНК в тканях яичников, головы и корпуса самок дрозофилы.
4. Проанализировать влияние окислительного и хронического теплового стресса на экспрессию ДКП-ретротранспозонов и кластеров рiРНК в линии SS с фенотипом *flamenco* и линии дикого типа *Canton-S*.
5. Оценить влияние геномной локализации копий ДКП-ретротранспозонов на их тканеспецифичную и стресс-индуцируемую экспрессию.
6. Провести анализ последовательностей 5'-нетранслируемых областей ДКП-ретротранспозонов на наличие сайтов, влияющих на активацию транскрипции.

Научная новизна полученных результатов

Работа направлена на изучение механизмов регуляции ретротранспозонов при геномном стрессе и стрессе, вызванном абиотическими факторами, у *D. melanogaster*. Впервые было проанализировано геномное окружение мобильных элементов у дрозофилы по результатам полногеномного нанопорового секвенирования и была произведена проверка влияния геномного окружения на экспрессию ретротранспозона *Tirant* в условиях стресса.

Также было впервые продемонстрировано влияние мутации гена *piwi* на экспрессию ретротранспозонов в соматических тканях и проведён анализ связи гена *piwi* и особенностей транскрипции и процессинга одноцепочечных и двуцепочечных кластеров рiРНК. Помимо этого, была проанализирована экспрессия мобильных элементов в соматических тканях при нокдауне гена *rhino*, и было показано, что экспрессия некоторых ретротранспозонов зависит от этого гена не только в тканях яичников, но и в соматических тканях. Также было показано, что сплайсинг и транскрипция некоторых кластеров рiРНК также зависит от *rhino* в соматических тканях, в частности, в нервной системе.

Впервые была охарактеризована экспрессия ретротранспозонов и кластеров в линии с нарушением контроля транспозиции SS в соматических тканях самок, а также центральной нервной системе личинок третьего возраста и проанализировано влияние эндогенных факторов на тканеспецифичную экспрессию ретротранспозонов.

Положения, выносимые на защиту

1. Система рiРНК-интерференции определяет уровень экспрессии ретротранспозонов не только в генеративных, но и в соматических тканях. Другие механизмы регуляции ретротранспозонов не могут обеспечить подавление экспрессии ретротранспозонов в соматических тканях у имаго при наличии мутаций *piwi* либо при нокдауне *rhino*.
2. Процессинг транскриптов кластеров рiРНК зависит от генов *rhino* и *piwi* не только в генеративных, но и в соматических тканях.
3. Экспрессия ретротранспозонов в отдельных тканях, а также во время стресса не зависит от положения отдельных копий в геноме, а определяется

структурой их регуляторных областей и функциональностью системы рiРНК-интерференции.

Научно-практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в исследовании механизмов контроля транспозиции при геномном стрессе и стрессе, вызванном абиотическими факторами. Особый интерес представляет исследование причин активации мобильных элементов при стрессе, вызванном абиотическими факторами. В работе показано, что основной причиной активации транскрипции исследуемых в работе мобильных элементов служат транскрипционные факторы, которые экспрессируются в определённых средовых условиях, а также функциональность процессинга транскриптов кластеров рiРНК.

Проблема регуляции активности мобильных элементов является широко исследуемой темой в связи с потенциальным мутационным эффектом транспозиции, которая может приводить к различным онкологическим заболеваниям. В работе продемонстрирован вклад различных факторов, влияющих на экспрессию ретротранспозонов и исследована работа отдельных компонентов рiРНК-интерференции в соматических тканях за пределами гонад. Показана связь генов *piwi* и *rhino*, одних из главных участников биогенеза рiРНК, и кластеров рiРНК-интерференции в соматических тканях. Эти результаты дополняют представления о механизмах регуляции ретротранспозонов и могут быть применены как для исследований в области создания механизмов репрессии онкологических процессов, генотоксикологии и процессов регенерации у животных, так и в дальнейших исследованиях ретротранспозонов с последующим созданием новых систем генно-инженерных конструкций, индуцируемых внешними условиями.

Таким образом, результаты работы представляют теоретическую значимость, заключающуюся в детальном исследовании закономерностей регуляции отдельных ретротранспозонов в генеративных и соматических тканях, а также механизмов влияния абиотических стрессов на стабильность генома.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена статистической достоверностью наблюдаемых эффектов, их воспроизведением в независимых опытах.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях «Дрозофила 2020», Гатчина, 2020; «Актуальные проблемы биологии развития», Москва, 2021; «Ломоносов-2022», Москва, 2022; «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology», Novosibirsk, 2022; «Дрозофила 2023», Гатчина, 2023.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них статей в рецензируемых журналах, соответствующих Перечню ВАК – 5, тезисов докладов и материалов конференций – 5.

Личный вклад автора

Личный вклад Миляевой П.А. заключается в выполнении каждого этапа работы: анализе современной тематической литературы, подборе биологического материала и его культивировании, постановке отдельных задач для достижения цели работы, пробоподготовке и обработке полученных результатов соответствующими статистическими методами и современными программами. Полученные данные были интерпретированы автором и представлены в статьях и докладах на конференциях.

Структура и объём работы

Диссертационная работа выполнена на 152 страницах, содержит 35 рисунков, 5 таблиц, состоит из разделов Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы. Библиография работы содержит 186 источников. Приложение содержит 33 страницы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В этой главе произведено теоретическое обобщение научной литературы, посвящённой систематике и экспрессии ретротранспозонов в нормальных условиях, при нарушении контроля транспозиции и при стрессе. Показана роль основных генов *piRNA*-интерференции, *rhino* и *piwi* в регуляции процессинга транскриптов кластеров *piRNA*, а также роль отдельных компонентов системы *piRNA*-интерференции в регуляции экспрессии ретротранспозонов в соматических тканях. Показаны влияние различных видов стресса на экспрессию ДКП-ретротранспозонов и значимость поиска причин их стресс-индуцируемой экспрессии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *D. melanogaster*:

Canton-S – линия дикого типа.

SS – линия с нарушением контроля транспозиции *gypsy* (фенотип flamenco)

w^{1118} – линия без конструкции со шпилькой для нокдауна гена *rhino*.

tubP-Gal4 ($y^1 w^{1118}$; $P\{w^{+mC}=\text{tubP-GAL4}\}LL7$ $P\{\gamma^{+t7.2}=\text{neoFRT}\}82B/ТМ6B$, Tb^1) линия-драйвер использована для активации экспрессии конструкции со шпилькой для нокдауна гена *rhino* (из коллекции Института биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН).

rhi ($P\{KK105237\}VIE-260B$) линия с конструкцией со шпилькой для нокдауна гена *rhino* (из коллекции Института молекулярной генетики РАН).

piwi² – (w^{1118} ; $P\{\gamma^{+t7.2}=\gamma^{11}\}piwi^2/CyO$, $P\{w^{+mC}=\text{ActGFP}\}JMR1$) гетерозиготна по мутации, вызванной инсерцией Р-элемента в 4-й экзон гена *piwi* (из коллекции Института молекулярной генетики РАН).

piwi³ – ($P\{\gamma^{+t7.2}=\text{PZ}\}piwi^{06843}$ cn^1/CyO ; γ^{506}) гетерозиготна по мутации, вызванной инсерцией Р-элемента в 1-й экзон гена *piwi* (из коллекции Института молекулярной генетики РАН).

Индукцию окислительного стресса проводили с помощью персульфата аммония, инкубируя семядневных самок на среде с персульфатом аммония 0,1М в течение 24 ч. Наличие стресса проверяли по повышению экспрессии генов-маркеров окислительного стресса *upd3*, *hsp22*, *sid*.

Индукцию «хронического теплового» стресса проводили, выращиванием и содержанием мух в термостате при 29°C. Наличие стресса определяли по потере плодовитости у самцов.

Количество транскриптов определяли методом количественной ПЦР, используя MiniOpticon Real-Time PCR System и программу CFX Manager (версия 1.6.541.1028). Каждый эксперимент был выполнен в 3-6 биологических повторностях.

Статистический анализ экспрессии генов проводили с помощью теста Манна – Уитни.

Для секвенирования линии SS использовали ДНК, полученную стандартным методом выделения ДНК из мух с Desc, методику подготовки библиотек от Oxford Nanopore, и секвенатор Oxford Nanopore MiniION.

