

Федеральное государственное образовательное учреждение  
высшего образования

"Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова"

*На правах рукописи*

**Миляева Полина Андреевна**

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

1.5.7 - Генетика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Нефедова Лидия Николаевна

**Москва – 2024**

## СОДЕРЖАНИЕ

1. ВЕДЕНИЕ .....	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
2.1. Классификация мобильных генетических элементов.....	12
2.2. Строение ретротранспозонов и их влияние на геном .....	13
2.3. Система siРНК-интерференции как основной путь регуляции активности мобильных элементов в соматических тканях <i>Drosophila melanogaster</i> .....	18
2.4. Механизмы подавления экспрессии ретротранспозонов в клетках яичников <i>Drosophila melanogaster</i> .....	21
2.4.1. Источники piРНК.....	21
2.4.2. Процессинг piРНК .....	27
2.5. Активация ретротранспозонов во время стресса.....	34
2.6. Клеточные механизмы ответа на окислительный стресс и их связь с регуляцией активности мобильных генетических элементов .....	39
2.7. Компоненты системы piРНК-интерференции в соматических тканях <i>Drosophila melanogaster</i> .....	44
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
3.1. Линии <i>Drosophila melanogaster</i> .....	47
3.2. Условия культивирования.....	47
3.3. Сбор материала для анализа.....	48
3.4. Выделение РНК .....	48
3.5. Обработка ДНКазой и обратная транскрипция .....	49
3.6. Количественная ПЦР .....	49
3.7. Выделение ДНК.....	53
3.8. Обработка результатов секвенирования на платформе Illumina .....	54
3.9. Аллель-специфичная ПЦР .....	54
3.10. Оценка числа копий мобильных элементов методом ПЦР .....	55
3.11. Подготовка ДНК-библиотек и нанопоровое секвенирование .....	56
3.11. Обработка результатов секвенирования и поиск последовательностей мобильных элементов.....	57
4. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	58

<b>4.1. Регуляция экспрессии ретротранспозонов при нарушении работы системы piРНК-интерференции .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1.1. Поиск мутаций в кодирующих последовательностях генома линии SS ..</b>	<b>58</b>
<b>4.1.2. Анализ экспрессии ретротранспозонов и кластеров piРНК у линий SS и Canton-S .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1.3. Анализ экспрессии генов, участвующих в piРНК-интерференции, в линии Canton-S .....</b>	<b>66</b>
<b>4.1.4. Влияние экспрессии <i>rhino</i> на экспрессию кластеров piРНК и ретротранспозонов в генеративных и соматических тканях .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1.5. Влияние мутации <i>piwi</i> на экспрессию кластеров piРНК и ретротранспозонов в генеративных и соматических тканях .....</b>	<b>73</b>
<b>4.2 Экспрессия ретротранспозонов во время стресса.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2.1. Устойчивость линии SS к борной кислоте .....</b>	<b>78</b>
<b>4.2.2. Влияние окислительного и хронического теплового стрессов на активацию ДКП-ретротранспозонов в линиях SS и Canton-S .....</b>	<b>82</b>
<b>4.2.3. Влияние окислительного стресса на активацию кластеров piРНК в линии Canton-S .....</b>	<b>85</b>
<b>4.3. Влияние количества и положения отдельных копий в геноме на экспрессию ретротранспозонов в различных тканях и во время стресса .....</b>	<b>87</b>
<b>4.4. Анализ регуляторных областей ДКП-ретротранспозонов .....</b>	<b>93</b>
<b>5. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>96</b>
<b>5.1. Экспрессия ретротранспозонов в линии SS с фенотипом flamenco .....</b>	<b>96</b>
<b>5.2. Влияние отсутствия функции генов <i>rhino</i> и <i>piwi</i> на экспрессию ретротранспозонов .....</b>	<b>97</b>
<b>5.3. Влияние копияности и положения ретротранспозонов в геноме на их экспрессию.....</b>	<b>98</b>
<b>5.4. Изменение экспрессии ретротранспозонов в ответ на стресс и паттерн экспрессии в тканях определяется наличием сайтов связывания ТФ в регуляторных областях ретротранспозонов и функциональностью системы piРНК-интерференции.....</b>	<b>102</b>
<b>5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>100</b>
<b>6. ВЫВОДЫ.....</b>	<b>103</b>
<b>7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>104</b>
<b>8. ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>	<b>119</b>

<b>Приложение 1</b> .....	<b>119</b>
<b>Приложение 2</b> .....	<b>139</b>
<b>Приложение 3</b> .....	<b>144</b>
<b>Приложение 4</b> .....	<b>148</b>

## 1. ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

*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 (Saint-Leandre et al., 2020). 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 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, активно решаемой в рамках современных подходов, является поиск других 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 рiРНК-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 проблеме 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 piRNA-интерференции – генов *piwi* и *rhino*.

### Цель и задачи

Целью работы являлось исследование влияния экзогенных факторов и мутаций в ключевых генах piRNA-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 piRNA в тканях яичников, корпуса, головы самок имаго и ЦНС личинок.
2. Охарактеризовать влияние нокдауна *rhino* на экспрессию отдельных ретротранспозонов и кластеров piRNA в тканях яичников, головы и корпуса самок дрозофилы.
3. Охарактеризовать влияние отсутствия функции *piwi* на экспрессию отдельных ретротранспозонов и кластеров piRNA в тканях яичников, головы и корпуса самок дрозофилы.
4. Проанализировать влияние окислительного и хронического теплового стресса на экспрессию ДКП-ретротранспозонов и кластеров piRNA 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 работы

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 нокадауне основного участника комплекса RDC (*Rhino*, *Deadlock*, *Cutoff*), *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 нокадауне *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

Проблема регуляции активности мобильных элементов является широко исследуемой темой в связи с потенциальным мутационным эффектом транспозиции, которая может приводить к различным онкологическим заболеваниям. Теоретическая значимость работы заключается в исследовании на модели *D. melanogaster* механизмов контроля транспозиции при геномном стрессе и стрессе, вызванном абиотическими факторами. В работе показано, что транскрипция исследуемых в работе мобильных элементов зависит не только от процессинга транскриптов кластеров рiРНК, но и от регуляции транскрипционными факторами, которые экспрессируются в определённых средовых условиях.

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 стрессовых факторов на стабильность генома.

## Степень достоверности и апробация результатов

Задачи работы поставлены в соответствии с целью исследования, экспериментальная часть работы выстроена на основе данных из литературных источников. В работе использованы современные методы и подходы, соответствующие решению поставленных задач. Результаты экспериментов проверены с помощью подходящих статистических критериев и были проанализированы с использованием современных баз данных. Все эксперименты имеют достаточное количество

биологических повторов для проведения статистического анализа и интерпретации результатов поставленных экспериментов.

Результаты работы 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) и опубликованы в журналах, входящих в перечень научных изданий ВАК, в международных рецензируемых журналах (5 статей, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus):

Статьи, в журналах, рекомендованных 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 *Sup9b2* // *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 рiРНК 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.

Тезисы:

**Миляева П.А.** и Нефедова Л.Н. Исследование влияния мутации в гене цитохрома *Sup9b1* на устойчивость к борной кислоте *Drosophila melanogaster*. В Международная конференция Дрозофила в генетике и медицине Сборник тезисов, С. 31–31, НИЦ Курчатовский институт - ПИЯФ Гатчина, 2020.

**Миляева П.А.**, Нефедова Л.Н., Лавренов А. Р. и Никитина М. Л. Роль компонентов системы рiРНК-интерференции в регуляции ретротранспозонов в соматических тканях *D.*

*melanogaster*. В Материалы Конференции молодых ученых Актуальные проблемы биологии развития, 12-14 октября 2021 г., Москва, ИБР РАН, С. 50–50, Издательство Перо Москва, 2021.

**Milyaeva P.A.**, Kuzmin I.V., Lavrenov A.R., Dyachenko A.I. and Nefedova L.N.. The role of the *rhino* gene in the transcriptional regulation of different piRNA clusters. In *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference*, pages 696–696, Novosibirsk, 2022.

**Миляева П.А.**, Кукушкина И.В., Лавренов А.Р., Кузьмин И.В., Ким А.И. и Нефедова Л.Н. Стресс-активация ДКП-ретротранспозонов в геноме *Drosophila melanogaster*: причины и следствия. В *Всероссийская конференция с международным участием Дрозофила 2023*, Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра Курчатовский институт, Гатчина, 2023.

### **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 диссертационной 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.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Классификация мобильных генетических элементов

Мобильные генетические элементы (МГЭ) – участки геномной ДНК, способные изменять своё местоположение в геноме организма-хозяина посредством механизма транспозиции. МГЭ распространены во всех классах живых организмов, начиная с бактерий и архей и заканчивая высшими эукариотами. У человека МГЭ составляют около 45% генома, у дрозофилы 15-20% генома (Perrat et al., 2013).

Классификация эукариотических МГЭ основана на типе транспозиции, причём, в каждом классе есть как автономные группы мобильных элементов, так и неавтономные, транспозиция которых зависит от присутствия первых (рис. 1).

К классу I относятся ретротранспозоны – мобильные элементы, которые осуществляют свою транспозицию по репликативному механизму: создание ДНК-копии с помощью обратной транскрипции РНК-матрицы и последующее встраивание этой новой копии в новый участок ДНК. В результате такой транспозиции число копий ретротранспозона увеличивается. Удаление копий ретротранспозонов из генома происходит с помощью эктопической рекомбинации и носит случайный характер.

Ретротранспозоны разделяют по наличию длинных концевых повторов (ДКП) на два подкласса: ДКП-ретротранспозоны (группы *Ty1-copia*, *BEL*, *DIRS* и *Ty3-gypsy*) и ретротранспозоны без ДКП (не-ДКП-ретротранспозоны) (группы *LINE* (long interspersed element) и *SINE* (short interspersed elements)) (Kidwell, 2002).

ДКП-ретротранспозоны нередко подвергались доместикации (в данном случае по доместикацией понимается процесс эволюции последовательности открытой рамки считывания мобильного элемента в ген хозяина) в ходе эволюции у разных групп живых организмов, включая дрозофилу. Например, ген *Gagr* появился благодаря доместикации открытой рамки считывания (ОРС) *gag* (Nefedova et al., 2014). Элементы группы *LINE* также сыграли важную роль в эволюции дрозофилы. В отличие от других живых организмов, у плодовой мушки нет теломеразы, а удлинение теломер происходит за счёт встраивания новых копий теломерных *LINE*-элементов (*HeT-A*, *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и *TAHRE*). Данные элементы находятся на концах хромосом после районов повторяющихся последовательностей *TAS*, и встраивание их новых копий происходит именно в эти участки (Radion et al., 2018). Однако, несмотря на потенциальную пользу, большинство ретротранспозонов наносят ущерб клетке в результате транспозиции, и

поэтому находятся под жестким контролем со стороны хозяина. Об этом подробнее будет сказано ниже.

К классу II относятся МГЭ, которые осуществляют транспозицию с помощью нерепликативных механизмов: механизм «вырезание-вставка» либо с помощью рекомбинации (например, *hobo*, *P* (*D. melanogaster*) или *Tc1* (*Caenorhabditis elegans*)) и механизм, напоминающий «катящееся кольцо» у бактерий, (надсемейство МГЭ *Helitrons*). В результате транспозиции число копий таких МГЭ не увеличивается (Kidwell, 2002).

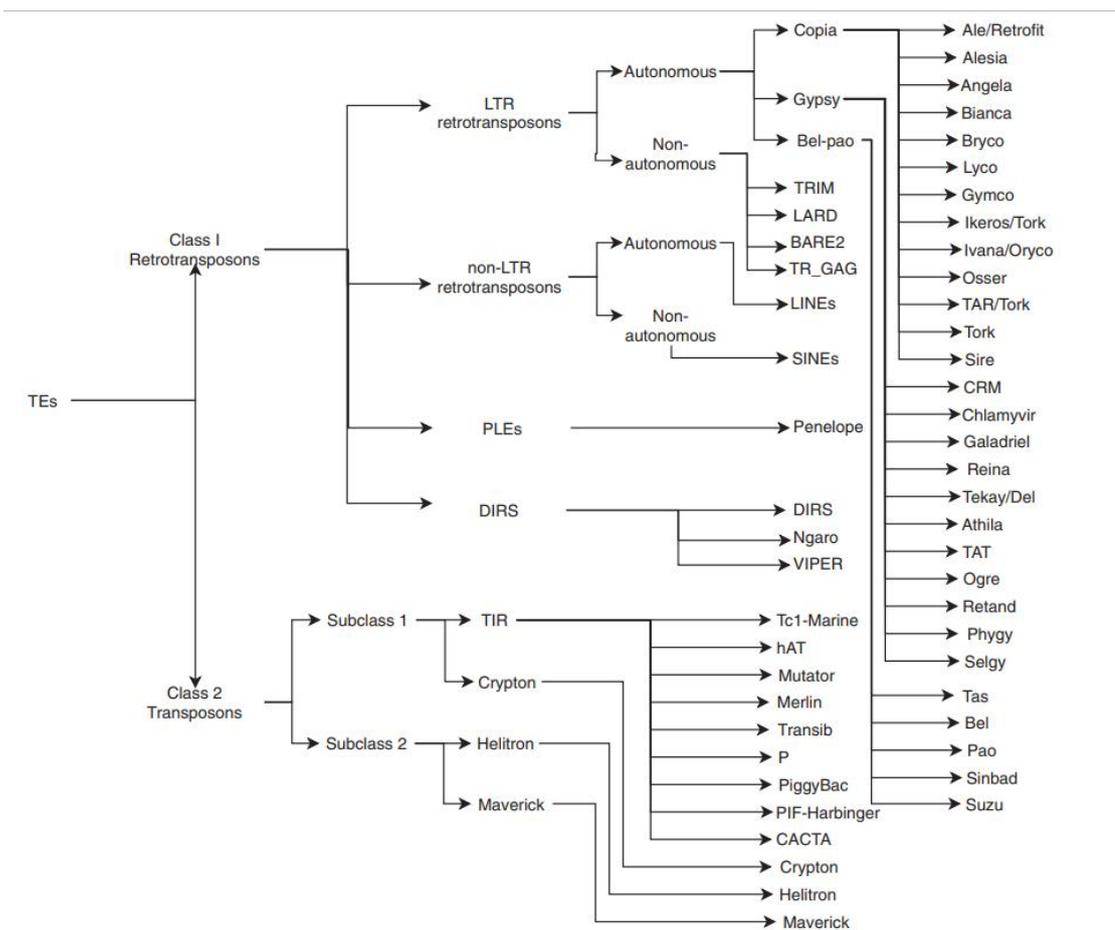


Рисунок 1. Классификация мобильных элементов (Orozco-Arias et al., 2019; Schietgat et al., 2018). Пояснения в тексте.

## 2.2. Строение ретротранспозонов и их влияние на геном

В современной литературе родство ретровирусов и ДКП-ретротранспозонов уже не подвергается сомнению. Некоторые исследователи даже относят ретровирусы к классу ДКП-ретротранспозонов (Malik and Eickbush, 1999). Действительно, среди ДКП-

ретротранспозонов встречаются такие варианты, когда инсерция предкового вируса в геном конкретного вида произошла не так давно по меркам эволюции, и последовательность данного мобильного элемента ещё не успела накопить достаточно мутаций, чтобы полностью стать мобильным элементом. К таким примерам можно отнести эндогенные вирусы свиньи, которые способны к инфицированию, что повышает риск заражения клеток человека при ксенотрансплантации (Denner, 2016). Однако здесь мы будем разделять ретровирусы и ДКП-ретротранспозоны на две отдельные категории по критерию вирулентности.

И ДКП-ретротранспозоны, и ретровирусы обладают единым планом строения: длинными концевыми повторами (образуются при обратной транскрипции) и тремя ОРС. ОРС *gag* кодирует структурные белки оболочки вирусной частицы, ОРС *pol* кодирует ферменты, отвечающие за интеграцию и перемещение мобильного элемента (вируса) – ревертазу и интегразу, продукт ОРС *env* отвечает за образование липопротеидного комплекса, который обеспечивает узнавание клеточных рецепторов и проникновение вируса в клетку (последняя ОРС присутствует не у всех ДКП-ретротранспозонов) (Нефедова и Ким, 2009). Также среди эндогенных ретровирусов иногда выделяют рамку *pro*, кодирующую вирусную протеазу (Johnson, 2019). Помимо этого, среди ДКП-ретротранспозонов встречаются и такие, у которых две либо все три ОРС объединены в одну (Нефедова и Ким, 2009). Однако основным критерием классификации ретротранспозонов на три группы (BEL, *coria* и *gypsy*) служит последовательность интегразы. Таким образом во всех трёх группах ДКП-ретротранспозонов присутствуют элементы с разной организацией открытых рамок считывания (Рис.2).

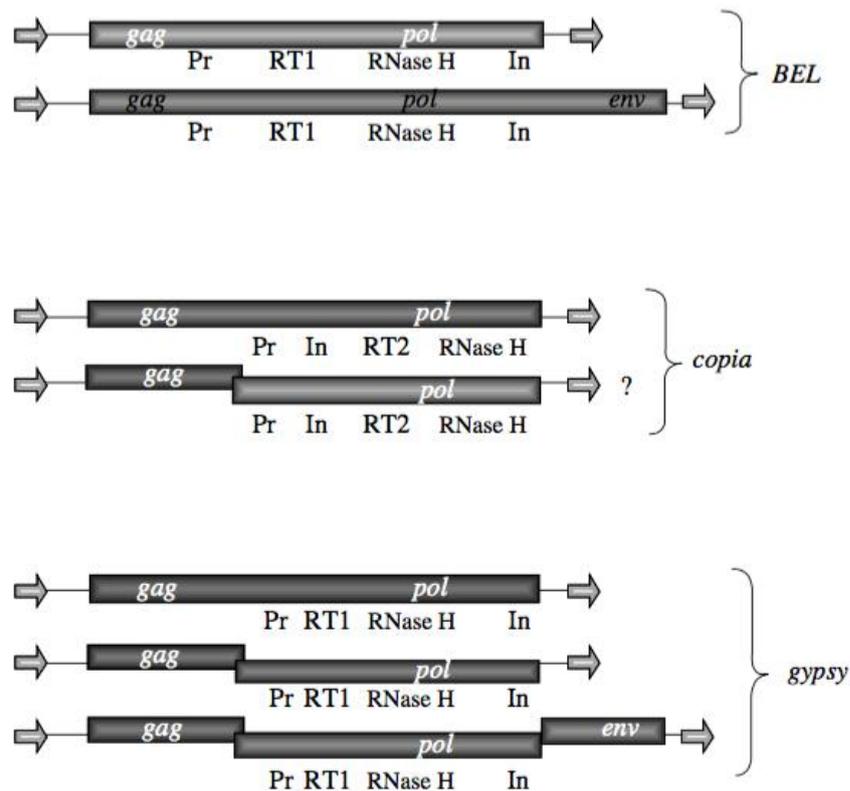


Рисунок 2. Структурная организация ДКП-ретротранспозонов *D. melanogaster* трех групп: *gypsy*, *copia* и *BEL*. Пояснения в тексте. Обозначения: RT - обратная транскриптаза, RNaseH – РНКазы H, In – интегразы, Pr – протеазы, стрелками обозначены длинные концевые повторы (Нефедова и Ким, 2009).

В настоящее время существуют два противоположных взгляда на эволюцию ДКП-ретротранспозонов и ретровирусов (Нефедова and Ким, 2009). По одной из точек зрения ДКП-ретротранспозоны являются ретровирусами, которые когда-то были включены в геном организма-хозяина и потеряли способность к вирулентности. Однако, так как у ретровирусов круг хозяев ограничен, существует гипотеза об их эукариотическом происхождении путём эволюции большого разнообразия ретротранспозонов. В связи с этим стоит отметить, что существует немало примеров попадания новых ретровирусных последовательностей в геном эукариот и их последующей доместикации с образованием промоторов, энхансеров или генов, однако нет ни одного зарегистрированного случая образования последовательности мобильного элемента из последовательности гена хозяина. Более того, следуя такой логике, образование механизма обратной транскрипции могло бы происходить неоднократно, тем не менее, мы наблюдаем, что у ретротранспозонов и у ретровирусов, помимо общего плана строения, схожи также и

механизмы репликации, что даёт нам почву для утверждения, что, вероятно, в этом вопросе первичны ретровирусы.

Так как ДКП-ретротранспозоны осуществляют транспозицию путём репликативного синтеза, после каждой успешной инсерции в геноме хозяина появляется ещё одна новая копия ретротранспозона. Нередко мишенью для интеграции новых копий служат интроны, экзоны и регуляторные последовательности генов, что повышает риск возникновения новых мутаций. Однако, согласно современным исследованиям, у ретротранспозонов существуют свои требования к будущему сайту инсерции: например, такой специфичностью обладают ДКП-ретротранспозоны *D. melanogaster gypsy*, *ZAM* и *Idefix*. Все эти мобильные элементы встраиваются в палиндромные последовательности и образуют дубликации четырёх нуклеотидов в сайте встраивания. Ретротранспозоны группы *gypsy* предпочитают в качестве сайтов встраивания последовательности 5'-TRPuPuA-3', однако бывают и случаи их интеграции в АТ-повторы. Поэтому для ряда ретротранспозонов существуют «горячие точки встраивания», места, транспозиция в которые у данных мобильных элементов происходит чаще, чем в какие-либо другие участки генома. Например, в гене *ovo* существуют протяжённые АТ-богатые участки с неуникальными последовательностями, в которые предпочитает встраиваться *gypsy*, что приводит к стерильности самок дрозофилы. У риса (*Oryza sativa*) ретротранспозон *Tos17* предпочитает встраиваться в ген *RSus2* и в собственные копии. В целом, встраивание в собственные копии либо копии других мобильных элементов характерно для многих мобильных элементов. Об этом свидетельствует организация кластеров рiРНК (крупных скоплений старых копий мобильных элементов), в которых часто находятся вставки одних ретротранспозонов в последовательности других (Dej, 1998; Yamazaki et al., 2001). Ретротранспозоны подгруппы *Idefix* также имеют тенденцию встраиваться в АТ-богатые сайты (6-40 п.н.). МГЭ подгруппы *ZAM* предпочитают встраиваться в участки с последовательностью 5'-GCGCGC-3'. Также для некоторых подгрупп ретротранспозонов обнаружена тенденция встраиваться в сайты ДНК, обладающие определёнными параметрами, но не в конкретные последовательности. Например, способность ДНК переходить из А-формы в В-форму и частота транскрипции сайта, эухроматин или гетерохроматин (Bushman, 2003; Nefedova et al., 2011).

Среди ДКП-ретротранспозонов и ретровирусов, которые предпочитают уникальные районы генома можно выделить ДКП-ретротранспозоны *Ty3* и *Ty1* (*Saccharomyces cerevisiae*), которые встраиваются на 5'-участках генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III, и на 750 п.н. выше старта транскрипции генов,

транскрибируемых РНК-полимеразой III, соответственно (Bushman, 2003; Malik and Eickbush, 1999). ДКП-ретротранспозон риса *Tos17* и ретровирус ВИЧ тоже чаще встраиваются в участки с уникальными последовательностями. При этом, при встраивании все перечисленные примеры чаще попадают в некодирующие участки (Bushman, 2003; Miyao et al., 2003).

Некоторые ДКП-ретротранспозонов, которые часто встраиваются в гетерохроматиновые районы, кодируют интегразы с хромодоменами. Хромодомены – это последовательности из 50 аминокислот, которые необходимы таким белкам, как HP1, и белкам семейства Polysomb (Pc), для распознавания гетерохроматиновых меток (Gao et al., 2008). Показано, что для встраивания ДКП-ретротранспозона *Ty5* (*S. cerevisiae*) необходимы гетерохроматиновые белки Sir3p и Sir4p, 95% его инсерций оказываются теломерных районах либо в локусах спаривания *HML* и *HMR* (Zhu et al., 1999).

Таким образом, ДКП-ретротранспозоны в большинстве случаев осуществляют транспозиции с минимальным ущербом для генома организма-хозяина. Тем не менее, некоторые инсерции МГЭ могут приводить к таким негативным последствиям, как выключение генов и геномные перестройки. При этом сходство ДКП-ретротранспозонов с ретровирусами делает их потенциальным материалом для использования в качестве векторов наравне с ретровирусами.

В отличие от LTR-ретротранспозонов, теломерные LINE не обладают длинными концевыми повторами и играют положительную роль в клетке, так как их копии используются для удлинения теломер. У теломерных LINE есть две открытые рамки считывания (ОРС): *gag* и *pol*. Их функции такие же, как и у соответствующих ОРС у LTR-ретротранспозонов. В отличие от большинства теломерных LINE, *HeT-A* не обладает рамкой считывания *pol*. Считается, что для транспозиции он использует обратную транскриптазу и эндонуклеазу, кодируемые родственными элементами, такими, как *TART* и *TANRE*, однако прямых свидетельств такого механизма транспозиции *HeT-A* пока обнаружено не было (Casacuberta, 2017) (Рис.3).

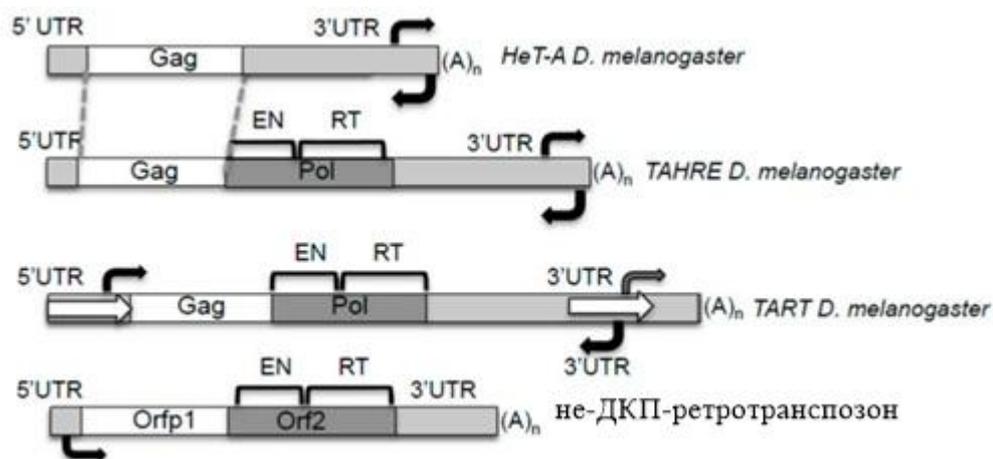


Рисунок 3. Структура LINE (Casacuberta, 2017). 5'UTR и 3'UTR – 5'- и 3'-нетранслируемые области соответственно, EN – эндонуклеаза, RT – обратная транскриптаза, стрелками указано направление транскрипции.

В отличие от ДКП-ретротранспозонов, теломерные LINE встраиваются в одном направлении по отношению к центромере – поли-А-хвост всегда повернут к центромере. Ещё одной особенностью LINE является наличие транскрипции в обоих направлениях с обеих цепей, причём, в некоторых случаях количество бессмысленных транскриптов может превышать количество значимых. Эта особенность теломерных ретротранспозонов поддерживается строгим отбором, однако функция этого явления до сих пор не изучена (Casacuberta, 2017)

### 2.3. Система siРНК-интерференции как основной путь регуляции активности мобильных элементов в соматических тканях *D. melanogaster*

В соматических клетках *D. melanogaster*, как и у других многоклеточных организмов, контроль транспозиции осуществляется путём siРНК-интерференции. Источниками siРНК являются вирусы, мобильные элементы и трансгенные конструкции. Предшественники siРНК – это двуниевые РНК, причём, такая РНК может быть как эндогенной (endo-siРНК), так и захваченной из внешней среды (exo-siРНК). Так как в фокусе наших дальнейших рассуждений будут ретротранспозоны, остановимся подробнее на siРНК эндогенного происхождения (Schwarz et al., 2002).

Как было сказано выше, предшественником siРНК является двуниевая РНК, причём источником таких РНК являются сами последовательности транспозонов, вирусов

или трансгенных конструкций, встроенных в геном. Двунитевая РНК-предшественник разрезается на фрагменты с помощью белка Dicer-2. У Dicer-2 есть несколько доменов: DEXD/H АТФазный, DUF283, PAZ, два домена РНКазы III и dsRBD, связывающий двунитевую РНК. Dicer-2 связывает концы двунитевой РНК (которая изначально являлась частью РНК, принявшую конформацию stem-loop) (exo-siРНК тоже появляются из stem-loop, но во время репликации вируса, инфицировавшего клетку) через домен PAZ и разрезает её с помощью двух РНКазных доменов, оставляя на 5'-конце продукта монофосфат, причём наличие гидроксила на 3'-конце не является обязательным для дальнейших реакций. Однако 3'-конец обрабатывается метилтрансферазой HEN1, как и в случае piРНК, о чём будет сказано далее. Но siРНК короче, чем piРНК. Обычно размер siРНК не более 21 н., в то время, как piРНК чуть больше 24 н. (Carthew and Sontheimer, 2009). Потеря функции Dicer-2 приводит к повышению экспрессии ретротранспозонов в S2-клетках, однако, есть и Dicer-независимый способ образования siРНК (Siomi et al., 2008).

Сама РНК-интерференция осуществляется в комплексе RISC (RNA-induced silencing complex). Сборка этого комплекса начинается с гетеродимера, образованного Dicer-2 и R2D2 (однако в случае endo-siRNA необходимость R2D2 остаётся под вопросом, так как показано, что для биогенеза endo-siРНК необходим белок Loquacious, который чаще всего работает в комплексе с Dicer-1). Затем несколько неизвестных факторов присоединяются к гетеродимеру и формируют RLC (RISC-loading complex), к которому присоединяется белок Ago2 с коротким предшественником siРНК, и комплекс превращается в пре-RISC. Формирование RISC завершается, когда Ago2 отсоединяет от дуплекса РНК смысловую цепь, которая не будет участвовать в процессе РНК-интерференции. Ago2 захватывает транскрипт и разрезает его на расстоянии 10-11 нуклеотидов от 5'-конца так, что получаются продукты с монофосфатом на 5'-конце и гидроксильной группой на 3'-конце. Продукты дислоцируют из комплекса и подвергаются дальнейшей деградации, а комплекс RISC освобождается для захвата следующей мишени (Carthew and Sontheimer, 2009). Дрозофилы, гомозиготные по мутантным аллелям *dcr-2* или *ago-2*, фертильны и не отличаются по морфологии от дикого типа, однако у таких индивидов значительно повышен уровень экспрессии МГЭ в голове (Chung et al., 2008). На клеточных культурах человека было показано, что индукция стресса с помощью метарсенита натрия либо теплового шока приводит к делокализации Ago2 из активного компартмента в неактивный, что приводит к снижению активности механизма siРНК-интерференции (Detzer et al., 2011) (Рис.4).

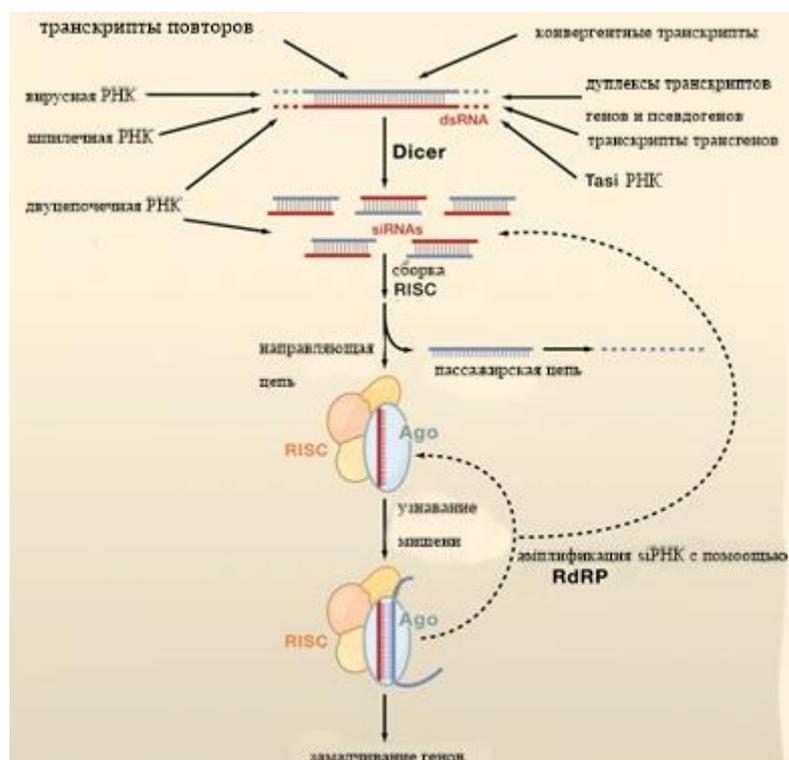


Рисунок 4. Механизм siРНК-интерференции (Carthew and Sontheimer, 2009).

Пояснения в тексте.

У некоторых организмов, таких, как *C. elegans*, может происходить биогенез вторичных siРНК с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы, что усиливает репрессию мишени РНК-интерференции (Carthew and Sontheimer, 2009).

Помимо участия в постраскрипционной репрессии, белки siРНК-интерференции способны участвовать в формировании гетерохроматина, что тоже снижает уровень экспрессии генов-мишеней. При этом важным компонентом комплекса RISC является белок R2D2, так как мутация в гене *r2d2* приводит к делокализации гетерохроматиновых меток H3K9me2 и H3K9me3 (Fagegaltier et al., 2009). Было показано, что при посттравматическом стрессовом расстройстве у крыс большая часть новых меток H3K9me3 возникает именно в местах вставок ретротранспозонов (Hunter et al., 2015).

## 2.4. Механизмы подавления экспрессии ретротранспозонов в клетках яичников *D. melanogaster*

### 2.4.1. Источники piРНК

Ретротранспозоны наиболее активны в клетках, которые претерпевают большое количество делений. Это могут быть каллусные культуры растений, стволовые клетки животных, а также клетки зародышевой линии. У животных в таких клетках работает специальный механизм подавления ретротранспозонов – piРНК интерференция. Этот механизм играет одну из ключевых ролей в развитии гонад и фертильности (Guerreiro, 2012), как самцов, так и самок и обладает полоспецифичностью. Однако, так как в данной работе эксперименты проведены именно на самках дрозофилы, мы подробно остановимся на piРНК-интерференции в яичниках.

В яичниках *D. melanogaster* присутствуют два основных типа клеток – это соматические клетки и питающие (клетки зародышевой линии). Соматические клетки образуются в результате митоза. Этими клетками сформирована область, в которой располагается яйцо. Питающие же клетки формируются в результате мейоза и митоза. Из-за особенностей овогенеза насекомых, они остаются связанными цитоплазматическими мостиками с ооцитом (имеющим большинство связей в синцитии). Они поставляют питательные вещества и часть транскриптов, в том числе и piРНК, в ооцит. Механизм piРНК-интерференции активно подавляет транскрипцию ретротранспозонов в обоих типах клеток, однако протекает он в них по-разному.