Поиск инсерций ретротранспозонов проводили с помощью двух подходов с использованием библиотеки ретротранспозонов из базы данных BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) (Kaminker et al., 2002): для общих инсерций использовали функцию blast в базе данных FlyBase, найденные результаты проверяли по выравниванию результатов нанопорового секвенирования линий Canton-S (SRR11460803) и линии SS; для поиска уникальных для линий инсерций использовали программу TLDRTLDR (Transposons from long DNA reads) (Ewing et al., 2020).

Поиск сайтов связывания транскрипционных факторов проводили с помощью программы LASAGNA (Lee and Huang, 2013) с использованием 5'НТО аннотированных последовательностей ретротранспозонов. О возможном наличии сайта связывания делали вывод, основываясь на результатах выравнивания последовательностей уникальных для линий SS и Canton-S последовательностей ретротранспозонов исходя из того, что уникальные для линий последовательности ретротранспозонов, вероятно, претерпевали транспозицию относительно недавно, и, следовательно, имеют наиболее функциональные сайты связывания транскрипционных факторов в 5'НТО.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние нарушения контроля транспозиции на экспрессию ретротранспозонов и кластеров рiРНК

Ранее в нашей лаборатории была получена линия SS, характеризующаяся нарушением контроля транспозиции активных копий ДКП-ретротранспозона *gypsy* (Ким и др., 1989). Эта линия демонстрирует сниженную экспрессию гена *rhino*, что коррелирует с наличием большего количества сплайсированных форм кластера *flamenco*, который контролирует *gypsy* (Лавренов и др., 2014). Однако на сегодняшний день считается, что *rhino* контролирует транскрипцию только двуцепочечных кластеров, к которым *flamenco* не относится. Линия SS

была секвенирована, показано, что в геноме отсутствуют нонсенс-мутации в генах системы рiРНК-интерференции (Кукушкина и др., 2020). Кроме этого, в ходе нашей работы было выявлено, что линия SS обладает повышенной устойчивостью к стрессу, вызванному борной кислотой (Миляева, Нефедова, 2022). Таким образом, причины нарушения контроля транспозиции ДКП-ретротранспозона *gypsy* в линии SS не выяснены. Комплексный фенотип линии мы назвали *flamenco*.

Влияние фенотипа *flamenco* на экспрессию ретротранспозонов

Ранее в нашей лаборатории было сделано предположение, что накопление сплайсированных форм транскриптов *flamenco* у линии SS связано со скоростью протекания дальнейших этапов процессинга транскриптов в рiРНК. Так как нарушение дальнейшего процессинга транскриптов кластера *flamenco* может приводить к накоплению сплайсированных форм транскриптов других кластеров, мы проанализировали влияние фенотипа *flamenco* линии SS на экспрессию ретротранспозонов, которые могут контролироваться как одноцепочечными, так и двуцепочечными кластерами. Так как линии SS и Canton-S нельзя сравнивать по экспрессии ретротранспозонов, мы провели анализ экспрессии в соматических тканях относительно экспрессии в тканях яичников и выявили паттерны экспрессии ретротранспозонов для каждой линии. Мы обнаружили, что паттерны экспрессии ДКП-ретротранспозонов между линиями практически не различаются: *gypsy* экспрессируется преимущественно в ЦНС личинки и голове самок имаго, *copia*, *blood* демонстрируют максимальную экспрессию в голове и корпусе имаго, а *Tirant* экспрессируется преимущественно в яичниках. При этом мы наблюдали подавление экспрессии ДКП-ретротранспозонов в яичниках и частично в ЦНС личинки вне зависимости от группы, к которой они принадлежат. В целом, паттерн экспрессии ДКП-ретротранспозонов не зависит от наличия фенотипа *flamenco* (Рис.1).

Аналогичную картину экспрессии мы выявили для LINE-элементов. При этом LINE в линии SS демонстрируют тканеспецифичную экспрессию в голове и корпусе (Рис.2). Так как экспрессия LINE контролируется механизмом, который отвечает за процессинг двуцепочечных кластеров (Cui et al., 2021), мы проанализировали, как фенотип *flamenco* отражается на процессинге транскриптов обоих типов кластеров.

Влияние фенотипа *flamenco* на экспрессию кластеров рiРНК

Мы измерили экспрессию сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов двуцепочечного кластера *42AB* и одноцепочечного кластера *flamenco*. Кластеры рiРНК у линий SS и Canton-S отличаются по экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов. Мы обнаружили, что у линии SS есть нарушение в процессинге транскриптов обоих кластеров. (Рис.3).

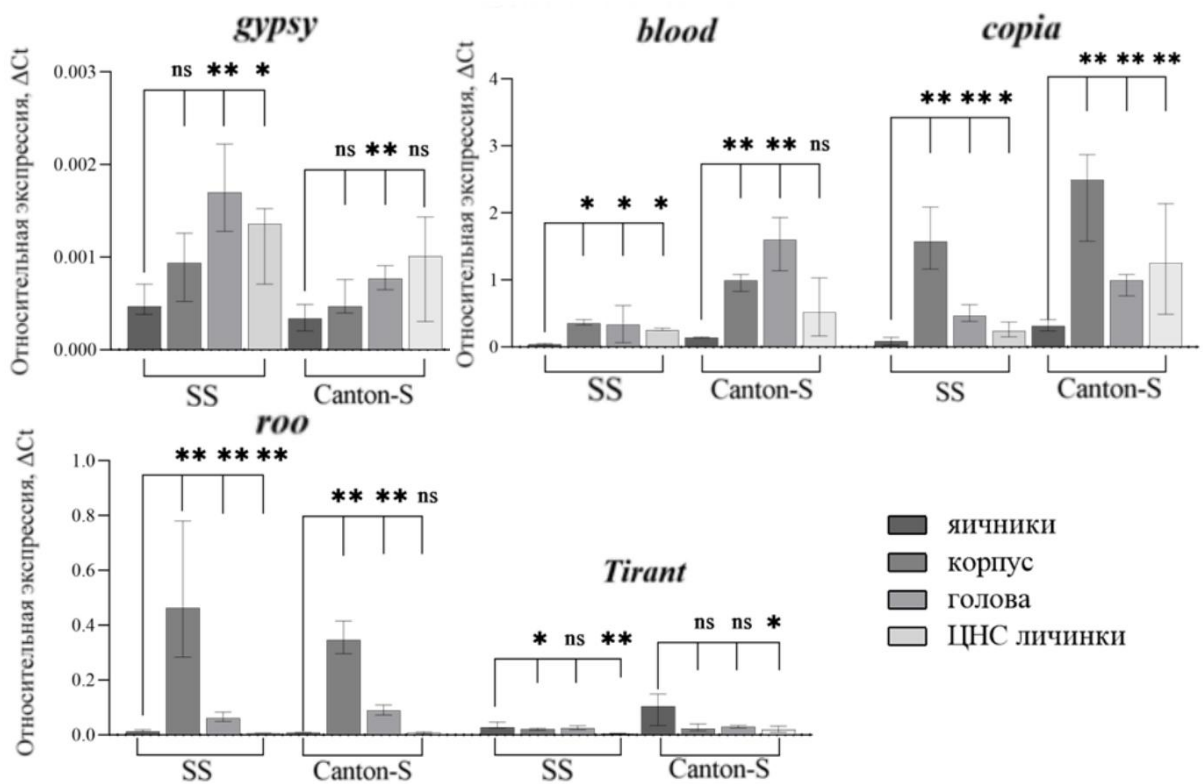


Рисунок 1 — Относительная экспрессия ДКП-ретротранспозонов *blood*, *copia*, *gypsy*, *roo*, *Tirant* в тканях яичников, корпусов, головы самок и ЦНС личинок SS и Canton-S. Здесь и на всех последующих рисунках достоверность различия, тест Манна-Уитни * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$, **** - $p < 0.0001$, ns, not significant – статистически не значимое изменение.