Как и в случае si- и mi-РНК, piРНК являются короткими транскриптами, однако процессируются они не из индивидуальных источников, а из длинных некодирующих РНК – транскриптов кластеров piРНК. Эти кластеры представлены скоплением ретротранспозонов на границе эу- и гетерохроматина (Hirakata and Siomi, 2016). Число кластеров piРНК варьирует в зависимости от вида и даже линии. Так у *D. melanogaster* насчитывают около 73 кластеров, а у самого близкого вида, *D. simulans*, около 23 (Wierzbicki et al., 2023). По другим подсчётам число кластеров у дрозофилы может достигать 142, эти кластеры продуцируют 92% всех piРНК, 80% продуцируемых кластерами piРНК картируются уникально (Brennecke et al., 2007; Yang and Xi, 2017). Кластеры – это динамично изменяющиеся структуры генома, без которых невозможно замалчивание старых ретротранспозонов, и тех, с которыми популяция столкнулась относительно недавно. Если структура кластера нарушается и эта мутация приводит к изменению его экспрессии либо процессинга транскриптов, то ретротранспозоны, копии которых входят в состав кластера, активируются (Yamanaka et al., 2014). Транскрипция кластеров piРНК тоже осуществляется поло- и тканеспецифично, а основную роль в процессинге играют белки клады PIWI, которые присутствуют у многих эукариот. Сам же

процесс рiРНК-интерференции распространен среди билатеральных животных (Grimson et al., 2008).

По общим представлениям кластеры можно разделить на три категории: одноцепочечные, транскрипция которых осуществляется только в одном направлении, двуцепочечные, транскрибирующиеся с двух антипараллельных цепей одного и того же участка ДНК, и двунаправленные, транскрипция которых идёт дивергентно из одной точки. У дрозофилы показано наличие кластеров первых двух типов (Yamanaka et al., 2014).

Одноцепочечные кластеры состоят из последовательностей мобильных элементов, подавляющее количество которых встроено в антисмысловом направлении по отношению к направлению транскрипции. Примерами таких кластеров у дрозофилы являются *flamenco* (работает в соматических тканях яичников) и *20A* (работает в соматических и генеративных тканях яичников). Такие кластеры обладают собственными промоторами, а их транскрипты полиаденилируются и подвергаются альтернативному сплайсингу, после чего направляются в область с внутренней стороны ядра, DotCOM, откуда осуществляется их транспорт в цитоплазму (Yamanaka et al., 2014). Так как транскрипты одноцепочечных кластеров имеют все модификации мРНК, они транспортируются из ядра с помощью гетеродимера белков Nxf1, Nxt1, а также комплекса TREX, который привлекает гетеродимер к полиаденилированной РНК. Nxt1 в этом комплексе необходим для того, чтобы осуществить взаимодействие с фенилаланин-глициновыми повторами белков ядерного порового комплекса (Wang et al., 2021).

В отличие от них двуцепочечные кластеры, такие как *42AB*, *38C*, транскрибируются в обоих направлениях с помощью комплекса RDC (*rhino*, *deadlock*, *cutoff*) и белка *mael*. Роль последнего состоит в том, чтобы репрессировать запуск транскрипции с канонических сайтов. RDC, в свою очередь, запускает транскрипцию с неканонических сайтов. Rhino (Rhi), гомолог гетерохроматинового белка Hp1, распознаёт метки H3K9me3 и связывается с данным участком ДНК. Данное метилирование является репрессорным за исключением случаев двуцепочечных кластеров рiРНК, где такие метки, наоборот, являются сигналом к запуску транскрипции. Rhino связывается с Deadlock (Del), который служит переходным звеном к белку Cutoff (Cut). Функция Cutoff заключается в препятствии преждевременной терминации транскрипции, запущенной с неканонического сайта и конкуренции с комплексом CBC (cap binding complex). Cuff является гомологом 5'-3' экзонуклеазы Rail/DXO. Он конкурирует с CBP80 и CBP20, которые навешивают cap (Hirakata and Siomi, 2016). Благодаря работе комплекса RDC получают различные

транскрипты, сплайсинг которых запрещается благодаря отсутствию cap и полиаденилирования (Wei et al., 2021) (Рис.5).

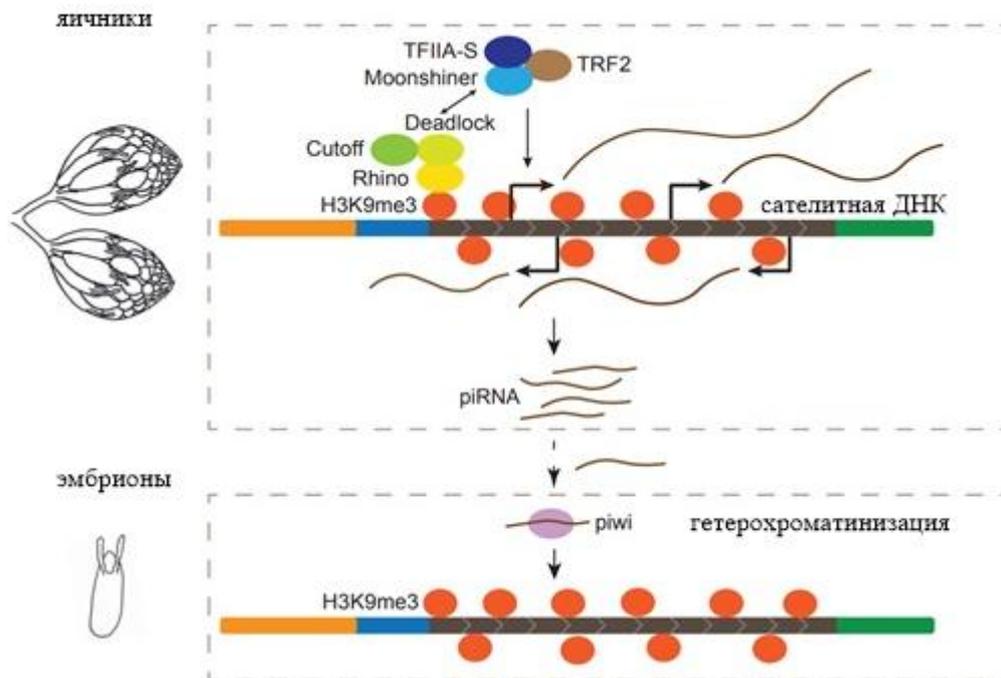


Рисунок 5. Модель поддержания сателлитной ДНК в качестве источника piРНК (Weietal, 2021). Пояснения в тексте.

Комплекс RDC является быстро эволюционирующим. Так у ближайшего вида, *D. simulans*, белок Rhino не может взаимодействовать с Del *D. melanogaster*. У белков семейства Hp1 есть три домена: shadow, chromo и hinge. Chromo отвечает за связывание с метками H3K9me3, hinge связывается с ДНК и РНК, а shadow необходим для связывания с Del, который является соединительным звеном между Rhi и Cut. Было показано, что химерный белок Rhi, в котором домен shadow заменён на домен shadow из *D. simulans*, не способен восстановить продукцию piРНК у мутантов по *rhi*, так как теряет способность связываться с Del и образовывать комплекс RDC. Авторы работ в этой области предполагают, что такая стремительная эволюция *rhi* связана с присутствием в клетке продуктов ретротранспозонов, способных к мимикрии белка Rhi, и, следовательно, конкуренции с ним за связывание с Del. Однако доказательств этого предположения пока найдено не было. Особый интерес представляет тот факт, что замена домена chromo-домена восстанавливает сайленсинг ретротранспозонов, кроме *Tirant* (Parhad et al., 2017; Yu V. et al., 2018). Однако, гетерохроматиновые метки H3K9me3 располагаются не только на кластерах piРНК, более того, Rhi способен взаимодействовать и с метками H3K9me2

(Mohn et al., 2014). Есть дополнительный белок, Kipferl, который взаимодействует с мотивами гуанин-богатых участков (GRGGN). Этот белок связывается непосредственно с ДНК благодаря наличию доменов «цинковые пальцы». Считается, что, отчасти благодаря ему, происходит полоспецифичная регуляция кластеров, так как этот белок не экспрессируется в семенниках, в которых репертуар кластеров отличается от яичников. Rhi связывает Kipferl через chromo-домен, и это позволяет стабилизировать комплекс RDC именно на последовательностях кластеров (Baumgartner et al., 2022).

Помимо комплекса RDC в транскрипции двуцепочечных кластеров участвуют белки: Moonshier (moon), паралог транскрипционного фактора TFIIA-L, связывается с Del и TFIIA-S, чтобы привлечь TATA-бокс-связывающий белок TKA2, который необходим для инициации транскрипции РНК-полимеразой II (Andersen et al., 2017; Sato and Siomi, 2018). Гены, кодирующие эти белки, тоже быстро эволюционируют, без них не происходит инициации транскрипции с неканонических сайтов (Parhad et al., 2020). Благодаря им транскрипция кластера может начинаться с любого сайта, где чередуются пиримидиновые и пуриновые динуклеотидами (Sato and Siomi, 2018). В препятствии сплайсингу и экспорте из ядра задействована РНК-хеликаза UAP56 (DEAD-бокс-РНК хеликаза), которая вместе с Cut защищает РНК от сплайсинга. Взаимодействуя с Thoc5, UAP56 является одним из коровых компонентов комплекса TREX. Дальнейший экспорт несплайсированных транскриптов в цитоплазму осуществляется с помощью Nxf3, который взаимодействует с UAP56 и Bootlegger. Также для экспорта необходимо взаимодействие с С-концом Nxf3 белка Crml (Wang et al., 2021). Белки Nxf3, Crml и Bootlegger входят в состав белков ядерного порового комплекса и ядерной оболочки (Kneuss et al., 2019). Благодаря этим белкам транскрипт экспортируется из ядра. Однако связываться с транскриптом они начинают ещё на этапе транскрипции. Например, мутация в гене, кодирующем Thoc5, приводит к снижению уровня экспрессии рiРНК. Таким образом, белки, необходимые для экспорта транскриптов двуцепочечных кластеров влияют не только на экспорт, но и на саму транскрипцию (Hur et al., 2016; Sato and Siomi, 2018).

Механизм транскрипции кластера рiРНК зависит от его организации. Помимо этого, кластеры экспрессируются ткане- и полоспецифично (Chen et al., 2021). Так у *D. melanogaster* в соматических клетках яичников работает кластер *flamenco*, который транскрибируется однонаправленно. Считается, что копии ретротранспозонов в этом кластере встроены в одном направлении. Однако повторное картирование кластера выявило, что в нём присутствуют элементы, которые встроены так, что транскрибируются

в смысловом направлении. Кроме этого было показано, что некоторые ретротранспозоны представлены в кластере в нескольких копиях, отличающихся полнотой последовательности, что свидетельствует о постоянной динамике между наличием полноразмерных копий ретротранспозонов в кластере и всплеском активности определённых ретротранспозонов в геноме. Таким образом, делеция участка кластера может приводить к повышению экспрессии ретротранспозонов, которые контролируются делетированным участком (Zanni et al., 2013). Важно отметить, что кластер *flamenco* также участвует в подавлении активности ретротранспозонов не только в яичниках дрозофилы, но и в мозге, выполняя роль источника endo-siРНК (Guida et al., 2016). 20,8 % piРНК производятся из транскриптов кластера *42AB*, который является двуцепочечным и транскрибируется в питающих клетках яичников дрозофилы (Yang and Xi, 2017) Стоит отметить, что выводы о типе кластера принято делать на основе картированных на них piРНК. До сих пор не удалось поднять ни одного полноразмерного транскрипта, так как кластеры по протяжённости составляют несколько десятков тысяч пар нуклеотидов (Théron et al., 2014). Как мы упоминали ранее, репертуар транскриптов кластеров у самцов дрозофилы отличается от самок: *38C* – это основной кластер для них. Помимо него в зависимости от пола по-разному экспрессируются *40F7*, *Sx102F* и *80EF*. Механизмы полспецифичной регуляции кластеров, вероятно, зависят от экспрессии факторов инициации их транскрипции, однако пока таких причинно-следственных связей известно не много (Chen et al., 2021; Wei et al., 2021).

По последним данным кластер *20A*, являясь одноцепочечным, экспрессируются как в соматических клетках яичников, так и в клетках зародышевого пути. Более того, кластер *42AB* транскрибируется с неканонических сайтов в одном направлении, а в другую сторону могут использоваться канонические сайты. Кластер *38C* способен транскрибироваться с канонических сайтов в обе стороны (Parhad et al., 2020). Учитывая, что кластер *20A* является Rhino-независимым, а аппарат процессинга Rhino-независимых кластеров, работает именно в соматических тканях яичников (об этом будет подробнее сказано далее), особый интерес представляет вопрос процессинга его транскриптов в клетках зародышевого пути. Более того, на данный момент остаётся неизученным, почему двуцепочечные кластеры обладают двумя вариантами транскрипции, и есть ли различия в дальнейшем процессинге транскриптов в зависимости от того, с какого сайта начиналась транскрипция.

Важно отметить, что на данный момент можно наблюдать транскрипцию в качестве источников piРНК и сателлитных последовательностей репрессированных

ретротранспозонов наряду с полноценными кластерами. По этой причине согласно современной теории ретротранспозоны кластеризуются без влияния организующих механизмов клетки, как это происходит в системе CRISPR-Cas у бактерий. Однако невозможно выявить абсолютно все стадии развития кластера рiРНК (Carthew and Sontheimer, 2009; Guerreiro, 2012; Yamanaka et al., 2014). В настоящий момент есть только примеры транскрипции в качестве источника рiРНК отдельных инсерций ретротранспозонов (Olovnikov et al., 2013).

В заключение обсуждения вопроса о кластерах рiРНК необходимо сказать, что по современным данным новые вставки мобильных элементов могут становиться источниками рi- и endo-si-РНК после инактивации на уровне транскрипции и появлении меток H3K9me3. Так одиночные копии I-элемента, относящегося к группе LINE, могут играть роль источников рiРНК, причём эти кластеры делятся на сильные и слабые в зависимости от обогащения данных участков генома белком Rhi. Более того, старые копии I-элемента в линии R (чувствительна к I-элемент–индуцируемому гибриднему дисгенезу) могут являться источниками первых рiРНК для установки меток H3K9me3 на новых инсерциях, причём сила новых кластеров зависит от частоты взаимодействия с Rhi (Akulenko et al., 2018; Cui et al., 2021; Komarov et al., 2020). Также источником рiРНК может служить сателлитная ДНК с метками H3K9me3; транскрипты с таких участков присутствуют не только в гонадах, но и различных тканях тела (Wei et al., 2021).

Особый интерес представляет регуляция теломерных LINE. Известно, что теломерные сателлитные районы (TAS), а также теломерные транспозоны *HeT-A*, *TANRE* и *TART*, являются *rhino*-зависимыми источниками рiРНК и транскрибируются с двух цепей (Cui et al, 2021). Более того, гетерохроматиновые метки H3K9me3 обнаруживаются у дрозофилы и на теломерах в соматических тканях (Radion et al, 2018). Повышение активности теломерных транспозонов не обязательно приводит к удлинению теломер за счёт активной транспозиции. Так, мутация гена *hiphop* (привлекает белок Hpr1a для метилирования) приводит к значительному увеличению экспрессии теломерных ретротранспозонов без повышения транспозиционной активности (Cui et al., 2021). Показано, что мутации генов *spnE* и *enok* системы рiРНК-интерференции приводит к повышению экспрессии различных семейств ретротранспозонов, включая теломерные (Tsai and Huang, 2021).

В свете новых экспериментальных данных роль крупных кластеров рiРНК в замалчивании мобильных элементов подвергается пересмотру. Кластеры эволюционируют с колоссальной скоростью, поэтому у разных видов может

обнаруживаться различных набор кластеров. Причём чаще всего эволюция происходит за счёт инсерции новых копий мобильных элементов, нежели делеций участков. Инсерции в кластерах поддерживаются отбором (Wierzbicki et al., 2023; Zhang et al., 2020). Более того, делеция большей части кластеров может не приводить к повышению экспрессии мобильных элементов и не влиять на фертильность, о чём свидетельствуют экспериментальные данные (Gebert et al., 2021).

Учитывая вышеописанные факты, современная модель контроля ретротранспозонов приобретает несколько иные черты. Вероятно, что первыми источниками рiРНК могут быть осколки мобильных элементов, которые находятся в кластерах, однако часть действующих против мобильных элементов рiРНК транскрибируется с новых одиночных копий (они же могут быть источниками endo-si-РНК) благодаря работе комплекса RDC. Однако в этом свете не до конца ясна роль, эволюция и регуляция транскрипции одноцепочечных кластеров.

#### **2.4.2. Процессинг рiРНК**

Как указывалось ранее, в соматических клетках яичников работает только механизм, необходимый для процессинга транскриптов одноцепочечных кластеров. Эти транскрипты сразу содержат только антисмысловые участки по отношению к ретротранспозонам, претерпевающим замалчивание. В связи с этим, для успешного замалчивания ретротранспозонов с помощью таких транскриптов нет возможности для вырезания рiРНК по матрице ретротранспозонов. Таким образом, транскрипты одноцепочечных кластеров сплайсируются и нарезаются на рiРНК без амплификации (Théron et al., 2014).

Все белки, которые участвуют в рiРНК интерференции можно поделить на три группы: белки с симметричными либо несимметричными диметиларгенинами, которые выполняют ферментативную функцию; белки с Tudor-доменами (метил-лизин-связывающие контролирует процесс гетерохроматинизации, метил-аргинин-связывающие контролируют процессинг рiРНК) – выполняют роль скаффолда, взаимодействуя с белками из первой группы; белки, которые не относятся ни к одной из вышеперечисленных групп, но также важны для биогенеза рiРНК – в их число входят компоненты ядерного порового комплекса и кофакторы РНК-полимеразы II. Потенциально 142 гена дрозофилы вовлечены в механизм рiРНК-интерференции. (Handler et al., 2013; Ishizu et al., 2012; Zhang et al., 2018).

После альтернативного сплайсинга транскрипты одноцепочечных рiРНК-кластеров перемещаются в цитоплазму по механизму, описанному выше. Структура, которая отвечает за нарезание длинных транскриптов одноцепочечных кластеров на более короткие, называется «Жёлтое тельце» и располагается на внешней мембране митохондрий благодаря тому, что один из компонентов этого белкового комплекса, Zucchini (ZUC) представляет собой фосфолипазу D и локализован на внешней мембране митохондрий. Вероятно, именно этот белок и играет эффекторную роль в процессинге рiРНК, так как обладает РНК-эндонуклеазной активностью. Данный белок является очень древним, так как у бактерий есть похожая нуклеаза NUC, которая разрезает ДНК (Nishimasu et al., 2012; Voigt et al., 2012). ZUC процессирует длинные транскрипты одноцепочечных кластеров на 23-29 н. рiРНК. Однако для разрезания длинных транскриптов также необходимы и другие белки: Yb, специфичный для соматических клеток яичников белок, который взаимодействует с длинными транскриптами кластеров через N-концевой домен ResA, также обладает Tudor-доменами, хеликаза Armitage (Armi), шаперон Hsp90, ко-шаперон Shutdown (Shu), Vret, белок с Tudor-доменами, а также белки Minotaur (Mino/GPAT2) (обладает трансмембранным доменом для локализации на митохондрии), Daedalus (Dae1) (обладает трансмембранным доменом для локализации на митохондрии) и GasZ (обладает трансмембранным доменом для локализации на митохондрии, адаптерный белок для Armi) (Handler et al., 2013; Théron et al., 2014; Yang and Xi, 2017). Важно отметить, что нередко Жёлтые тельца у дрозофилы находятся рядом с Р-тельцами, которые участвуют в ответе на стресс (Wilby and Weil, 2023). Тест-система, состоящая из репортера *lacZ* и регуляторных участков двух разных ретротранспозонов, *gypsy* (подавляется в соматических клетках яичников) и *Burdock* (подавляется в питающих клетках), показывает, что нокдаун митохондриальных генов больше всего выражается в дерепрессии *gypsy*, что свидетельствует о важности этих органелл для рiРНК-интерференции в соматических тканях (Handler et al., 2013).

Далее происходит дополнительное подрезание 3'-конца рiРНК и метилирование метилтрансферазой Hsp-1 в положении 2'-О с последующей загрузкой в PIWI. Hsp-1 участвует не только в метилировании рiРНК, но ещё и siРНК, поэтому мутации, которые приводят к потере функции этого белка, положительно влияют на экспрессию ретротранспозонов (Soleimani et al., 2020; Théron et al., 2014). Привлекает PIWI в Жёлтое тельце белок с Tudor-доменами Papi. Его функция состоит в тримминге 3'-конца рiРНК, распознавании аминокислотной последовательности RGRRR на N-конце PIWI и загрузке рiРНК. Сам PIWI, в отличие от других белков семейства Argonaute, не обладает

эндонуклеазной активностью и занимается исключительно поиском экспрессирующихся последовательностей в ядре по гидовой piРНК (Zhang et al., 2018). PIWI, AGO3 и AUB имеют общий план строения: PAZ-домен для связывания метилированного 3'-конца РНК в гидрофобном кармане (Simon et al., 2011), MID-домен для связывания 5'-конца РНК и домен РНКазы-Н, который необходим для разрезания дуплексов РНК-РНК в пинг-понг цикле. У PIWI же этот домен потерял свою функцию в ходе эволюции (Yang and Xi, 2017). PIWI имеет посттрансляционную модификацию, которая позволяет ему взаимодействовать с Tudor-доменом Par1 – диметиларгенины, которые появляются благодаря метилтрансферазе dPRMT5. Её мутация также приводит к сильному нарушению работы системы piРНК-интерференции, так как PIWI, как было указано ранее, не единственный белок в этой системе с такой модификацией (Nishida et al., 2009).

После всех модификаций piРНК, связанные с PIWI, перемещаются в ядро с помощью Karybeta, белка импорта. Это тоже консервативный белок, гомологи которого есть и у млекопитающих (Yashiro et al., 2018). Важно отметить, что PIWI работает и в соматических клетках, и в клетках зародышевого пути. В последних он получает первичные piРНК из цикла «пинг-понг», о котором будет рассказано позже. Основная роль PIWI заключается в поиске последовательностей мобильных элементов с помощью направляющих piРНК и привлечении белка Asterix, который является связующим звеном PIWI с комплексом SFiNX, который состоит из гетеродимера Nxf2-Nxt-1 (белков ядерной оболочки), Panx (Panoramix) и Cut up, функция которого связана с работой моторного белка динеина. Для начала репрессии хроматина Panx должен быть сумоилирован Smt3, что происходит только в присутствии PIWI, а также провзаимодействовать с Sov (Small ovary). Сумоилирование стабилизирует Panx на хроматине. У Panx есть три домена: IDR – необходим для сайленсинга (взаимодействует с Sov), NRC и С-концевой домен, которым он связывается с Cut up (Andreev et al., 2022). Все эти белки являются факторами запуска гетерохроматинизации участков, содержащих мобильные элементы (Schnabl et al., 2021; Théron et al., 2014) (Рис.6). Комплекс SFiNX способствует ассоциации рибозима piРНК-PIWI с целевым участком ДНК, 90% сайтов, с которыми связывается PIWI, находятся в эухроматине (Liu et al., 2021; Yamaguchi et al., 2020). Белок Nxf2 связывается с целевой РНК через LRR-домен, что позволяет закрепить весь комплекс над целевым участком ДНК. Привлечением гетерохроматиновых белков H1, HP1, Lsd1 и Su(var)2-10 занимается белок Egg с кофактором Windel, который обеспечивает его посадку на хроматин (Onishi et al., 2020; Osumi et al., 2019). Его же привлекает Panx благодаря Su(var)2-10 и SUMO3. Для начала метилирования Egg должен быть убиквитинирован Ubc2 (Onishi et al., 2021).

Lsd1 вместе с кофактором CoREST осуществляют снятие активных меток с H3K4 (Yu B. et al., 2018). Белки MEP-1, Mi-2 и Rpd3 также собираются в комплекс и деацетилируют H3K4 (Mugat et al., 2020). Антагонистом этого каскада является работа комплекса PAF1, который отвечает за элонгацию РНК-полимеразы II и прикрепление активационных меток H3K9me3. Снижение активности работы этого комплекса снижает образование piРНК с одноцепочечных кластеров, таких как *flamenco*, но усиливает сайленсинг мобильных элементов с помощью PIWI (Clark et al., 2017). Важно отметить, что мутации *piwi*, *aub* и *spn-E* приводят к нарушению локализации гетерохроматиновых меток на политенных хромосомах слюнных желёз, однако Hrp1 взаимодействует с ДНК независимо от AGO2 и PIWI. Небольшое количество PIWI присутствует за пределами гонад, это количество белка трудно выявить, однако, как показано на мутантах, этого небольшого количества PIWI уже достаточно для выполнения функции гетерохроматинизации (Moshkovich and Lei, 2010).

Помимо этого, важную роль в дальнейшей судьбе неактивной последовательности мобильного элемента играет белок Mael (Maelstrom). В соматических клетках он необходим как для гетерохроматинизации, а в клетках зародышевого пути препятствует началу транскрипции РНК-полимеразой II с канонических сайтов. Таким образом, в клетках зародышевого пути вместе с комплексом RDC (rhino, deadlock, cutoff), запускающим транскрипцию с неканонических сайтов, Mael способствует превращению последовательности мобильного элемента в последовательность, продуцирующую антисмысловые РНК, вовлекаемые в цикл «пинг-понг» для процессинга piРНК (Chang et al., 2019). В настоящий момент известно, что в соматических тканях яичников экспрессируется Rhi, однако остаётся неизвестным, работает ли в них комплекс RDC, и какова дальнейшая судьба репрессированных последовательностей мобильных элементов (Volpe et al., 2001). Считается, что Mael и Panx действуют независимо друг от друга. Mael контролирует мобильные элементы, которые зависят от АТФазы Brachma (Brm), например, *mdg1*. PIWI транспортируется в ядро с помощью ядерных импортинов (Karybeta, importin $\alpha/\beta$ ) и, соединяясь с Mael, убирает комплекс SWI/SNF, в состав которого входит Brm. В отличие от Mael, у Panx диапазон регулируемых областей гораздо шире (Onishi et al., 2020; Yashiro et al., 2018). Таким образом, инактивация различных мобильных элементов не идёт с помощью одного и того же механизма.

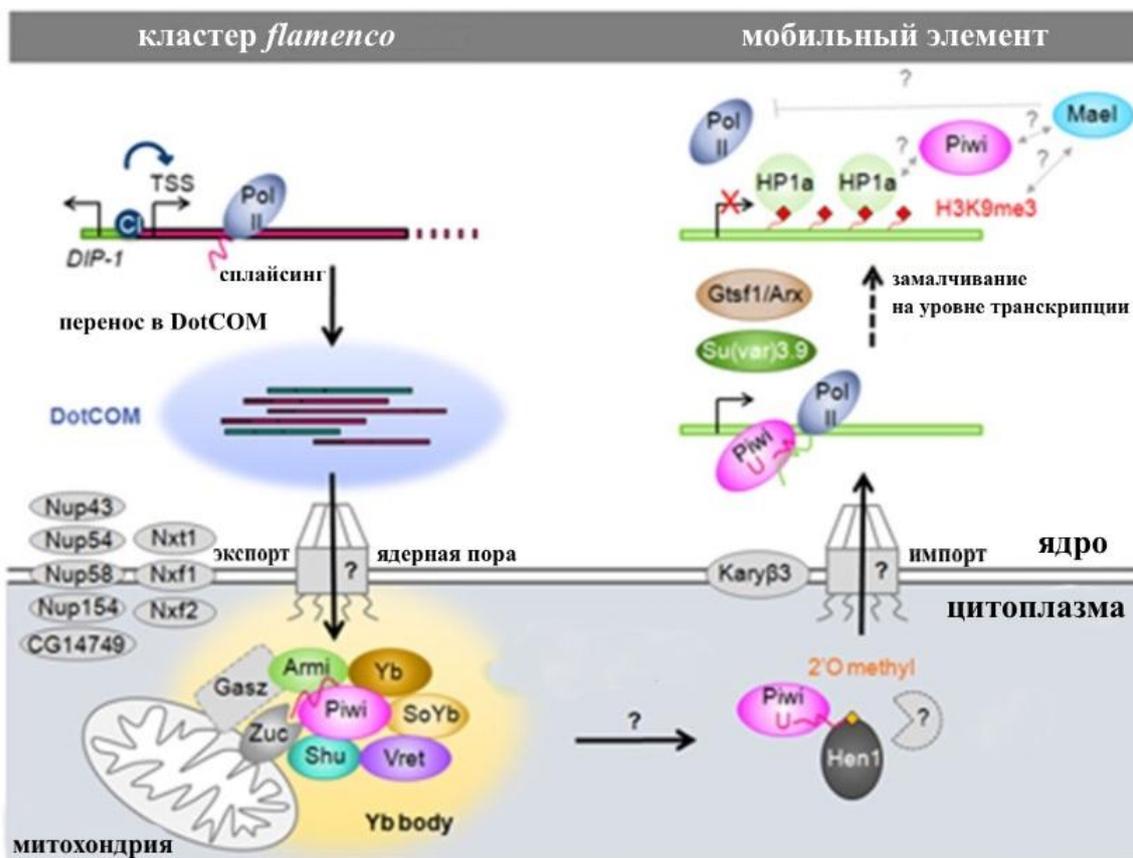


Рисунок 6. Механизм первичного биогенеза piRNA (по (Théron et al., 2014)). Пояснения в тексте.

Исследования последних лет показали, что PIWI контролирует не только активность мобильных элементов, но и препятствует накоплению фрагментов рРНК в яичниках. Более того, PIWI играет важную роль в формировании нервной ткани у нематоды и мыши (Kim, 2019). Для дрозофилы было показано, что кластер *flamenco*, транскрипты которого процессируются на направляющие РНК, принимает участие в формировании нервной системы у нематоды (Wakisaka et al., 2019).

В питающих клетках яичников piRNA образуются, в основном, из транскриптов двуцепочечных кластеров и альтернативный сплайсинг транскриптов кластеров отсутствует. В связи с этим последовательности транскриптов содержат как смысловые, так и антисмысловые транскрипты, и они процессируются с помощью механизма выборочного вырезания из пре-piRNA лишних фрагментов цикла «ping-pong». В отличие от соматических клеток яичников, в клетках зародышевой линии биогенез piRNA протекает в околоядерной области Ньюаж (Théron et al., 2014). Цикл «пинг-понг»,

представляет собой интерференцию piРНК, в ходе которой, помимо подавления мобильных элементов на транскрипционном уровне, появляются направляющие РНК, которые используются PIWI для замалчивания мобильных элементов на уровне транскрипции. Ньюаж состоит из следующих белков – Qin/Kumo (содержит Tudor-домены, обеспечивает гетеротипность цикла – передачу нарезанной РНК между Aub и AGO3 (Ishizu et al., 2012)), Spindle-E (SND-E), Krimper (KRIMP) (осуществляет привлечение AGO3 в Ньюаж, связываясь с диметиларгининами через Tudor-домен), Tejas (обладает Tudor-доменом, является посредником между Vasa и Aub, так как у Vasa таких доменов нет), Tudor (TRD) (обладает Tudor-доменом), Mael (структурный белок, обеспечивает локализацию TRD в Ньюаж (Anne, 2010)), Shu, BoYb, SoYb, Armi (РНК-хеликаза), Vasa (DEAD-box РНК-хеликаза, без неё не формируется Ньюаж, также обеспечивает транспорт нарезанных РНК от Aub к AGO3, использует АТФ в качестве источника энергии) (Claycomb, 2014; Hirakata and Siomi, 2019). Последовательность сборки Ньюаж примерно следующая: Mael, TUD, Vasa, Tejas, SPN-E-, AUB, KRMP, AGO (Nagao et al., 2011; Patil and Kai, 2010). Также Mael играет важную роль в гетерохроматинизации и запрете запуска транскрипции двуцепочечных кластеров piРНК с канонических сайтов, о чём было сказано выше.

Теперь рассмотрим процесс амплификации piРНК. Сначала piРНК с U на 5'-конце (антисмысловый транскрипт) и мРНК транспозона (смысловый транскрипт) связывает Aub. Его PIWI-домен (обладает активностью РНКазы-N) разрезает комплементарный участок, отступая 10 п.н. от 5'-конца пре-piРНК, в результате такого разрезания на 10-й нуклеотид от 5'-конца мРНК транспозона всегда приходится A (Gebert et al., 2019). Затем неизвестный фермент отрезает часть от мРНК ретротранспозона и её 3'-конец обрабатывает метилтрансфераза Hen1. Vasa совместно с Tejas осуществляют перенос укороченного транскрипта ретротранспозона в AGO3. AGO3, в свою очередь дополнительно получает антисмысловый транскрипт кластера piРНК и разрезает образованный дуплекс таким образом, что после разрезания антисмысловый транскрипт содержит U на 5'-конце. Теперь антисмысловый транскрипт укорачивается, метилируется, и Vasa передаёт его к Aub, чтобы начать цикл заново. Таким образом, после каждого нового цикла получают новые piРНК, которые вырезаются из антисмысловых транскриптов кластеров по матрице ретротранспозонов. Тут клетка получает двойную выгоду, так как ей не нужно тратить ресурсы на процессинг транскриптов и саму интерференцию отдельно – всё происходит в рамках одного процесса (Aravin et al., 2007; Brennecke et al., 2007; Hirakata and Siomi, 2019; Siomi et al., 2011) (Рис.7). Помимо этого,

часть процессированных антисмысловых транскриптов из цикла «пинг-понг» забирает белок PIWI, и использует их в качестве направляющих piРНК по тому же механизму, что в соматических клетках яичников.

Важно указать, что в компоненты системы piРНК-интерференции являются не только важными факторами подавления ретротранспозонов, но и активными участниками эмбриогенеза дрозофилы. Так, *Yb* экспрессируется в делящихся стволовых клетках, а *ZUC* отвечает за осевую разметку эмбрионов и контролирует экспрессию генов *Grk* и *Osk* (Pane et al., 2007). *Piwi* настолько критичен для развития, то мутации с образованием нуля-аллеля в гомозиготе часто приводят к гибели организма. Также известно, что piРНК регулируют ряд генов у дрозофилы и обнаруживаются даже на стадии личинки (Huang et al., 2021).

Скорее всего, эти эффекты, оказываемые мутациями белков-участников piРНК-интерференции на развитие, связаны не столько с резким повышением экспрессии ретротранспозонов, сколько с изменением регуляции генов. Как упоминалось ранее, этот же фактор может быть одной из причин гибридного дисгенеза и межвидовой изоляции (Senti and Brenneke, 2010). Около 10% от всех piРНК имеют происхождение из 3'- и 5'-нетранслируемых областей транскриптов, причём, кластерная часть в 95% случаев ориентирована по направлению транскрипции мРНК. К таким примерам можно отнести вышеупомянутые гены *traffic jam*, *AT-chX*, *Hsp70* (этот белок также входит в состав Ньюаж). Причиной превращения нетранслируемых областей в кластеры, вероятно, являются древние вставки ретротранспозонов, которые в настоящий момент утратили все признаки предковых последовательностей, поэтому не распознаются биоинформатическими методами (Ramat and Simonelig, 2021; Sarkar et al., 2017; Spradling, 2018).