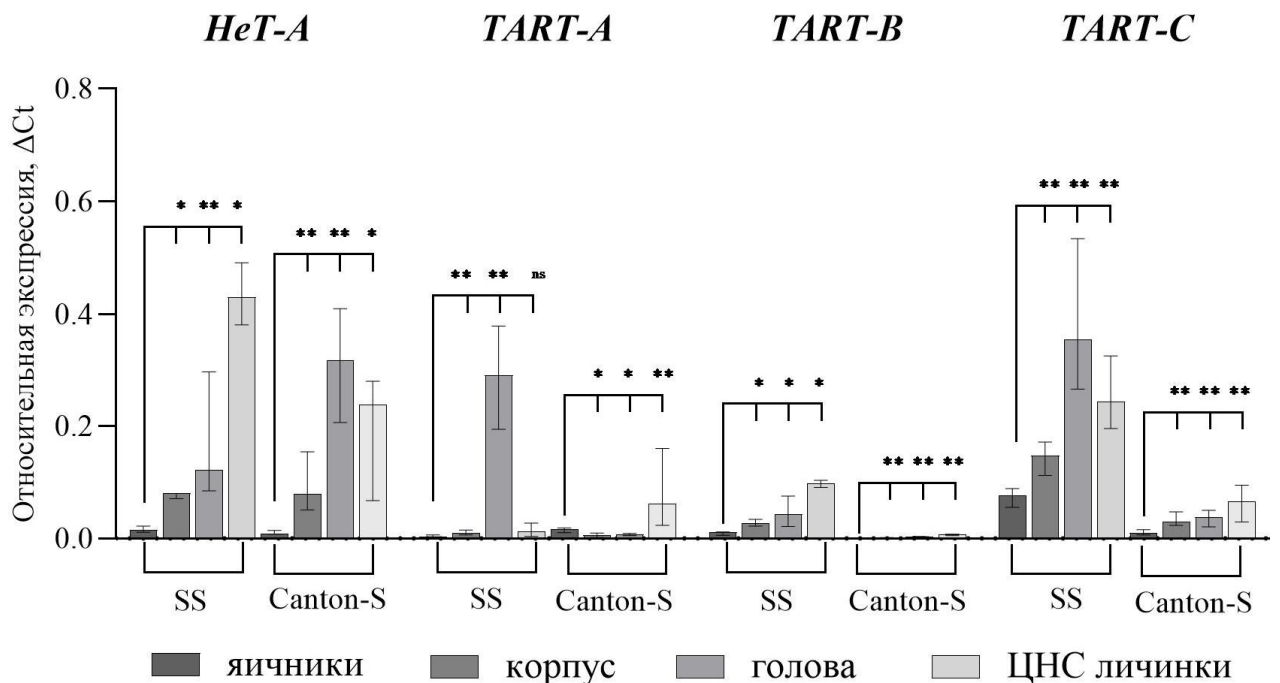


Рисунок 2 — Относительная экспрессия LINE *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и *HeT-A* в тканях яичников, корпусов, головы самок и ЦНС личинок SS и Canton-S.

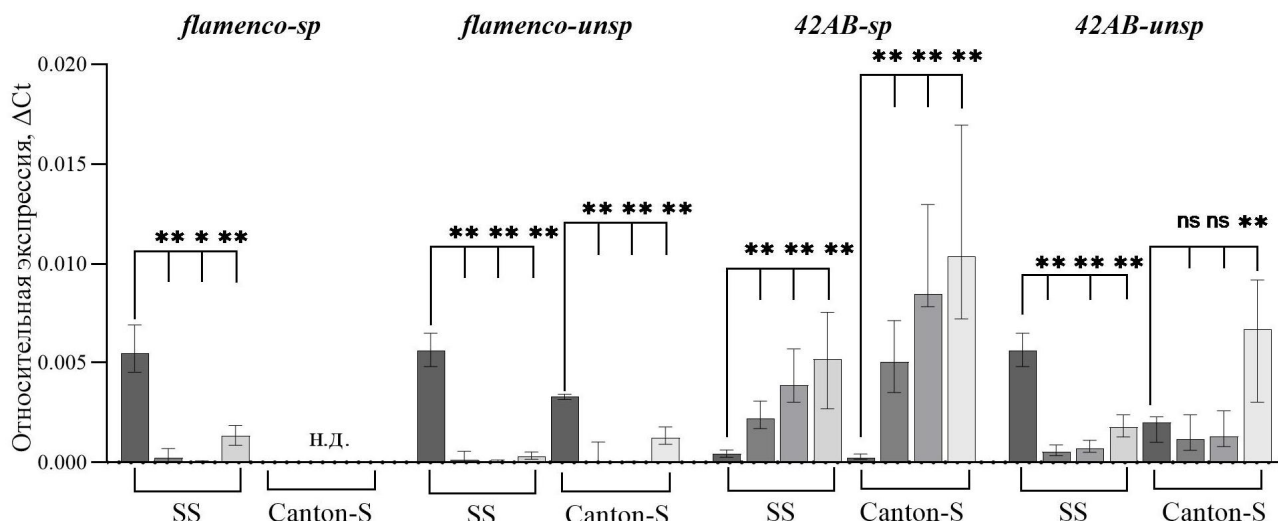


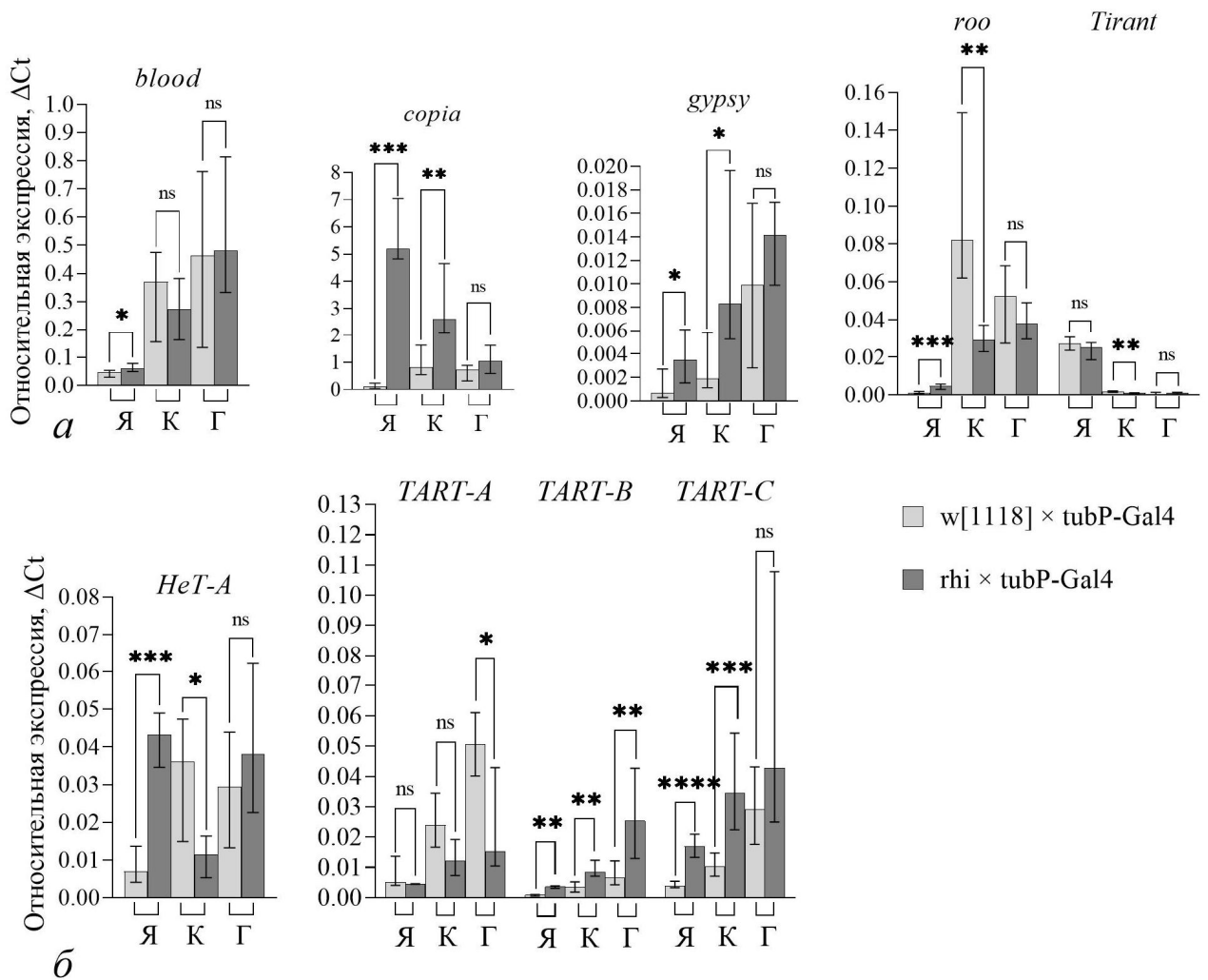
Рисунок 3 — Относительная экспрессия сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов кластеров *flamenco* и *42AB* в тканях яичников, корпусов, головы самок и ЦНС личинок SS и Canton-S.

Также мы наблюдали, что сплайсированные формы кластера *42AB*, в отличие от *flamenco*, на высоком уровне экспрессируются в соматических тканях обеих линий. По одной из современных гипотез его транскрипты могут процессироваться системой siРНК-интерференции, однако, мы видим, что и ретротранспозоны высоко экспрессируются в соматических тканях (Chung et al, 2008). В связи с этим мы делаем вывод, что одной только системой РНК-интерференции экспрессия ретротранспозонов в соматических тканях не определяется, и существуют причины, по которым экспрессия ретротранспозонов повышена за пределами гонад.

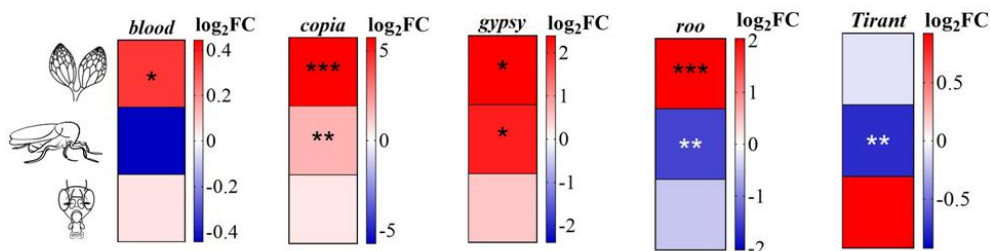
Влияние нокдауна *rhino* на экспрессию ретротранспозонов

Белок *Rhino* распознаёт гетерохроматиновые метки, маркирующие кластеры piРНК, и служит основой комплекса RDC (Rhino-Deadlock-Cutoff) (Wei et al., 2021). Благодаря этому комплексу часть транскриптов двуцепочечных кластеров, но не все, избегают сплайсинга. Однако, зная, что в линии SS снижение экспрессии *rhino* коррелирует с накоплением сплайсированных форм транскриптов *flamenco*, мы проанализировали, как снижение экспрессии *rhino* в независимом эксперименте повлияет на экспрессию ретротранспозонов и кластеров piРНК.

Мы измерили экспрессию ретротранспозонов в гибридах с нокдауном *rhino* относительно контроля. При нокдауне *rhino* генерализованно повышается экспрессия большинства ретротранспозонов, кроме *Tirant*, в яичниках. Таким образом, *rhino* контролирует экспрессию отдельных ретротранспозонов и за пределами гонад. Примечательно, что среди ретротранспозонов, отвечающих повышением экспрессии на снижение экспрессии *rhino*, присутствует *gypsy*, контролируемый кластером *flamenco* (Рис.4).



ДКП-ретротранспозоны



LINE

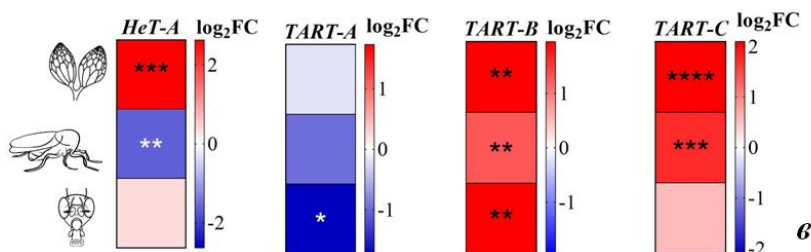


Рисунок 4 — Изменение тканеспецифичной экспрессии ретротранспозонов при нокадауне *rhino* относительно контроля. а – ДКП-ретротранспозоны; б – LINE-элементы; в – изменение тканеспецифичной экспрессии ретротранспозонов при нокадауне *rhino* относительно контроля. Здесь и далее FC – Fold Change – кратность изменения экспрессии, Я – яичники, К – корпус, Г – голова.

Влияние нокдауна *rhino* на экспрессию кластеров рiРНК

Далее мы проанализировали экспрессию кластеров *flamenco* и *42AB* на фоне сниженной экспрессии *rhino*. В норме в клетке присутствуют сплайсированные и несплайсированные формы транскриптов кластеров рiРНК, частичное отсутствие сплайсинга необходимо для сохранения антисмысловых по отношению к мРНК ретротранспозонов участков транскриптов.

Количество несплайсированных форм кластера *42AB* у линии *SS*, наоборот, повышено в яичниках. Учитывая, что экспрессия LINE зависит от пути процессинга транскриптов рiРНК двуцепочечных кластеров, который, вероятно, нарушен у линии *SS*, мы наблюдаем эффект от нарушения этого пути. Мы обнаружили, что снижение экспрессии *rhino* ведёт к повышению экспрессии сплайсированных форм транскриптов обоих кластеров, т.е. не только двуцепочечного *42AB*, но и одноцепочечного *flamenco*, что позволяет нам сделать вывод о влиянии нокдауна *rhino* на сплайсинг *flamenco*. Однако на экспрессии рiРНК *11620* из сплайсируемого интрона кластера *flamenco* снижение экспрессии *rhino* не сказывается. Таким образом, накопление спайсированных форм *flamenco* самих по себе недостаточно для снижения уровня рiРНК. Кроме этого, мы обнаружили, что *rhino* контролирует процессинг транскриптов *42AB* не только в яичниках, но и в соматических тканях.

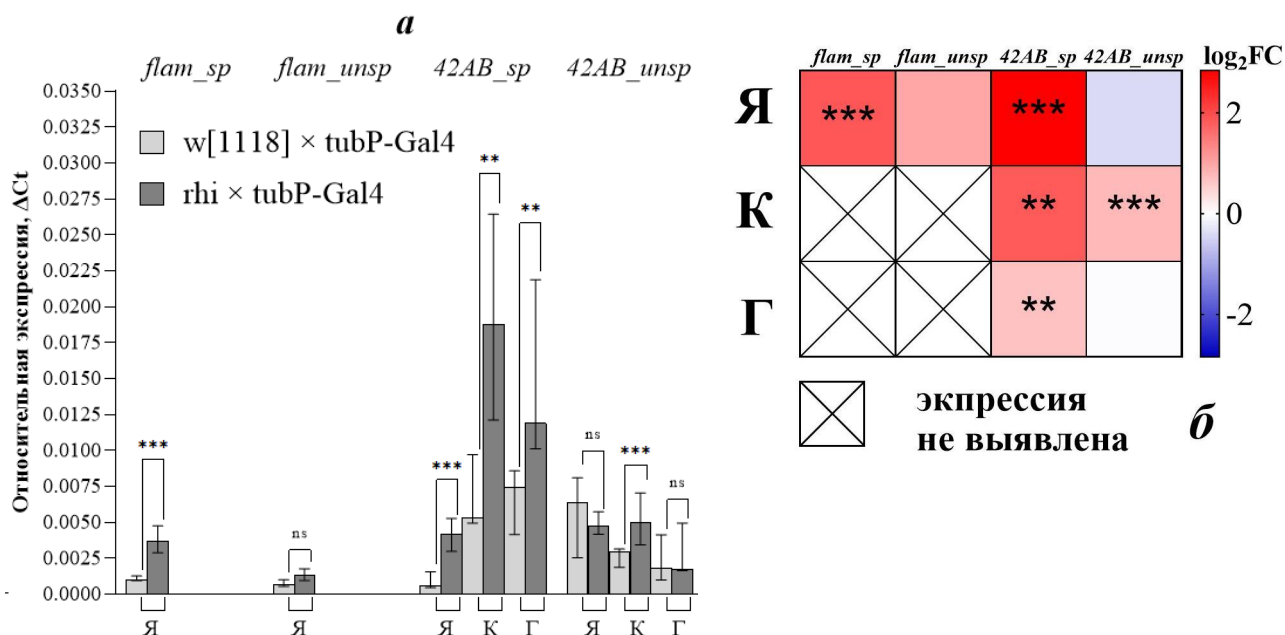


Рисунок 5 — Изменение тканеспецифичной экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов кластеров рiРНК при нокдауне *rhino* относительно контроля. а – Относительный уровень транскрипции спласированных и несплайсированных форм кластеров *flamenco* и *42AB*; б — изменение тканеспецифичной экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов кластеров рiРНК при нокдауне *rhino* относительно контроля.