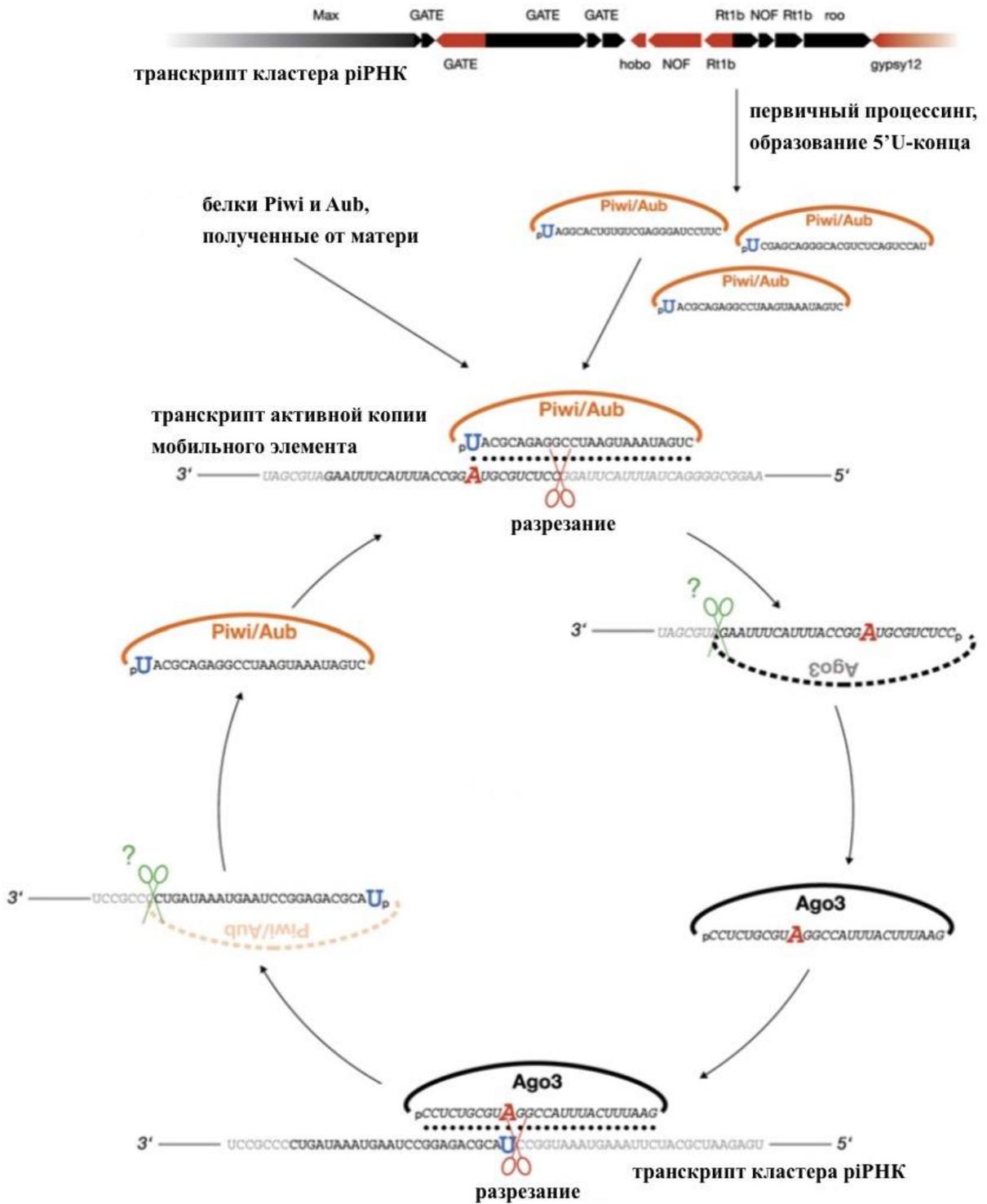


Рисунок 7. Цикл «пинг-понг» (по (Brennecke et al., 2007)). Пояснения в тексте.

### 2.5. Активация ретротранспозонов во время стресса

Стресс – это защитная реакция в ответ на воздействие различных неблагоприятных факторов. Это состояние может быть вызвано, как внешними, так и внутренними факторами по отношению к живой клетке. Абиотический и биотический стрессы

представляют собой реакции, которые развиваются в ответ на воздействие агентов химической, физической природы либо вирусов или бактерий соответственно. В отдельную категорию выделяют геномный стресс, который представляет собой мутации, лишаящие геном защиты от внутренних факторов клетки, которые могут привести к нарушению целостности её ДНК, например, механизма репрессии мобильных элементов (Guerreiro, 2012).

Один из самых ярких и первых исследованных примеров геномного стресса можно наблюдать при скрещивании разных видов либо лабораторных линий дрозофилы. (Guerreiro, 2012). Например у гибридов *D.buzzatii* и *D.koepferae* частота транспозиции мобильного элемента *osvaldo* оказывается выше, чем у родителей (Labrador and Fontdevila, 1994), а у гибридов *D. virilis* and *D. littoralis* - *pDv111* (Evgen'ev et al., 1982). Самые известные варианты геномного стресса были впервые описаны Kidwell в 70-х годах и это явление носит название гибридного дисгенеза (Kidwell et al., 1977; Kidwell and Novy, 1979). Причина повышения частоты транспозиции отдельных ретротранспозонов при скрещивании разных видов, согласно распространённой теории, заключается в разных репертуарах мобильных элементов и рiРНК, которые являются основным инструментом препятствия транспозиции в генеративных тканях, у разных видов. РiРНК поставляются в будущее яйцо благодаря питающим клеткам, и играют важную роль не только в подавлении мобильных элементов, но и раннем эмбриональном развитии, о чём будет сказано далее. Считается, что в случае, когда у самки нет определённых мобильных элементов и, соответственно, подходящих рiРНК, то мобильные элементы, привносимые в яйцо с геномом отца не встречают сопротивления в виде механизма рiРНК-интерференции и могут бесконтрольно перемещаться внутри генома зиготы, вызывая новые мутации, что нередко приводит к резкому снижению фертильности межвидовых гибридов. В обратном скрещивании данного эффекта не наблюдается, так как самка уже имеет рiРНК ко всем последовательностям мобильных элементов, которые попадают в зиготу с геномом самца. (Brennecke et al., 2008, 2007; Chambeyron et al., 2008). Самыми первыми примерами внутривидового гибридного дисгенеза у *D. melanogaster* стала транспозиция трёх мобильных элементов при скрещивании лабораторных линий: Р-М (*P-element*), I-R (*I-element*) и H-E (*hobo*) (Kidwell et al., 1977; Picard et al., 1978; Yannopoulos G. et al., 1987). Также случаи мобилизации различных элементов в результате гибридного дисгенеза были описаны у *D. virilis* (*Ulysses*, *Penelope*, *Paris* и *Helena*) (Petrov et al., 1995).

Однако, согласно современным представлениям, стоит отметить, что причина гибридного дисгенеза на самом деле не кроется только в простой мобилизации отдельных

ретротранспозонов и повышенном мутагенезе. Частично, само повышение их активности может быть вызвано подавлением экспрессии отдельных белков-участников системы piРНК-интерференции, речь о которых пойдёт дальше. Например, ген *Hsp70* имеет в 3'-конце источник piРНК. Предположительно, это древняя инсерция piРНК МГЭ, которая ориентирована коллинеарно транскрипции. Таким образом, ген, который является участником системы piРНК-интерференции, сам же подвергается регуляции со стороны этой же системы (Spradling, 2018). В случае *vasa AT-chX* piРНК имеют большую схожесть с 3'-последовательностью мРНК *vasa D.mauritania*. В данном случае при межвидовом скрещивании различные отклонения в фертильности самцов происходят не только по причине мобилизации ретротранспозонов, но и частично в связи с подавлением с помощью piРНК-интерференции экспрессии отдельных отцовских генов в гетерозиготе (Nishida et al., 2007). Более того, piРНК также являются механизмом репродуктивной изоляции у дрозофилы, что продемонстрировано на кластере *Stellate* (Adashev et al., 2021).

Если рассматривать явление геномного стресса в широком смысле, то можно отнести к нему мутации в кластерах piРНК и различных генах, которые кодируют белки, необходимые для биогенеза piРНК. В частности, для инсерции *gypsy* в ген *cut* было показано, что пенетрантность фенотипа, выражающегося в неспособности мухи освободиться от покровов куколки, зависит от балансерной хромосомы TM6b (Guida et al., 2016). Таким образом, регуляция активности ретротранспозонов зависит не только от состояния системы РНК-интерференции, но и от общего генетического фона.

Ещё Барбарой МакКлинток было предположено, что активация ретротранспозонов в ответ на внешнее стрессовое воздействие может иметь не только негативные, но и положительные следствия для клетки хозяина (McClintock, 1984). В связи с этим роль ретротранспозонов во время абиотического стресса представляет особый интерес. Прежде всего, интересным с практической точки зрения представляется исследование влияния различных химических агентов, с которыми могут сталкиваться насекомые - такие, как перекись и паракват. Однако перекись быстро разлагается, в связи, с чем стресс вызвать ей оказывается затруднительно (Arnault et al., 1991). Влияние более стабильных окислителей на экспрессию МГЭ было описано не только у дрозофилы, но и у других эукариот. Например, у паразитического гриба риса *Magnaporthe grisea* промотор ДКП-ретротранспозона группы *gypsy* *MAGGY* способен к активации во время обработки организма паракватом, и, более того, также активен при тепловом шоке и обработке ионами меди (Ikeda et al., 2001). Также паракват способен активировать ретротранспозон группы *copia* *Tnt1* у *Arabidopsis thaliana*, но у табака такой активации при сходных

условиях не происходит. Кроме этого, было показано, что промотор *Tnt1* активируется в ответ на повреждения растения и ряд других факторов (Mhiri et al., 1997). Таким образом, даже один и тот же МГЭ у разных растений не обязательно реагирует на одно и то же стрессовое воздействие, что может быть связано как с последовательностью самого транспозона, так и с его регуляцией в разных геномах. На дрозофиле в последние два года были проведены комплексные исследования, благодаря которым было показано, что во время голодания, обработки диоксинами, тоуленом, формальдегидом, и разными дозами облучения у дрозофилы большинство активированных МГЭ принадлежит именно к ретротранспозонам, более того, репертуар в ответ на каждый тип воздействия не одинаков, и этот репертуар расширяется с усилением стрессового воздействия (Oliveira et al., 2021).

На уровень экспрессии ретротранспозонов во время стресса также может влиять положение отдельных его копий в геноме (Horváth et al., 2017). В случае окислительного стресса существует обширная сеть генов и, следовательно, нахождение ретротранспозона рядом с активированным в ответ на стрессовое воздействие геном могло бы объяснить мобилизацию отдельных ретротранспозонов. В снижении уровня содержания активных форм кислорода, причины окислительного стресса, непосредственное участие принимают ферменты супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионтрансфераза (Le Bourg, 2001). Помимо этого, при окислительном стрессе запускаются сразу несколько сигнальных путей, так как воздействие окислителем может приводить к модификации белков, липидов и ДНК. Это сигнальные пути JAC/STAT, ERK, JNK, FOXO, MAPK, NFκ-b, keap1/CncC, PI(3)K/Akt, а также белки Hsp22 p53 и p38 (Finkel and Holbrook, 2000; Morrow et al., 2004; Sykiotis and Bohmann, 2008; Tettweiler et al., 2005; Wang et al., 2003; Zou et al., 2000). Так как эти пути не специфичны к конкретному окислителю, нахождение копий ретротранспозона рядом с геном одного из этих путей могло бы объяснить, почему отдельные ретротранспозоны активируются на большее число воздействий, чем другие. Однако, принимая во внимание то, что большинство стресс-индуцируемых ретротранспозонов являются ДКП-ретротранспозонами, и именно ретротранспозоны нередко являются источниками новых цис-регуляторных элементов, логичным объяснением активации ретротранспозонов во время стресса может являться наличие сайтов связывания транскрипционных факторов, которые работают при окислительном стрессе. Например, у *D. melanogaster* и *D. simulans* инсерции *Accord* и *Doc* соответственно рядом с геном *Cyp6g1* повышают устойчивость мухи к ксенобиотикам (Chung et al., 2007; Schlenke and Begun, 2004). Также стоит отметить, что целый ряд ретротранспозонов,

включая *gypsy*, *blood*, *copia* и *springer* участвуют в регуляции эмбриогенеза у *D. melanogaster* (Ding and Lipshitz, 1994). Причины такого влияния ретротранспозонов на регуляцию хозяйских генов во время стресса и эмбрионального развития связывают с наличием регуляторных элементов у ретротранспозонов. За эту регуляцию, помимо ДКП, отвечают также 5'НТО (нетранслируемые области) ретротранспозонов. Например, *copia* и *gypsy* содержат в них повторы и инсуляторы соответственно (Sneddon and Flavell, 1989). Предполагается, что такое строение ретротранспозонов позволяет усилить ответ на стрессовое воздействие, так как эти регуляторные последовательности помогают повысить экспрессию близлежащих генов (Moschetti et al., 2020). Однако на самом деле активация ретротранспозонов и близлежащих генов при стрессовом ответе не обязательно коррелируют друг с другом, более того, бывает и так что экспрессия ретротранспозона и гена может меняться в противоположенных направлениях (Oliveira et al., 2021). Если говорить о конкретном примере, то SINE *Alu* у человека, наоборот, снижается в ответ на стрессовое воздействие (Hwang et al., 2019).

Хронический тепловой стресс, помимо того, что является не химическим а физическим воздействием, также представляет большой интерес, так как связь температуры и причин активации ретротранспозонов могла бы объяснить почему копияность *412* положительно коррелирует с температурой у диких популяций *D. simulans* (Vieira et al., 1998). Схожую тенденцию также нашли у ячменя для *BARE-1* (Feschotte et al., 2002). В лабораторных условиях проводились эксперименты по индукции *copia* у самцов. Однако полученные результаты были плоховоспроизводимы (Arnault C. et al., 1991; Horváth et al., 2017; Junakovic et al., 1986; Ratner et al., 1992; Vázquez et al., 2007). Таким образом, остаётся неясным влияет ли температура содержания или резкая смена температурного режима на активацию транспозонов у животных и растений, а самое главное, до сих пор неизвестно, по каким механизмам может происходить это воздействие.

Таким образом, существует множество примеров стресс-индуцированной активации МГЭ во время стресса у ряда эукариот, причём для отдельных ретротранспозонов существует свой спектр условий. Широко известно, что ретротранспозоны активно работают в эмбриональных тканях. Тот же самое и характерно для растительных клеток *Nicotiana tabacum*, в которых уровень экспрессии ретротранспозонов *Tnt1*, *Tto1* и *Tto2* (группа *copia*) повышен при развитии растения из клеточной культуры, как и у *Oryza sativa* (*Tos10*, *Tos17* и *Tos19*) (Wessler, 1996). Положительное влияние ретротранспозонов при стрессе и эмбриональном развитии на

близлежащие гены и активация самих ретротранспозонов в этих процессах говорит о том, что вероятно, ретротранспозонов являются не столько паразитами, сколько симбионтами эукариотического генома. Остаётся только понять, какой из факторов активации является ведущим в этом вопросе: снижение активности системы репрессии, геномное окружение отдельных копий или же сами последовательности этих копий. Также остаётся загадкой, регулируется ли экспрессия ретротранспозонов во время эмбриогенеза и стресса общими механизмами.

Помимо индивидуальной реакции отдельных мобильных элементов на стрессовое воздействие, экспрессия транспозонов может зависеть от пола и от ткани. Так, теломерные LINE-элементы *HeT-A* и *TAHRE* наиболее сильно подавляются в яичниках, а ДКП-ретротранспозоны *blood*, *gypsy12*, *burdock*, *Transsib2* и *doc2* – в семенниках у самцов (Chen et al., 2021). В фолликулярных клетках яичников подавление активности мобильных элементов *ZAM* и *Tabor* зависит от кластеров, которые находятся в 3'-неколирующей области генов *traffic jam* и *GC32000*. Причём работа этих кластеров находится под контролем системы miРНК-интерференции: при снижении экспрессии основных участников этого пути, *Drosha* и *AGO1*, происходит снижение экспрессии miРНК *miR-14* и *miR34* что приводит к снижению piРНК против *ZAM* и *Tabor* (Mugat et al., 2015).

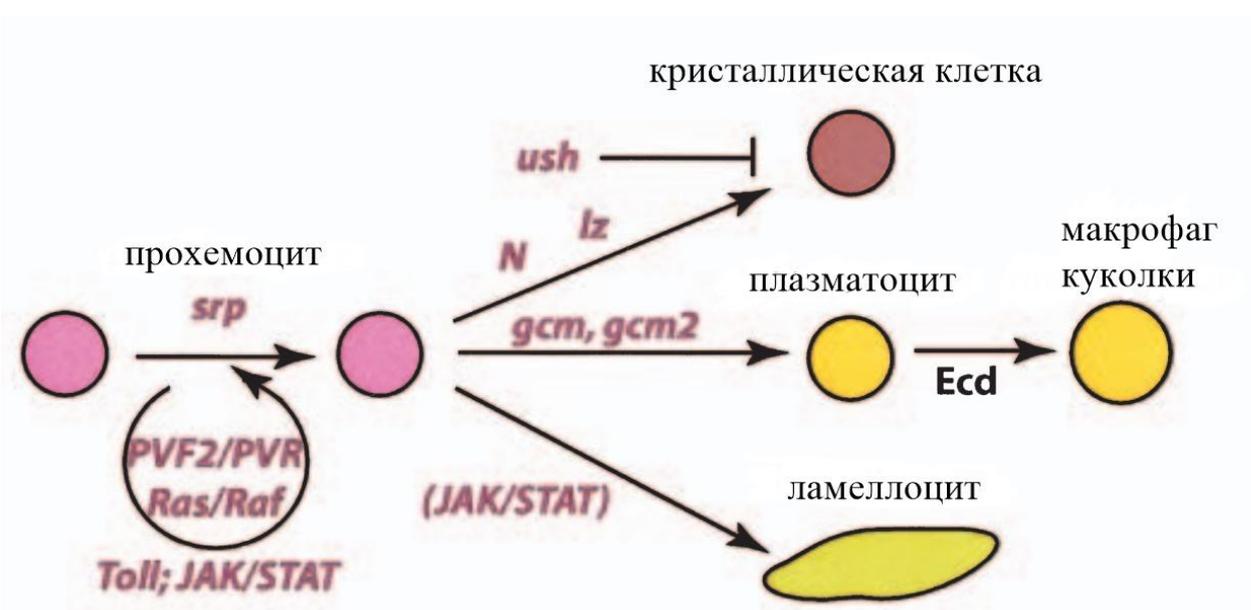
## **2.6. Клеточные механизмы ответа на окислительный стресс и их связь с регуляцией активности мобильных генетических элементов**

*Drosophila melanogaster* находит большое сходство в общей организации путей ответа на окислительный стресс с млекопитающими, поэтому является широко используемым модельным объектом для проведения исследований в этой области. Здесь мы кратко рассмотрим основные клеточные механизмы ответа на окислительный стресс у дрозофилы.