Влияние мутации *piwi* на экспрессию ретротранспозонов

Белок PIWI отвечает за индукцию гетерохроматинизации участков генома, содержащих экспрессирующиеся копии ретротранспозонов. Для правильного выполнения своей функции PIWI необходимо связываться с piРНК (Zhang et al., 2018). Таким образом, отсутствие функции PIWI должно приводить к нарушению процессинга транскриптов кластеров. Две применяемые мутации *piwi*² и *piwi*³ отличаются степенью повреждения функции белка: *piwi*² влияет на функцию PIWI больше, чем *piwi*³, так как гомозиготы *piwi*² *piwi*² не выживают. Чтобы учесть влияние материнского эффекта, мы провели реципрокные скрещивания.

Поскольку яичники в исследуемых гибридах нефункциональны и имеют измененный состав тканей, мы проводили анализ на соматических тканях гибридов от двух реципрокных скрещиваний относительно родительских самок. Мы выявили, что при отсутствии функции *piwi*, в отличие от *rhino*, не наблюдается генерализованного ответа, и в соматических тканях происходит повышение экспрессии отдельных ретротранспозонов - *gypsy* и *copia*, таким образом, от функции гена *piwi* зависит экспрессия этих ретротранспозонов в соматических тканях (Рис.6). Мы обнаружили, что при отсутствии функции *piwi*, снижается экспрессия LINE в соматических тканях. Таким образом, от функции *piwi* зависит экспрессия LINE в соматических тканях (Рис.6).

Влияние мутации *piwi* на экспрессию кластеров piРНК

Мы обнаружили, что при компаунде мутаций *piwi* количество сплайсированных форм кластера *42AB* увеличивается в соматических тканях (Рис.7). Это может быть связано как с накоплением сплайсированных форм, в связи с невозможностью их утилизации PIWI, так и с тотальным нарушением поддержания стволовых клеток, в которых *piwi* работает наиболее активно (Sousa-Victor et al., 2017).

Таким образом, проанализировав три примера нарушения работы системы piРНК-интерференции, мы выявили, что при отсутствии функции генов *piwi* и *rhino* происходит изменение не только процессинга транскриптов кластеров piРНК, но и экспрессии ретротранспозонов. При фенотипе *flamenco* мы видим нарушение процессинга транскриптов обоих типов кластеров и повышенную экспрессию LINE, но не ДКП-ретротранспозонов, причём, ретротранспозоны обладают тканеспецифичной экспрессией.

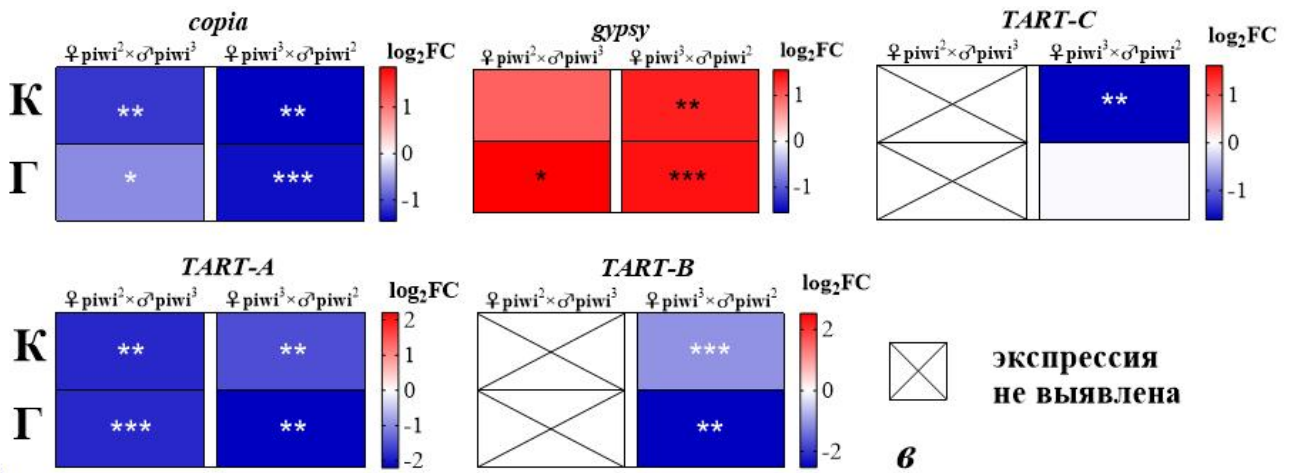
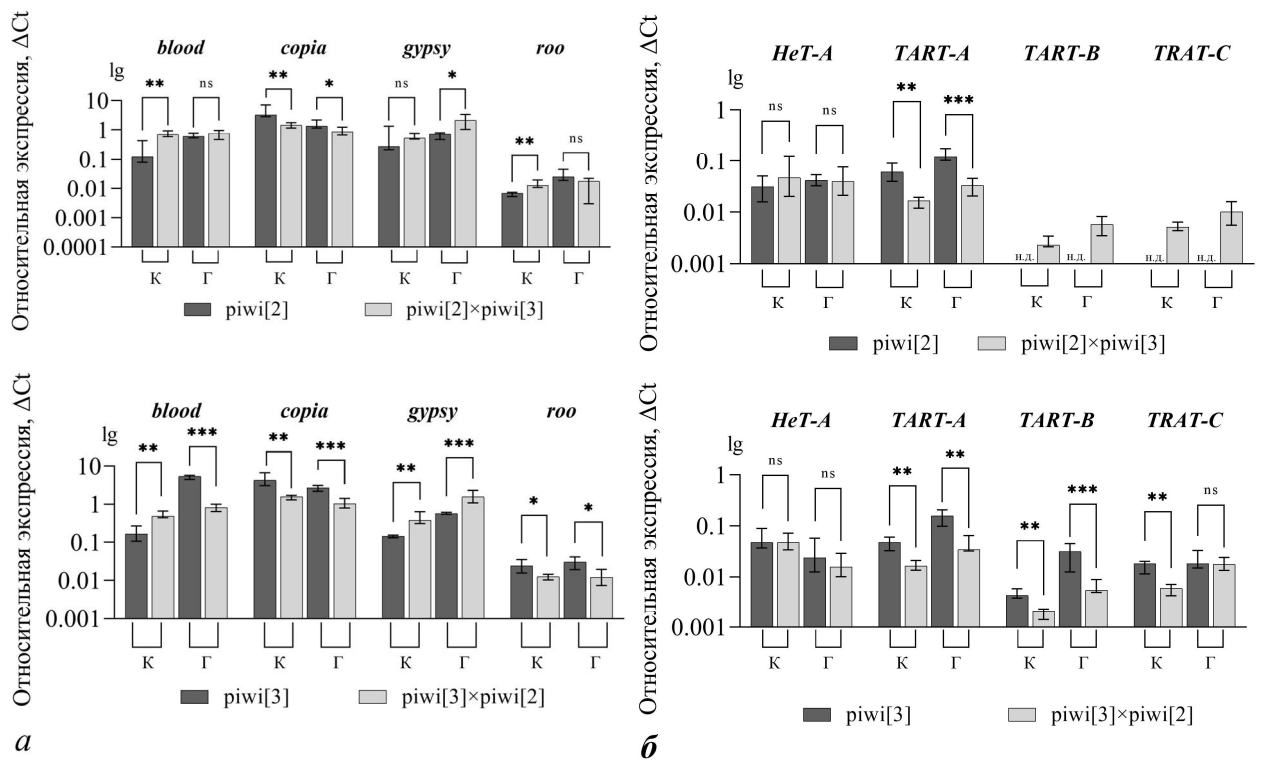


Рисунок 6 — Логарифм относительной экспрессии ДКП-ретротранспозонов (а) и LINE-элементов (б) в тканях корпуса и головы самок линий *piwi[2]* и *piwi[3]*, а также самок F_1 . в — Относительная экспрессия ретротранспозонов в соматических тканях гибридов $piwi^2/piwi^3$ и $piwi^3/piwi^2$ относительно родительских самок.