Как и у многих других организмов, у дрозофилы пути JAK/STAT, JNK, IMD и Toll не только являются компонентами системы врождённого иммунитета, но задействованы процессе эмбриогенеза. При инфицировании личинки дрозофилы, например, яйцом осы наездника, к месту пребывания паразита подходят клетки гемолимфы личинок – плазматоциты (будущие макрофаги куколки). Плазматоциты привлекают к месту инвазии ламелоциты, которые окружают яйцо осы и создают вокруг него капсулу (реакция инкапсуляции). Затем к капсуле приходят кристаллические клетки, и белок *Sepin-27 A* запускает каскад меланизации, регулируя сериновые протеазы, которые разрезают

профенолоксидазы, активируя их. Фенолоксидазы катализируют окисление фенолов до хинонов, которые полимеризуются в меланин (Meister and Lagueux, 2003). Таким образом, повышение количества активных форм кислорода, ведущее к окислительному стрессу, является одной из причин запуска иммунного ответа. Было показано, что окислительный стресс вызывает усиленный гематопоз, и запуск путей JAK/STAT, JNK, IMD и Toll, последний из которых как раз запускает реакцию меланизации у личинок в ответ на патогены (Dragh et al., 2017) (Рис.8).

Рисунок 8. Регуляция гематопоза у дрозофилы (Meister and Lagueux, 2003).



Пояснения в тексте.

Теперь кратко рассмотрим основные этапы этих четырёх механизмов. Как было указано выше, основным регулятором гематопоза является путь Toll: он отвечает за плотность и пролиферацию гемоцитов и запускается в ответ на грибную инфекцию и инфекцию грамположительными бактериями. В гемолимфе находятся белки, которые распознают пептидогликаны (PGRP (peptidoglycan recognition protein)). С грамположительными бактериями связывается белок PGRP-SA. Связываясь с пептидогликаном, PGRP-SA запускает каскад протеолитических реакций, в результате которых активируется зимоген SPE (spaetzle-processing enzyme), который, в свою очередь, разрезает белок Spaetzle. В случае грибной инфекции каскад активируется белком GGBP-3 (Hetru and Hoffmann, 2009).

После разрезания Spaetzle образует гомодимеры, которые взаимодействуют с рецептором Toll на поверхности гемоцитов. Это взаимодействие запускает димеризацию доменов TIR рецепторов Toll. После этого идёт последовательное взаимодействие с доменом TIR белка dMyD88 и последовательная передача сигнала через death-домены белков, Tube и Pelle. Pelle – сериновая киназа семейства IRAK – фосфорилирует следующую, неизвестную, киназу, которая фосфорилирует белок Cactus. Мутации в гене Cactus приводят к тому, что Dorsal конститутивно находится в ядре, а также к образованию меланотических опухолей (Valanne et al., 2011). Фосфорилированный Cactus (гомолог IκB млекопитающих) становится неактивным, подвергается убиквитинированию и деградирует в протеосомах. Cactus является ингибитором Dif и Dorsal. Свободный DIF отправляется в ядро, где вместе с Dorsal активирует ряд генов, включая ген, кодирующий Drosomysun. DIF и Dorsal являются транскрипционными факторами NF-κB (Hetru and Hoffmann, 2009) (Рис.9).

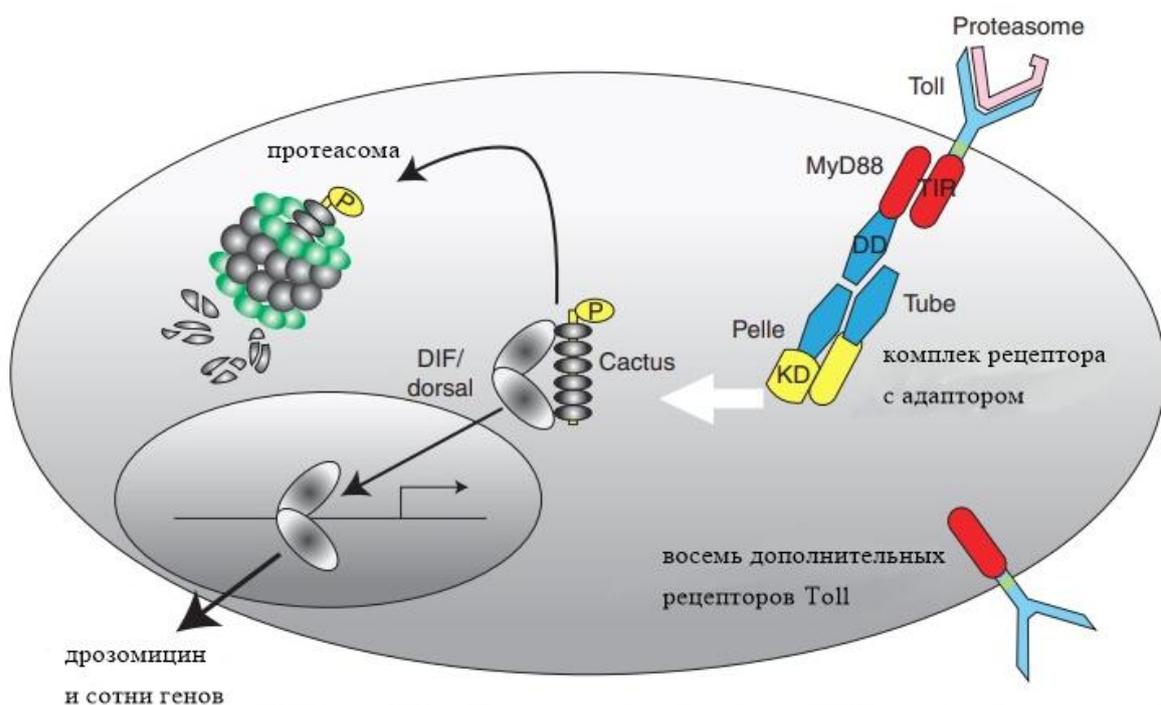


Рисунок 9. Путь Toll (Hetru and Hoffmann, 2009). Пояснения в тексте.

В случае инфекции грамотрицательными бактериями запускается путь IMD. В отличие от пути Toll, здесь рецептор к пептидогликанам PGRP-LC является трансмембранным. При связывании пептидогликана цитоплазматический домен PGRP-LC взаимодействует с адаптерным белком Imd, который в свою очередь взаимодействует с гомологом млекопитающих FADD и гомологом каспазы-8 млекопитающих, DREDD, что приводит к убиквитинированию MAP3-киназы (TAK1). TAK1 взаимодействует с гомологом соответствующего белка млекопитающих, Tab2, и этот гетеродимер фосфорилирует белок NF- $\kappa$ B Relish и запускает путь JNK (Рис.10).

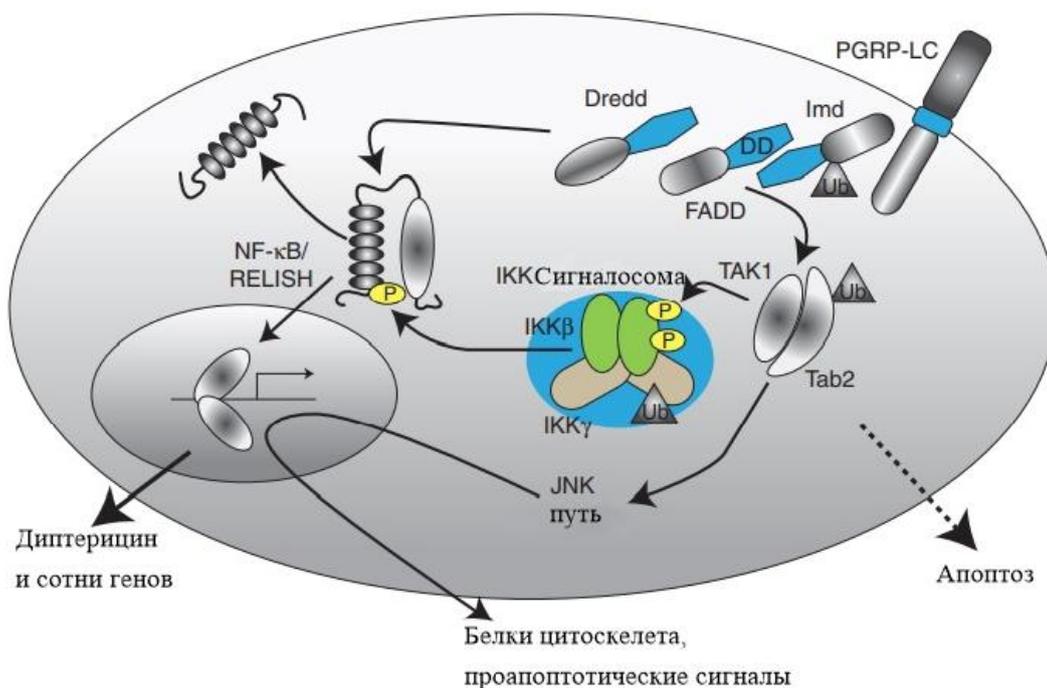


Рисунок 10. Путь IMD (Hetru and Hoffmann, 2009). Пояснения в тексте.

Фосфорилированный Relish разрезается и запускает экспрессию геномного ответа на соответствующий стресс (Hetru and Hoffmann, 2009). Relish работает во многих тканях организма (трахеи, кишечник, жировое тело, мозг), и механизмы его активации в них несколько различаются (Myllymäki and Rämet, 2014). JNK (JunN-terminal kinase) относится к семейству MAPK-киназ и представлена у дрозофилы единственным белком, который кодируется геном *bsk* (*basked*). Bsk является субстратом для киназы Hemipterous и отвечает за такие процессы, как индуцируемый стрессом апоптоз, миграция, пролиферация и регенерация. Путь JNK активируется под действием АФК. Во время апоптоза JNK запускает про-апоптотические гены *hid* и *reaper*, которые блокируют работу

ингибитора каспаз, который кодируется геном *diap1*. Снятие блока каспаз приводит к активации каспазы Dronc и последующих эффекторных каспаз Dricc и Dcp1, что приводит к клеточной гибели. Активация каспазы Dronc также приводит к усилению работы пути JNK, которые запускает каскады JAK/STAT, Wg и Dpp (Pinal et al., 2019). Далее мы подробнее остановимся на пути JAK/STAT.

JAK/STAT контролирует процессы воспаления, регенерацию ран, активацию нейтрофилов и макрофагов в ответ на бактериальную и вирусную инфекции. У дрозофилы этот путь активируется за счёт связывания одного из трёх лигандов (*upd* (unpaired), *upd2*, *upd3*) с рецептором *Domless* (*Dome*). Цитоплазматическая часть рецептора связывается с *hopscotch* (*hop*), который и является Janus-киназой (JAK), который в свою очередь фосфорилирует *Stat92E*, который формирует гомодимеры и направляется в ядро, где активирует гены ответа на соответствующий стресс (Рис.11). Среди генов-мишеней, есть гены, которые кодируют белки негативной обратной связи (*RanBP3*, *Ptp61F* и *Socs36E*) (Myllymäki and Rämét, 2014). Путь JAK-STAT также контролирует раннее эмбриональное развитие, компоненты этого пути поставляются в цитоплазму яйцеклетки клетками матери. Нарушение пути JAK/STAT приводит к потере сегментов, так как происходит нарушение активации генов «двойного правила» *even skipped* (*eve*) и *runt*, изменению строения передней кишки личинок и другим проблемам органогенеза, а также неправильному формированию имагинальных дисков (Hombria and Sotillos, 2013).

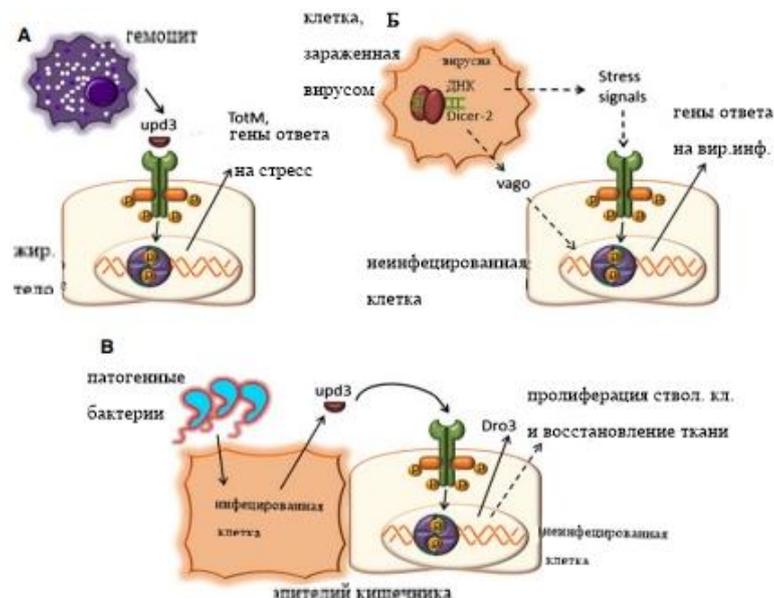


Рисунок 11. Путь JAK/STAT в различных соматических тканях (Myllymäki and Rämét, 2014). Пояснения в тексте.

Стоит отметить, что новым направлением является изучение влияния стрессового воздействия на систему рiРНК-интерференции. Было показано, что у дрозофилы тепловой шок приводит к изменению экспрессии рiРНК, что предполагает наличие кластеров, способных к регуляции с помощью температуры (Funikov et al., 2015). Для нематоды было, наоборот, показано ослабление рiРНК-интерференции при хроническом тепловом стрессе, причём эффект сохранялся у потомков даже при перенесении их в стандартные условия. При этом инфекция различными патогенными штаммами бактерий, наоборот, усиливала рiРНК-интерференцию (Belicard et al., 2018). Также важным наблюдением последних лет является то, что *piwi* активно работает в стволовых клетках яичников во время деления. Это деление происходит во время регенерации тканей. Потеря же PIWI приводит к нарушению гомеостаза (Sousa-Victor et al., 2017). Более того, активация пути JAK-STAT приводит к нарушению гетерохроматинизации, что связано с делокализацией Hrp1, гетерохроматиновым белком, который участвует в установке гетерохроматиновых меток в результате рiРНК-интерференции. Повышенная экспрессия JAK приводит к снижению продолжительности жизни, в то время как повышенная экспрессия Hrp1, наоборот её увеличивает. Также было показано, что потеря гетерохроматина приводит к повышенной транскрипции локуса, кодирующего рибосомную РНК (Silver-Morse and Li, 2013). Такой же эффект наблюдается при потере PIWI в яичниках – при мутации *piwi* накапливаются фрагменты рибосомной РНК что было указано выше (Kim, 2019).

Таким образом, система рiРНК-интерференции способна реагировать на внешние стрессовые воздействия, однако детали этого процесса пока не изучены. Учитывая вышеуказанные белки, Hsp90 и Hsp70, которые также входят в состав системы рiРНК интерференции, можно предположить, что их работа во время стресса может оказывать сильное влияние на изменение экспрессии ретротранспозонов.

## **2.7. Компоненты системы рiРНК-интерференции в соматических тканях**

### ***Drosophila melanogaster***

В последнее время было выявлено, что ряд ДКП-ретротранспозонов высоко экспрессируется в  $\alpha\beta$  нейронах у дрозофилы (*Tabor*, *mdg1*, *roo*, *qbert*, *gypsy*, *invader3*, *gypsy2*, *microcopia*, *412*, *accordi blood*). Причём экспрессия *gypsy*, *Tabor* и *qbert* значительно повышается при мутациях в генах *ago3* и *armi*, экспрессия *blood* повышается при мутациях в гене *aub* и *armi*, и экспрессия *invader3* повышается при мутации в гене *armi* (Guida et al., 2016; Perrat et al., 2013). Так как все три гена принадлежат системе

piРНК-интерференции, то можно предположить, что данная система является необходимой не только для контроля уровня экспрессии ДКП-ретротранспозонов в клетках яичников, но также участвует в подавлении активности ДКП-ретротранспозонов в мозге наравне с системой siРНК-интерференции. Помимо этого, дрозофила используется и как модельный объект для исследования нейродегенеративных заболеваний человека. Было показано, что нарушение функций человеческого белка TDP-43 (TARDNA binding protein 43) в клетках глии у дрозофил, несущих данный трансген, приводит к запуску апоптоза и активации ДКП-ретротранспозона *gypsy*, который, в свою очередь, добавляет повреждения в ДНК в ходе активного процесса транспозиции, что приводит к позитивной обратной связи (Chang and Dubnau, 2019).

Для человека было показано, что TDP-43 связывается с мотивом UGUGU РНК, транскрибируемого с эндогенного ретровируса HERV-K, и препятствует её трансляции. В посмертном анализе мозговой ткани пациентов с боковым амиотрофическим склерозом было найдено, что уровень экспрессии обратной транскриптазы эндогенного ретровируса HERV-K был выше в нейронах с недостатком белка TDP-43 (Ochoa et al., 2020). Экспрессия человеческого белка tau в мозге дрозофилы приводит к нарушению сразу двух механизмов регуляции активности транспозонов: гетерохроматинизации и piРНК-интерференции (Ochoa Thomas et al., 2020). Помимо этого, известно, что у больных шизофренией уровень экспрессии ретротранспозонов в мозге сильно увеличен (Hunter et al., 2015).