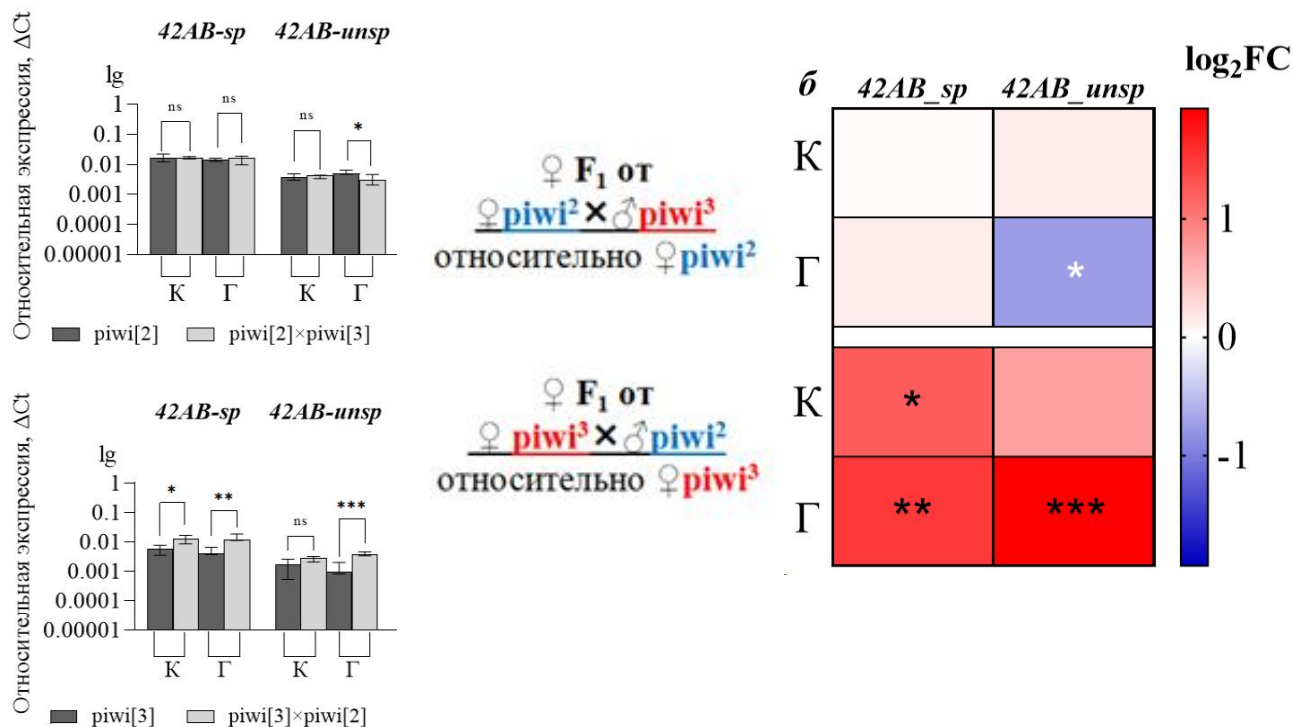


Рисунок 7 — Логарифм относительной экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм 42AB в тканях корпуса и головы самок линий piwi[2] и piwi[3], а также самок F₁ (a) и экспрессия сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов кластера piRNA 42AB в соматических тканях гибридов piwi²/piwi³ и piwi³/piwi² относительно родительских самок (б).

Влияние стрессового воздействия на экспрессию ретротранспозонов и кластеров piRNA

Так как система piRNA-интерференции может быть подвержена влиянию стресса мы проанализировали экспрессию ретротранспозонов и кластеров в линии SS и Canton-S в стрессовых условиях, учитывая, что линия SS устойчива к стрессу, вызванному борной кислотой.

Влияние окислительного стресса на экспрессию ДКП-ретротранспозонов

При окислительном стрессе, вызванном персульфатом аммония, мощным индуктором окислительного стресса и стресса эндоплазматического ретикулума, что показано ранее в нашей лаборатории (Makhnovskii et al, 2020), мы наблюдали изменение экспрессии всех исследуемых ДКП-ретротранспозонов: *gypsy*, *copia*, *springer* и *Tirant* (данный набор ретротранспозонов был выбран по предварительным экспериментам). При этом экспрессия отдельных ретротранспозонов поддерживается на высоком уровне до 48 ч после снятия стрессового воздействия (Рис.8).

Эффект повышенной экспрессии ретротранспозонов после снятия стрессового воздействия наблюдали и другие исследователи в аналогичных экспериментах, причём по их наблюдениям это коррелировало с изменением локализации белка Hsp70. Во время стресса он располагается в области процессинга piRNA – Нуаж – и остаётся в этой области до 48 часов после снятия стресса (Carrucci et al., 2019). В связи с этим мы оценили, как

стрессовое воздействие повлияет на транскрипцию и экспрессию кластеров рiРНК-интерференции.

Экспрессия основных генов-маркеров окислительного стресса и кластеров рiРНК во время окислительного стресса

Проанализировав экспрессию генов-маркеров окислительного стресса у линии дикого типа, Canton-S, мы показали, что экспрессия ретротранспозонов продолжается, когда стрессовое воздействие снято и экспрессия генов-маркеров окислительного стресса возвращается к первоначальным значениям. При этом повышенный уровень экспрессии кластера *flamenco* и сплайсированных форм транскриптов кластера *42AB* наблюдается даже спустя 48 ч. Таким образом, мы обнаружили корреляцию в изменении экспрессии кластеров и экспрессии ретротранспозонов. Повышенная экспрессия ретротранспозонов во время стресса может быть вызвана изменениями в работе системы рiРНК-интерференции (Рис.9).

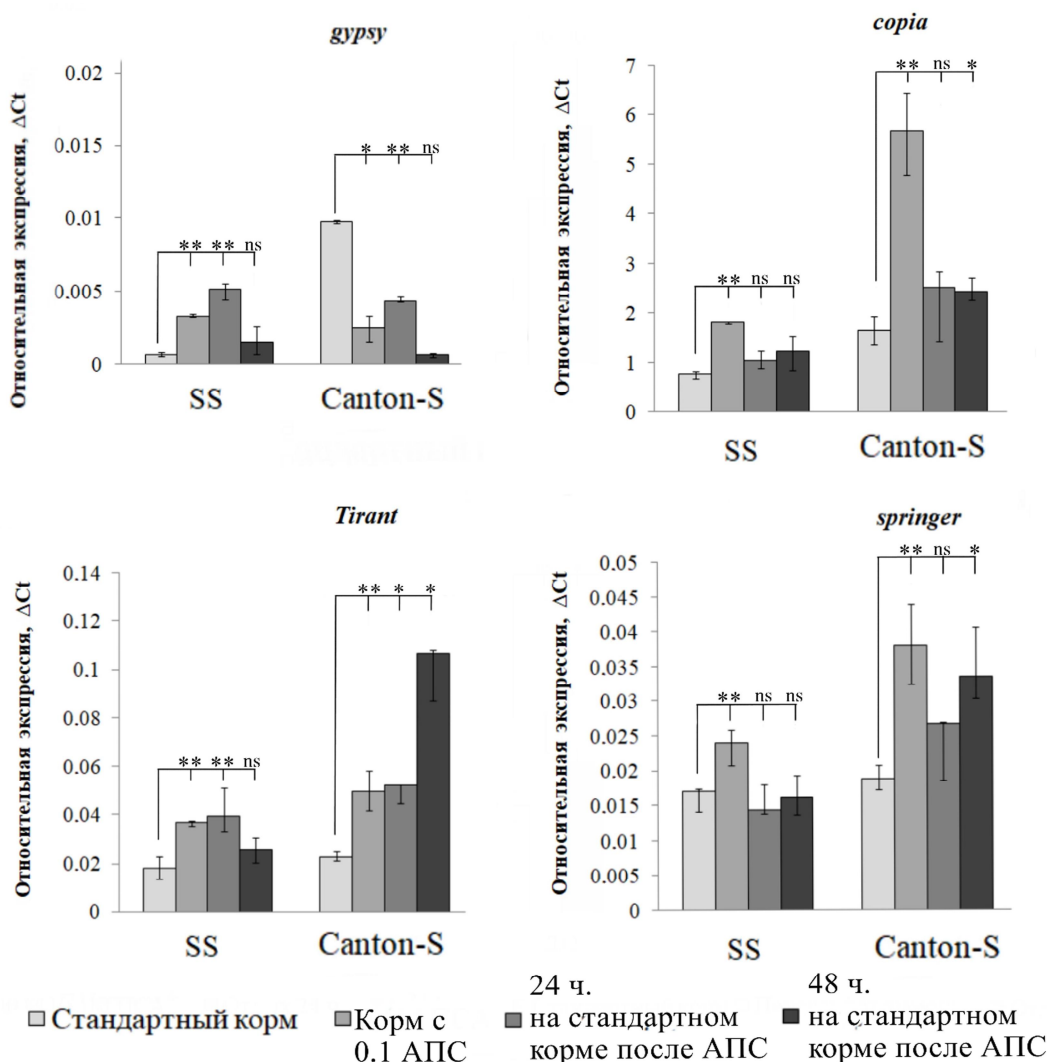


Рисунок 8 — Относительная экспрессия ДКП-ретротранспозонов: *gypsy*, *copia*, *springer* и *Tirant* в ответ на окислительный стресс, вызванный персульфатом аммония, и после снятия стрессового воздействия.

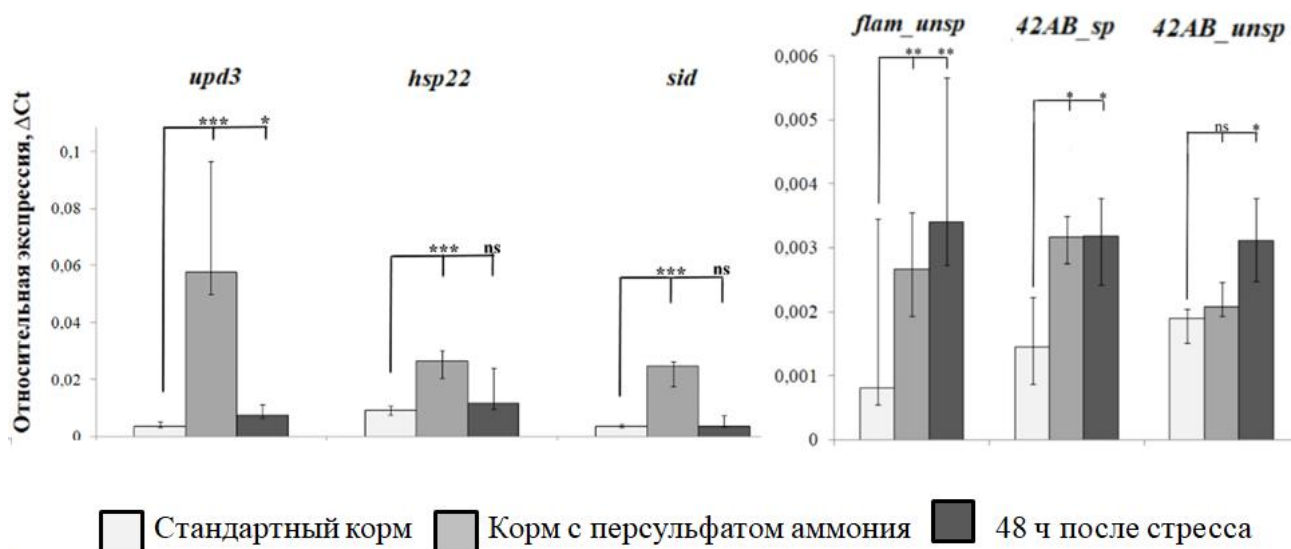


Рисунок 9 — Относительная экспрессия генов-маркеров окислительного стресса *upd3*, *hsp22*, *sid* и кластеров piRNA в ответ на окислительный стресс, вызванный персульфатом аммония, и после снятия стрессового воздействия.

Однако это, очевидно, не является единственной и основной причиной. Поэтому далее мы проанализировали влияние «эффекта положения» копий относительно генов, с которыми ретротранспозоны могут коэкспрессироваться.

Поиск положения инсерций ДКП-ретротранспозонов в геномах линий SS и Canton-S

Мы определили локализацию инсерций в геномах линий Canton-S и SS и выявили, что копии ретротранспозонов редко находятся в генах, которые отвечают на применяемое стрессовое воздействие: лишь 16% генов, в которых расположены ретротранспозоны, отвечают на стресс. Для тканеспецифично экспрессирующихся генов мы также не обнаружили корреляции между положением инсерций ретротранспозона в геноме и паттерном его экспрессии по тканям: только 17% генов, в которых расположены ретротранспозоны, экспрессируются тканеспецифично. Таким образом, котранскрипция с близлежащими генами вряд ли может быть одной причиной изменения экспрессии ретротранспозонов в ответ на стресс и тканеспецифичной экспрессии (Рис.10).

Мы проверили наши наблюдения экспериментально. Для этого нам требовалось найти инсерции ретротранспозона, который отвечает на стрессовое воздействие, его копии присутствуют в линии, которая была секвенирована в нашей лаборатории (линия SS), среди участков инсерций этого ретротранспозона должны быть как гены, изменяющие экспрессию в ответ на стресс, так и гены не изменяющие экспрессию в ответ на стресс, и выбранный ретротранспозон должен быть малокопийным, чтобы было возможно точнее подобрать аллель-специфичные праймеры. Таким ретротранспозоном оказался *Tirant*. И по результатам наших экспериментов, он сильнее всего реагировал на «хронический тепловой стресс».



Рисунок 10 — Экспрессия генов, содержащих инсерции ретротранспозонов, во время стресса, а также распределение их экспрессии по тканям согласно базе данных FlyBase.

Экспрессия отдельных копий *Tirant* при хроническом тепловом стрессе у линии SS

Мы подобрали аллель специфичные праймеры для каждой из двух инсерций *Tirant*, одна инсерция находится в гене *cactus*, который подвержен влиянию обоих применяемых стрессовых индукторов, вторая инсерция в гене *Nuak*, экспрессия которого не индуцируется стрессом. Оказалось, что вне зависимости от изменения экспрессии гена, в котором находится копия *Tirant*, общая экспрессия ретротранспозона и его отдельных копий возрастает. Следовательно, причина повышения экспрессии *Tirant* в ответ на стрессовое воздействие не обусловлена его пассивной котранскрипцией (Рис.11).

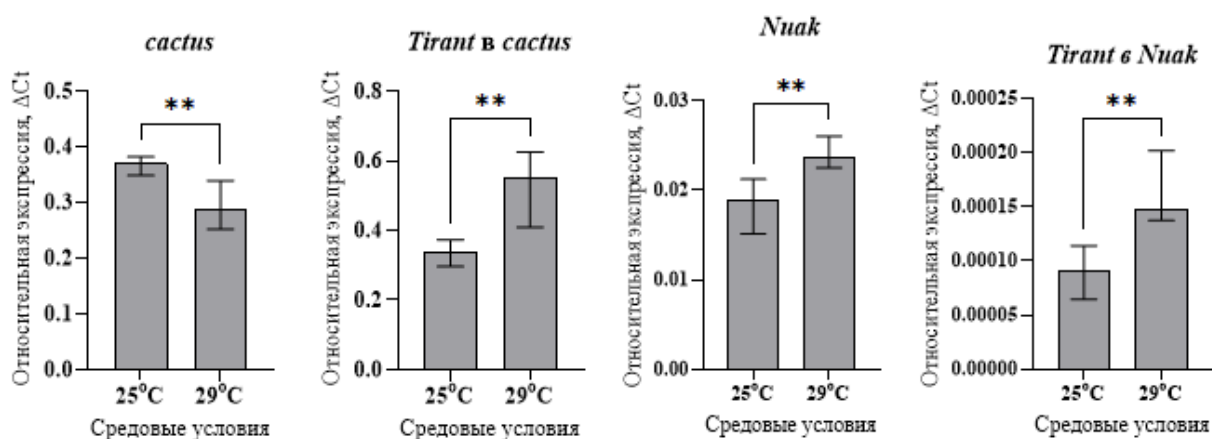


Рисунок 11 — Относительная экспрессия ДКП-ретротранспозона *Tirant* и генов, в которых находятся его инсерции в ответ на «хронический тепловой» стресс.