Таким образом, неконтролируемая активность ретротранспозонов может приводить к возникновению новых мутаций, ведущих к возникновению нейродегенеративных заболеваний, механизмы возникновения и развития которых до сих пор остаются неизвестными. В связи с этим, изучение регуляции ретротранспозонов в мозге дрозофилы как модельного объекта могло бы пролить новый свет на данные механизмы и помочь в решении проблемы поиска способов лечения данных заболеваний.

Более того, было выявлено, что piРНК экспрессируются и в других соматических тканях. Причём высокая экспрессия piРНК piR-651 была отмечена в опухолевых тканях желудка, прямой кишки и лёгких. Уровень piR-651 и piR-823 был снижен в периферической крови у пациентов с раком желудка. Таким образом, высокая экспрессия piРНК может являться маркером низкодифференцированных клеток, в том числе раковых (Assumpção et al., 2015). Также стоит отметить, что белок HIWI (один из белков PIWI человека) играет онкогенную роль при карциноме печени, так как снижение экспрессии

этого белка приводит к остановке пролиферации опухолевых клеток и прекращению их миграции. При раке желудка экспрессия PIWI стимулирует переход опухоли от на более поздние стадии, в то время как снижение экспрессии PIWI снижает пролиферативную активность раковых клеток (Assumpção et al., 2015).

Таким образом, высокая активность системы piРНК-интерференции в нервной системе может приводить к онкогенным заболеваниям, так как в функции данной системы входит регуляция некоторых генов, в том числе, генов стволовости. Так Rhi отвечает не только за транскрипцию двуцепочечных кластеров, но и за осевую разметку эмбрионов. В частности, транспорт и трансляция транскриптов *Grk* зависит от работы Rhi. В его отсутствии *Grk* остаётся в везикулах ЭПР (Volpe et al., 2001).

С другой стороны, у нематоды и личинок дрозофилы система piРНК-интерференции отвечает за формирование нервной системы. Так у *C.elegans* данная система в норме блокирует рост аксонов при повреждении, а у личинок дрозофилы нормальный сплайсинг кластера *flamenco* необходим для двигательной активности, так как при нарушении сплайсинга – оверэкспрессии *Caz* и нокдауне *Aub* – скорость локомоции у личинок и у старых мух (30 дней) снижается. Примечательно, что *Caz* ранее не рассматривался как участник системы piРНК-интерференции, а белок *Aub* по классическим представлениям не взаимодействует с транскриптами одноцепочечных кластеров. Так же наличие piРНК на стадии личинки, о чём упоминалось ранее, говорит о том, что piРНК принимают участие в формировании нервной системы дрозофилы (Huang et al., 2021).

Подводя итоги, можно сказать, что как ретротранспозоны, так и система piРНК-интерференции могут потенциально реагировать на стресс. Вопреки традиционным представлениям, влияние системы piРНК-интерференции не ограничивается только ретротранспозонами, а также играет важную роль в экспрессии генов эмбриогенеза и своих собственных компонентов. В свою очередь, ретротранспозоны регулируют геном хозяина благодаря наличию регуляторных областей.

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3.1. Линии *Drosophila melanogaster*

В работе использовали линии SS (не содержит активных копий ретротранспозона *gypsy*) и MS (была ранее выведена из линии SS после инсерции транспозиционно активной копии ретротранспозона *gypsy* (Ким А.И. et al., 1989)), *piwi*[2], *piwi*[3], Д32, Canton-S,  $w^{1118}$ , *rhi* и *tubP-Gal4*. Д32 - лабораторная линия дикого типа из коллекции кафедры генетики МГУ), Canton-S – линия дикого типа, широко используемая в генетических экспериментах; линии SS и MS ( $w^1$ ) имеют мутацию в локусе *flamenco*, контролирующем транспозицию МГЭ *gypsy*; линии *piwi*[2] ( $w^{1118}$ ; P{ry11}*piwi*<sup>2</sup>/CyO,  $w^{+*}$ ) и *piwi*[3] (P{PZ}*piwi*<sup>06843</sup> *cn*<sup>1</sup>/CyO; *ry*<sup>506</sup>) несут вставку Р-элемента в гене *piwi* (у линии *piwi*[2] вставка в 4-м экзоне, у линии *piwi*[3] вставка в 1-м экзоне) и балансерную хромосому 2L с мутацией CyO; линия *rhi* (Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) ID 101620) несёт конструкцию со шпилькой под промотором UAS для siРНК-интерференции с мРНК гена *rhino* (получена из Института молекулярной генетики РАН от Кленова М.С.); линия *tubP-Gal4* (*y1w\**; P{*tubP-GAL4*}LL7/TM3,Sb1Ser1; Bloomington Drosophila Stock Center BL5138; запускает нокдаун во всех тканях) (получена из Института биологии развития им.Н.К.Кольцова РАН от Воронцовой Ю.Е.).

#### 3.2. Условия культивирования

Гибриды от скрещивания линий *rhi* и *tubP*, а также гибриды от скрещивания линий  $w^{1118}$  и *tubP* культивировали при температуре 27 °С, так как эта работа является оптимальной для экспрессии драйверной конструкции. Линии *piwi*[2] и *piwi*[3], их гибриды, а также линии SS, MS, Canton-S и Д32 культивировали при температуре 25°С.

Для индукции окислительного стресса у семидневных самок имаго после 2х-часового голодания помещали на агаризованную питательную среду, содержащую 0,1 М персульфат аммония. Выделение тотальной РНК проводили через 24 часа воздействия персульфатом аммония. В качестве контроля использовали семидневных мух, культивированных в стандартных условиях. Также в работе использовали мух, которых инкубировали после стресса на стандартной среде в течение 24 и 48 ч.

Для индукции хронического температурного стресса имаго высаживали на свежую питательную агаризованную среду и оставляли на ночь при температуре 25°С. На следующий день родителей удаляли, а среду с эмбрионами инкубировали при 29°С. После

вылета нового поколения мух инкубировали при температуре 29°C 7 дней, затем из пулов по 5 особей выделяли РНК. В качестве контроля использовали мух возрастом 7 дней после вылета, культивированные при стандартных условиях. Помимо этого, анализировали мух, которых инкубировали после стресса в стандартных условиях в течение 24 ч.

### **3.3 Сбор материала для анализа**

Для выделения тотальной РНК 5 самок собирали в пробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 мл. Для анализа количества РНК в отдельных тканях сбор материала осуществляли после вскрытия семидневных мух или личинок 3-го возраста в натрий-фосфатном буфере. Головы, яичники и корпусы помещали в реактив для выделения РНК, Extract RNA (Евроген, Россия). У личинок 3-го возраста извлекали центральную нервную систему (ЦНС) по методу (Hafer and Schedl, 2006) и также помещали в раствор Extract RNA для выделения РНК. РНК выделяли из мух в 3-6 биологических повторах.

### **3.4. Выделение РНК**

Выделение РНК проводили с помощью реактива ExtractRNA. Использовали протокол, рекомендованный фирмой-производителем с модификациями. 1-2 мг исследуемого образца помещали в пробирку «эппендорф», добавляли 100 мкл раствора ExtractRNA и растирали с помощью гомогенизатора со сменными пластиковыми пестиками до исчезновения крупных фрагментов ткани. Добавляли еще 400 мкл раствора ExtractRNA, перемешивали и инкубировали при +4°C 20 мин, после этого экстрагировали водную фазу с РНК с помощью хлороформа. РНК осаждали в изопропанол с добавлением добавляли 3 мкл 1% раствора гликогена в качестве соосадителя, инкубировали в течение ночи при -20°C с последующим центрифугированием. Осадок промывали 2 раза 70%-ным этанолом (500 мкл), подсушивали и растворяли в 20 мкл деионизированной воды. Концентрацию РНК измеряли спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Peqlab, Германия).

Для оценки качества выделенной РНК использовали метод электрофореза в агарозном геле. 1% агарозный гель готовили на буфере TAE (40 мМ трис-ацетатный буфер рН 7,6, 1мМ EDTA), с добавлением 0,5 мг/мл бромистого этидия. Электрофорез проводили в буфере TAE при напряженности 5 В/см. Пригодность РНК для дальнейшей работы определяли по наличию четко различимых полос, соответствующих рибосомным РНК.

Для выделения микроРНК использовали набор для выделения суммарной РНК и микроРНК из реагента «Лира» (LRU-100-50) (Biolabmix, Россия). Выборки содержали до 6 образцов.

### 3.5. Обработка ДНКазой и обратная транскрипция

Перед постановкой реакции обратной транскрипции образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы. Для обработки ДНКазой брали 2 мкг РНК, реакцию проводили в объеме 20 мкл при 37°C в течение 30 мин. Затем в пробу добавляли 2 мкл 25 мМ ЭДТА и инактивировали ДНКазу прогреванием при 70°C в течение 10 мин. Для обратной транскрипции использовали набор MMLV-RT Kit (Евроген, Россия). 500 нг обработанной ДНКазой РНК смешивали с 1 мкл гексануклеотидного праймера со случайной последовательностью, доводили объем до 9 мкл, прогревали 2 мин при 70°C. К смеси РНК и праймера добавляли буфер для обратной транскрипции, ревертазу, смесь нуклеотидов и дитиотритол в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Пробу инкубировали 50 мин при 40°C. Ревертазу инактивировали прогреванием в течение 10 мин при 70°C.

### 3.6. Количественная ПЦР

Для приготовления реакционной смеси использовали набор реагентов «Реакционная смесь 2,5x для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Реакцию ставили в амплификаторе MiniOpticon Real-Time PCR System производства Bio-Rad Laboratories (США). В опытах анализировали относительную экспрессию генов системы рiРНК-интерференции *rhino*, *maelstrom*, *vreteno*, *nxf2*, *Nxf3*, *Hen1*, *moonshiner*, *vasa*, *cabeza*, *cutoff*, *Armitage*, *zucchini*, *piwi*, *AGO3*, *auergine*, *BoYb*, кластеров рiРНК *flamenco*, *42AB*, *38C*, *20A*, ДКП-ретротранспозонов *copia*, *blood*, *gypsy*, *roo*, *springer*, *Tirant*, теломерных LINE *HeT-A*, *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и генов-маркеров окислительного стресса *hsp22*, *Sid*, *upd3*, а

также генов *sactus* и *Nuak*, нормированную на экспрессию генов *αTub84D*, *Elo-B* и *rpl40*. Для амплификации фрагментов данных генов, кластеров и ретротранспозонов использовали праймеры приведённые в таблице 1. Праймеры для кластеров 20А и 38С были взяты из работы (Nug et al., 2016), для кластера 42AB праймеры взяли из работы (Zhang et al., 2014) для кластера *flamenco* праймеры подобрали аналогично приведенным в работе Zhang et al (Рис.12). Для проведения ПЦР использовали следующую программу: предварительный этап плавления ДНК 10 мин при 95°C, затем 40 циклов: плавление 15 сек при 95°C, отжиг праймеров 30 сек при 55°C, синтез 60 сек при 72°C. Для оценки количества микроРНК использовали следующую программу: предварительный этап плавления ДНК 3 мин при 95°C, затем 40 циклов: плавление 10 сек при 95°C, отжиг праймеров 30 сек при 55°C, синтез 15 сек при 72°C. После синтеза в каждом цикле измерялся уровень флуоресценции в пробах. Одновременно ставили отрицательные контроли для каждого образца: пробы, обработанные ДНКазой I и не прошедшие обратную транскрипцию. Анализ результатов ПЦР проводили с помощью пакета программ Bio-Rad CFX Manager (версия 1.6.541.1028). Качество результатов ПЦР проверяли по форме графиков плавления и с помощью оценки качества амплификата методом электрофореза.

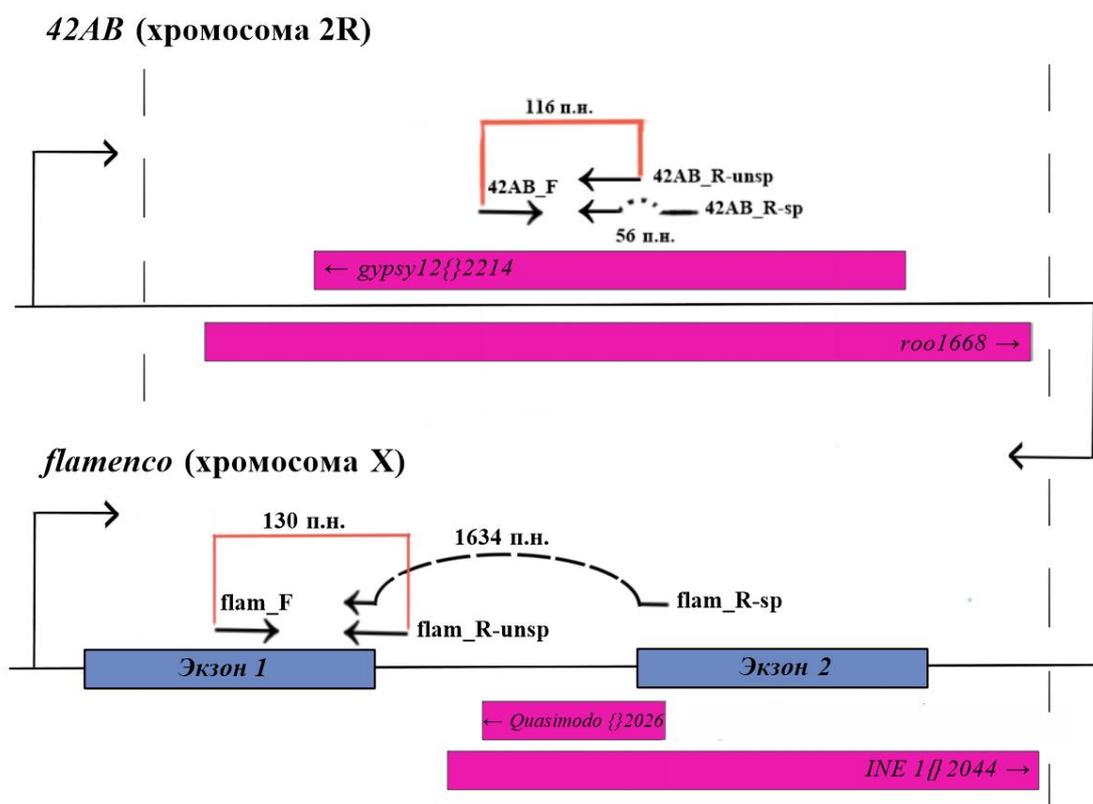


Рисунок 12. Расположение праймеров для амплификации транскриптов кластеров 42AB и *flamenco*. flam – flamenco, F – прямой праймер, R – обратный праймер,

sr – для сплайсированной формы транскрипта, unsp – для несплайсированной формы транскрипта. Так как для *42AB* отсутствует аннотированная последовательность в базе данных, мы использовали последовательность его нуклеотидов и функцию blast в FlyBase, чтобы продемонстрировать участок кластера, к которому подобраны праймеры. Боковые пунктирные линии означают разрыв рисунка, так как кластеры имеют большую протяжённость.

Для оценки экспрессии piРНК на аннотированную последовательность кластера *flamenco* картировали piРНК из базы данных piRNAdb (PIWI-interacting RNA (piRNA) Database) (<https://www.pirnadb.org/>) и выбрали piРНК *11620*, так как она локализована в одном из интронов этого кластера. В качестве референсной РНК использовали miРНК *U6*. Обратную транскрипцию проводили с помощью специфичного шпильчного праймера. Для количественной ПЦР использовали праймеры к шпильке и к целевой РНК (Табл.1).