Поиск сайтов связывания транскрипционных факторов в регуляторных областях ДКП-ретротранспозонов

Еще одна причина активации транскрипции ретротранспозонов может заключаться в наличии сайтов связывания транскрипционных факторов в их

регуляторных последовательностях. Для поиска сайтов связывания транскрипционных факторов мы использовали программу LASANGA и последовательности ретротранспозонов. Далее проводили выравнивание последовательностей копий исследуемых ДКП-ретротранспозонов и осуществляли поиск сайтов связывания транскрипционных факторов среди инсерций ДКП-ретротранспозонов. Мы обнаружили сайты связывания целого ряда стресс-индуцируемых транскрипционных факторов в последовательностях исследуемых нами ретротранспозонов.

Тогда мы проверили по базе данных FlyBase, в каких тканях экспрессируются транскрипционные факторы, сайты связывания с которыми мы обнаружили. Для стресс-индуцируемых транскрипционных факторов мы обнаружили, что большинство из них экспрессируется тканеспецифично - в яичниках и ЦНС личинок. Поэтому мы предполагаем, что существует единая причина активной экспрессии ретротранспозонов в тканях яичников и во время индукции стрессом. Во время процесса регенерации после окислительного стресса, как было показано в работе (Sousa-Victor et al., 2017), белок PIWI поддерживает пул стволовых клеток. В совокупности с наблюдением повышенной экспрессии ДКП-ретротранспозонов до 48 ч после снятия стрессового воздействия, это говорит о том, что экспрессия ретротранспозонов при стрессе необходима, по-видимому, для процессов регенерации повреждённых тканей (Рис. 12).



Рисунок 12 — Сайты связывания стресс-индуцируемых транскрипционных факторов в 5'НТО ДКП-ретротранспозонов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регуляция ретротранспозонов является многофакторным вопросом, и может зависеть как от внешних, так и от внутренних условий. До сих пор многие тонкости регуляции мобильных элементов остаются неясными, особенно это касается активности ретротранспозонов в соматических тканях. В данной работе мы исследовали влияние геномного и абиотического стрессов на экспрессию ретротранспозонов у *D. melanogaster*.

Мутации гена *rhino* приводят к нарушению контроля экспрессии кластеров рiРНК, а также ретротранспозонов в яичниках и соматических тканях.

Учитывая, что ген *cut*, компонент комплекса RDC, отвечающего за транскрипцию и сплайсинг двуцепочечных кластеров, экспрессируется не во всех тканях, вероятно, в соматических тканях *rhino* работает по какому-то изменённому механизму.

Мы показали, что регуляция некоторых ретротранспозонов, а также экспрессия кластеров рiРНК находится под контролем гена *piwi* за пределами яичников, его основного места работы. Однако для большинства ретротранспозонов, вероятно, в соматических тканях характерна регуляция другими путями – некоторыми компонентами пути рiРНК-интерференции и siРНК-интерференции. Так же мы обнаружили, что у многих ретротранспозонов есть тканеспецифичная экспрессия, которая не объясняется положением их копий в геноме, что даёт нам возможность предполагать наличие сайтов связывания тканеспецифичных транскрипционных факторов.

Линия SS не отличается от линии дикого типа ни паттерном экспрессии ДКП-ретротранспозонов в тканях, ни их экспрессией в ответ на окислительный стресс, однако характеризуется нарушением процессинга транскриптов обоих типов кластеров, что коррелирует с наличием повышенной экспрессии LINE в соматических тканях.

Также мы обнаружили, что единственные транскрипционные факторы, которые экспрессируются во всех исследуемых тканях, сайты которых предсказаны в регуляторных областях исследуемых ретротранспозонов, являются ТФ раннего эмбрионального развития и, соответственно, принадлежат путям ответа на окислительный и тепловой стрессы. При этом нам не удалось объяснить разницу в экспрессии ретротранспозонов ответ на используемые стрессовые воздействия ни количеством их копий в наших линиях, ни положением этих копий в геноме. Сам подход нормирования экспрессии ретротранспозона на количество копий оказывается нецелесообразным, так как разные копии ретротранспозонов могут экспрессироваться с разной силой. Также в экспрессии кластеров во время и после стресса наблюдаются общие тенденции к изменению экспрессии. В связи с этим активация мобильных элементов в ответ на стрессовое воздействие зависит преимущественно от организации их регуляторных областей и процессинга транскриптов кластеров системы рiРНК. Повышенная экспрессия ретротранспозонов во время стресса и во время эмбрионального развития организма может иметь одну и ту же причину – активное деление клеток, так как их экспрессия после стресса коррелирует с работой PIWI, а также присутствием в регуляторных областях таких сайтов связывания транскрипционных факторов, которые работают в яичниках имаго и ЦНС личинки, где эти ретротранспозоны и подавляются системой рiРНК-интерференции.

Таким образом, мы показали, что отдельные компоненты системы рiРНК работают не только в яичниках, но и выполняют свои функции за пределами гонад, и это необходимо для процессинга транскриптов кластеров рiРНК, а

также регуляции мобильных элементов. Тканеспецифичная и стресс-индуцируемая экспрессия ретротранспозонов имеют единые механизмы.

ВЫВОДЫ

1. Фенотип *flamenco* в линии *SS* характеризуется нарушением процессинга одно- и двуцепочечных кластеров рiРНК, что не приводит к дерепрессии транскрипции ретротранспозонов в тканях яичников, но может являться причиной дерепрессии транскрипции отдельных ретротранспозонов в соматических тканях. Нарушение процессинга рiРНК кластера *flamenco* не приводит к увеличению количества соответствующей рiРНК.

2. От функции гена *rhino* зависит экспрессия отдельных ретротранспозонов за пределами гонад, а также процессинг транскриптов одноцепочечного кластера рiРНК *flamenco* в тканях яичников.

3. Ген *piwi* определяет уровень экспрессии ретротранспозонов в соматических тканях, а также влияет на процессинг транскриптов двуцепочечного кластера *42AB* в соматических тканях.

4. Окислительный и хронический тепловой стресс сопровождается изменением экспрессии ДКП-ретротранспозонов. Стресс-индуцируемое изменение экспрессии ДКП-ретротранспозонов связано с нарушением процессинга кластеров рiРНК-интерференции.

5. Экспрессия большинства копий ретротранспозонов регулируется независимо от их геномной локализации.

6. Транскрипционные факторы могут вносить значимый вклад в регуляцию экспрессии ретротранспозонов как в генеративных, так и в соматических тканях. Одной из причин повышения экспрессии ДКП-ретротранспозонов во время стресса и их тканеспецифичной экспрессии является наличие в их регуляторных областях сайтов связывания стресс-индуцируемых и тканеспецифичных транскрипционных факторов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК

Кукушкина И.В., Махновский П.А., Нефедова Л.Н., **Миляева П.А.**, Кузьмин И.В., Лавренов А.Р., Ким А.И. Анализ транскриптома линий *Drosophila melanogaster* с нарушением контроля транспозиции ретротранспозона *gypsy* // Генетика – 2020. – Т. 56, № 5. – С. 550–560. doi: 10.31857/S0016675820050082.

Миляева П.А., Нефедова Л.Н. Устойчивость к борной кислоте у *Drosophila melanogaster* зависит от уровня экспрессии гена *Сур9b2* // Генетика – 2022. – Т. 58, № 4. – С. 463–469. doi: 10.31857/s0016675822040099.

Миляева П.А., Лавренов А.Р., Кузьмин И.В. Ким А.И., Нефедова Л.Н. Регуляция одноцепочечных и двуцепочечных кластеров piРНК в герминальных и соматических тканях *Drosophila melanogaster* зависит от гена *rhino* // Генетика – 2023. – Т. 59, № 12. – С. 1372–1381. doi: 10.31857/S0016675823120056.

Milyaeva P.A., Kukushkina I.V., Kim A.I., Nefedova L.N. Stress induced activation of LTR retrotransposons in the drosophila melanogaster genome // Life – 2023. – Vol. 13, №12. – P. 2272–2272. doi: 10.3390/life13122272.

Миляева П.А., Кукушкина И.В., Лавренов А.Р., Кузьмин И.В., Ким А.И., Нефедова Л.Н. Регуляция экспрессии ретротранспозонов в соматических тканях *Drosophila melanogaster* // Молекулярная биология – 2024 – Т. 58, №1. – С. 9-9.

Выходные данные автореферата согласно действующему ГОСТу.