Таблица 1. **Праймеры, использованные для анализа экспрессии генов системы piРНК-интерференции, кластеров piРНК, ДКП-ретротранспозонов, генов-маркеров окислительного стресса *hsp22*, *Sid*, *upd3* и генов *cactus* и *Nuak*, а также для анализа экспрессии piРНК.**

Название	Прямой праймер	Обратный праймер
Гены		
<i>αTub84D</i>	5'-GTGCATGTTGTCCAACACCAC-3'	5'-AGAACTCTCCCTCCTCCATA-3'
<i>EloB</i>	5'-GCACAAACATACACACTCACG-3'	5'-TTTCCTACTTCGCTTGCACC-3'
<i>RpL40</i>	5'-CTGCGTGGTGGTATCATTG-3'	5'-CAGGTTGTTGGTGTGTCC-3'
<i>rhino</i>	5'-CTTCGAGTCGGAGGTCTTCA-3'	5'-CTGCACCGACTTGGAAATGTT-3'
<i>maelstrom</i>	5'-GGAATCCGATCCATCTACAG-3'	5'-TCAACAATGTTGCGGTACAG-3'
<i>vreteno</i>	5'-GCCAGTGAATCACAACAGAG-3'	5'-AAAGTGCAGAACGACCTGCG-3'
<i>nx2</i>	5'-GAATGTGAGCACTGTCAAGC-3'	5'-CCGACAGTACGTAGGTAAA-3'
<i>Nx3</i>	5'-GTTCGTGCTGGACACTATGG-3'	5'-CTAGCGACTTTTGCATCTTC-3'

<i>Hen1</i>	5'- AGTCTTCAGCACACCAAACCTC- 3'	5'-CGACTCGTATTTCCTTAGGCG- 3'
<i>moonshiner</i>	5'TGGTCAACAATCGCATCTAC3'	5'-TGGCCTGCGACCACTTTG-3'
<i>vasa</i>	5'-CGAGGAAGTTTGCTTTCGAG- 3'	5'-TCACTACATGGCAGCCTCTG- 3'
<i>cabeza</i>	5'-CACCTACGACGACACCAATG- 3'	5'-GCCCTTGTTCCAGTTGTTCT-3'
<i>cutoff</i>	5'-TAGTGTGCACCAGCGAAGTC- 3'	5'- ACATCAATGCGGCAAATGTAC- 3'
<i>armitage</i>	5'-GATGACGGTTTCGTGGAC-3'	5'-ATGAGATCGGCGAGCACA-3'
<i>zucchini</i>	5'-ATCAGAGGTGATTTGGAAGC- 3'	5'-ATGGAGTATACAGCCCGATC- 3'
<i>piwi</i>	5'-CACCGAGACGATCTACGAC-3'	5'-AACTGATATCTCTACCCTTG- 3'
<i>AGO3</i>	5'-AGGCGGAAGATGTTGAGTTG- 3'	5'-CGCGAAGGATCAAACCTGCTT- 3'
<i>aubergine</i>	5'-ACTGGACCATCTACCAGTAC- 3'	5'-CAGTTCCAAAACATAGGGGC- 3'
<i>BoYb</i>	5'-CCCAAGTTTCTCATGGTTTC-3'	5'-ACGAAGTCTCCGAATATG-3'
<i>cactus</i>	5'-GATCTTCAGCGAGGAGATAGTC- 3'	5'-CTCCTCCTCTTTCTCCTGC-3'
<i>Nuak</i>	5'-GGTTCCTGTTCCCAGTTACTC-3'	5'-ATCACTTTGGTGGCATCCTTT-3'
Кластеры		
<i>flamenco- spliced</i>	5'- CATCAGCTCAGCAGCAGTGTA-3'	5'-AGTCCAATGCTCGCTTGAAA- 3'
<i>flamenco- unspliced</i>		5'- GACTTAACACTTACCGCTTGAA A-3'
<i>42AB- spliced</i>	5'-GCAGTTGCCGTCTCTCCTT-3'	5'-TGGGTCAAAGTGCAGCAGTT- 3'
<i>42AB- unspliced</i>		5'- TACGGGAATATAATCGCAGCAG TT-3'
<i>38C 1</i>	5'- AATGGCTAGTTCGCTACCAGAC AG-3'	5'- CGGGTCTTCTCTCAAACGCAAT C-3'
<i>38C 2</i>	5'-CACAAAATGGCCGCTGGAAA- 3'	5'-AGCCAAACCCTGTGTTGTGA- 3'
<i>20A</i>	5'-GCCTACGCAGAGGCCTAAGT- 3'	5'-CAGATGTGGTCCAGTTGTGC- 3'

Ретротранспозоны		
<i>gypsy</i>	5'- CTGCTGAAAGACGGCATTATC-3'	5'- AGAACTTTGCCTTGCCCAGAT-3'
<i>Tirant</i>	5'-AACGCTATTCATTCTGCAAC- 3'	5'-AGGGTTCTCCTAACTACGTC- 3'
<i>copia</i>	5'-CTTCAGTGATGGACAACCTG-3'	5'-CAGTGTAATCTCATGGTCAT- 3'
<i>roo</i>	5'-ACAGATTCCCACCTTCTTTG-3'	5'- AGCCGAGGAGTAAATGAGTA-3'
<i>blood</i>	5'-ATGCGACAACGATACAGG-3'	5'-TTTGTGTCAGCATTATCGGCG-3'
<i>springer</i>	5'- CTAAATTCGCCATGGTACAGC-3'	5'-GCCACTATTGTCTGCGATTT- 3'
<i>HeT-A</i>	5'-TCAGGATACAGGCAAAGGAC- 3'	5'-CGACTATCCACGAGCATGG-3'
<i>TART-A</i>	5'-GCAGCAGTTTCCATTTGAC-3'	5'-AAGAACACACCATCGCTTG-3'
<i>TART-B</i>	5'-GGGCAGACCAAGTTTATCC-3'	5'-TCATGTGGGAAATGTGTAGC- 3'
<i>TART-C</i>	5'-ATAGGGTATGGCACGAAGG-3'	5'-AAGTAGTGGTCCGAGATTGC- 3'
<i>Tirant в cactus</i>	5'-GGGACCTTCGCCTCAAC-3'	5'-GCCACTATTGTCTGCGATTT-3'
<i>Tirant в Nuak</i>	5'-GCCTGAGTTAACAAGGTGAAC- 3'	5'- GTAGGAATCAAAAACACACAACC -3'
Шпильчатые праймеры для ОТ		
<i>U6</i>	5'- CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCA ATTCAGTTGAGAAAATGTGG-3'	
<i>11620</i>	5'- CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCA ATTCAGTTGAGGATGGCA-3'	
Праймеры для микро-РНК		
Универсальн ый праймер для шпильки		5'-ACTGGTGTCTGGAGTC-3'
<i>U6</i>	5'-GCTGGGATACAGAGAAGATTAG-3'	
<i>11620</i>	5'-GCTGGGTCAACTAGTATTTCTG-3'	

### 3.7. Выделение ДНК

10 мг исследуемого образца (10 особей) растирали в 100 мкл рабочего раствора (900 мкл сток А (1М Tris Cl (pH 9,0), 0,5 М EDTA, mQ H<sub>2</sub>O), 100 мкл 10% SDS, 10 мкл DEPC с помощью гомогенизатора со сменными пластиковыми пестиками до исчезновения крупных фрагментов ткани. Добавляли еще 400 мкл рабочего раствора, перемешивали и инкубировали при 70°C 30 мин. Затем добавляли 116 мкл 5М раствора ацетата калия,

перемешивали и инкубировали при 0°C 30 мин. ДНК экстрагировали с помощью хлороформа с последующим центрифугированием на максимальной скорости оборотов. Для осаждения к отобранной водной фазе добавляли 3 мкл 1% раствора гликогена и 350 мкл изопропанола и инкубировали в течение ночи при температуре -20°C с последующим центрифугированием. Осадок промывали 2 раза 70%-ным этанолом (500 мкл), подсушивали и растворяли в 30 мкл деионизованной воды. Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе NanoDrop. Концентрации ДНК выравнивали: конечная концентрация 100 нг/мкл.

### **3.8. Обработка результатов секвенирования на платформе Illumina**

Для анализа транскриптомов линий Д32, SS и MS использовали результаты секвенирования транскриптомов на Illumina HiSeq 2000. Для поиска однонуклеотидных замен использовали программу, написанную в нашей лаборатории на языке Scala. Разработанная программа позволяет отбирать миссенс и нонсенс-мутации, учитывая соседние замены, а также сравнивать геномы на наличие однонуклеотидных замен. В качестве параметров по учёту замен мы брали минимальное количество прочтений на участке с заменой – 2, и среди всех прочтений на участке с заменой не менее 30% должны были содержать замену.

### **3.9. Аллель-специфичная ПЦР**

Для проверки наличия у линий SS и Д32 мутаций, которые были найдены в нашей лаборатории ранее с помощью метода секвенирования транскриптома на платформе Illumina, мы использовали метод аллель специфичной ПЦР на основе количественной ПЦР. Для аллель-специфичной ПЦР использовали стандартную программу и праймеры, приведённые в (Табл.2). Каждый аллель-специфичный праймер содержал специфичный к однонуклеотидной замене нуклеотид на 3'-конце, что влияло на эффективность ПЦР, по которой мы определяли наличие или отсутствие однонуклеотидной замены у используемых линий дрозофилы.

Таблица 2. Праймеры для аллель-специфичной ПЦР

Ген	Праймеры к вариантам последовательности		Праймер к участку гена, совпадающему у двух аллелей
<i>G2121</i>	Прямой 5'CAGATGGCCCAGGTGT GG3'	Прямой 5'CAGATGGCCCAGGTG TGА3'	Обратный 5'CACCSTGTTTCTCTCCAG 3'
<i>Cyp9b 1</i>	Обратный 5'CСТТААAGGTGCCAGT ACTС3'	Обратный 5'CСТТААAGGTGCCAG ТАСТТ3'	Прямой 5'CAGTTAGCATТААТАСА TCAGGTG3'
<i>CR153 45</i>	Обратный 5'CСТGCATCTCAACGAT TCG3'	Обратный 5'CСТGCATCTCAACGA TTCA3'	Прямой 5'CAAGAATGAGTCCATCA ACG3'
<i>dgt1</i>	Обратный 5'CGAGGGCTТАААААТТ AGTTТА3'	Обратный 5'CGAGGGCTТАААААТ ТАТТТТ3'	Прямой 5'CAGTCCACCAGCTTGAT TAG3'
<i>GstE5</i>	Прямой 5'CGACTGCACTTCGAGA CAG3'	Прямой 5'CGACTGCACTTCGAG AAT3'	Обратный 5'CCAGCAATGТААТСАТГ TCC3'
<i>CG13 511</i>	Прямой 5'TGATGCATCACCAGAC GAC3'	Прямой 5'TGATGCATCACCAGA CGТА3'	Обратный 5'ACAGТААГТТGATCCGG TAGG3'
<i>CG31 18</i>	Обратный 5'AGCATCTGCCAGAAAG TCG3'	Обратный 5'AGCATCTGCCAGAAA GTCT3'	Прямой 5'TGCGACTGCTCACCTAA AG3'
<i>List</i>	Обратный 5'CCGAGAAGCCTАААА CAGТ3'	Обратный 5'CCGAGAAGCCTАААА CAGС3'	Прямой 5'ТТСТТCCTCATGCTATTC GTC3'
<i>CG33 346</i>	Обратный 5'ACACATTTTCGGTATT ATCCС3'	Обратный 5'ACACATTTTCGGTAT ТАТCCT3'	Прямой 5'ААСААТGGGTGGGAAAC 3'

### 3.10. Оценка числа копий мобильных элементов методом ПЦР

Оценку числа копий мобильных элементов в геномах исследуемых линий проводили методом ПЦР. Для приготовления реакционной смеси использовали набор реагентов «Реакционная смесь 2,5x для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Реакцию ставили в

амплификаторе MiniOpticon Real-Time PCR System производства Bio-Rad Laboratories. В опыте анализировали относительное число копий мобильных генетических элементов *copia*, *gypsy*, *springer* и *Tirant*, нормированное на число копий генов *αTub84D* и *tobi*. Для амплификации фрагментов генов и ретротранспозонов использовали праймеры, приведённые в таблице 2. Для амплификации фрагмента *tobi* использовали прямой праймер 5'-AGTTCSTTTTGGGCGAAGAC-3' и обратный праймер 5'-TCCGCTCTACTCCAGTGTGA-3' Для проведения ПЦР использовали следующую программу: предварительный этап плавления ДНК 10 мин при 95°C, затем 40 циклов: плавление 15 сек при 95°C, отжиг праймеров 30 сек при 55°C, синтез 60 сек при 72°C. После синтеза в каждом цикле измерялся уровень флуоресценции в пробах. Анализ результатов ПЦР проводили с помощью пакета программ Bio-Rad CFX Manager (версия 1.6.541.1028). Подсчёт числа копий проводили с использованием формулы  $((2^{\Delta Ct} \alpha Tub84D) * (2^{\Delta Ct} tobi))^{0,5} / 2^{\Delta Ct}$  ретротранспозона. Ранее такой метод подсчёта числа копий был использован другими исследователями для ретротранспозона *roo* (Parascit et al., 2007).

### 3.11. Подготовка ДНК-библиотек и нанопоровое секвенирование

Концентрацию ДНК в образце оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop (PepLab, Германия). После этого проводили подготовку библиотеки (лигирование адаптеров и очистка на магнитных частицах) согласно протоколу производителя Oxford Nanopore. Подготовку ДНК проводили по протоколу производителя с инкубацией реакционной смеси 5 мин при 20°C, 15 мин при 60°C, затем осуществляли очистку на магнитных частицах, дважды промывая 200 мкл 80%-ного этилового спирта. Смывали ДНК 61 мкл воды без нуклеаз. В новую пробирку помещали раствор ДНК и проводили лигирование адаптеров по протоколу производителя при комнатной температуре 10-60 мин. Далее на магнитных частицах библиотеку дважды промывали коммерческими растворами из набора. Затем концентрацию библиотеки оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop (PepLab), осуществляли прайминг ячейки, загружали библиотеку и запускали секвенатор Oxford Nanopore MiniION. По истечении 24 час осуществляли подготовку следующей библиотеки, осуществляли промывку ячейки и запускали секвенирование следующей библиотеки.

### 3.11. Обработка результатов секвенирования и поиск последовательностей мобильных элементов

Файлы с расширением fastq, полученные после обработки данных секвенирования с помощью функции basecolling в программном обеспечении, поставляемом производителем вместе с секвенатором, картировали на референсный геном *D. melanogaster* шестой сборки (dm6) (Hoskins et al., 2015) с помощью программы miniconda2 с настройками для прочтений, полученных с помощью нанопорового секвенирования. Результаты секвенирования Canton-S на платформе Oxford Nanopore (SRR11460803) и Illumina (SRR11396271), полученные из базы данных NCBI, выравнивали на референсный геном с помощью этой же программы с настройками, соответствующими методу секвенирования, которым были получены прочтения.

Результаты картирования с расширением sam переводили в формат bam, сортировали и индексировали с помощью пакета samtools. Результаты визуализировали с помощью программы IGV (Integrative Genomic Viewer) (Robinson et al., 2011).

Для поиска инсерций искомых мобильных элементов, которые присутствуют в референсном геноме, использовали последовательности мобильных элементов из библиотеки BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) (Kaminker et al., 2002). Поиск мест возможных инсерций в референсный геном осуществляли с помощью функции blastn в базе данных FlyBase (Gramates et al., 2022) с последующим анализом геномного окружения вставок в JBrowse и верификацией с помощью локализации праймеров в Ugene (Okonechnikov et al., 2012). Наличие вставок в исследуемых геномах проверяли с помощью визуализации данных полногеномного секвенирования в IGV.

Для поиска инсерций искомых мобильных элементов, копии которых уникальны для исследуемых геномов, использовали программу TLDRTLDR (Transposons from long DNA reads) (Ewing et al., 2020). Для поиска создавали библиотеку искомых мобильных элементов на основе последовательностей из BDGP. Результаты работы программы TLDRLDR сортировали по длине участков новых инсерций, совпадающих с последовательностями мобильных элементов, и длинные совпадения проверяли с помощью локализации праймеров в Ugene.

Для поиска сайтов связывания с транскрипционными факторами в регуляторных последовательностях мобильных элементов использовали базу данных LASAGNA (Lee and Huang, 2013). Для анализа использовали только те сайты связывания, которые были предсказаны с вероятностью  $p < 0,001$ . Функции и паттерны экспрессии транскрипционных

факторов, для которых были предсказаны сайты связывания, смотрели в базе данных FlyBase. Консервативность сайтов проверяли по множественному выравниванию инсерций, найденных с помощью алгоритма TLDR, в Ugene.

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 4.1. Регуляция экспрессии ретротранспозонов при нарушении работы системы рiРНК-интерференции

#### 4.1.1. Поиск мутаций в кодирующих последовательностях генома линии SS

Линия SS характеризуется фенотипом flamenco, который выражается в неспособности подавлять экспрессию и транспозицию активных копий ретротранспозона *gypsy*, изначально эта линия содержит транспозиционно неактивные, но экспрессирующиеся копии *gypsy*. Линия MS была получена из линии SS путем трансформации активной копии *gypsy* (Ким А.И. et al., 1989). Генетические причины, приводящие к фенотипу flamenco, до сих пор не выявлены. Однако, согласно исследованиям, проведённым ранее в нашей лаборатории, эта линия обладает нарушением процессинга транскриптов кластера flamenco на фоне сниженной экспрессии *rhino* в этой линии (Лавренов и др., 2014).

В нашей лаборатории было проведено секвенирование транскриптомов линий Д32 (дикий тип), SS и MS на платформе Illumina. После этого был осуществлён биоинформатический анализ кодирующих последовательностей генома с помощью алгоритма, написанного в нашей лаборатории. Данная программа проводит поиск аминокислотных замен с учетом соседних замен нуклеотидов. В результате был выявлен ряд вариантов нуклеотидной последовательности, ВНП (однонуклеотидных замен), из которых для дальнейшего рассмотрения мы выбрали те, которые привели к образованию стоп-кодона либо к их потере, так как эффект от таких изменений отражается на белковом продукте гена наиболее предсказуемо по сравнению с миссенс-мутациями. Всего таких замен относительно референсного генома dm6 было найдено 9 в линии Д32, 12 в линии SS и 9 в линии MS.

С помощью аллель-специфичной ПЦР мы провели проверку наличия найденных ВНП в геномах секвенированных линий. Мы обнаружили ряд нонсенс-мутаций у линии SS, которые отличают её от линии дикого типа Д32, однако ни одна

из этих мутаций не была обнаружена у линии MS. Поэтому нельзя сказать, что какая-то из них приводит к фенотипу flamenco (Табл. 3).

Таблица 3. Наличие вариантов нуклеотидной последовательности в белок-кодирующих генах в линиях Д32, SS, MS и Canton-S относительно генома dm6 (по результатам аллель-специфичной ПЦР)

Ген (функция)	Canton-S	Д32	SS	MS
<i>CG2121</i> (продукт, возможно, вовлечен в регуляцию активности калиевых каналов) согласно FlyBase	нет замен	нет замен	нет замен	нет замен
<i>CG13511</i> (продукт, возможно, вовлечен в связывание ионов цинка) согласно FlyBase	нет замен	нет замен	нет замен	нет замен
<i>CR15345</i>	нет замен	нонсенс-мутация	нет замен	нет замен
<i>GstE5</i> (кодирует глутатион-трансферазу) (Gonis et al., 2022)	нет замен	нонсенс-мутация	нет замен	нет замен
<i>CG31918</i> (кодирует, предположительно, протеаза) (Meyer et al., 2021)	нет замен	нонсенс-мутация	нет замен	нет замен
<i>List</i> (кодирует транспортёр аминокислот, отвечает за устойчивость к токсичности лития) (Kasuya et al., 2009)	потеря стоп-кодона	гетерозигота	гетерозигота	гетерозигота
<i>dgt1</i> (кодирует компонент комплекса NSL) (Pavlova et al., 2019)	нет замен	потеря стоп-кодона	нет замен	нет замен
<i>CG33346</i> (кодирует эндонуклеазу) согласно FlyBase	нет замен	нонсенс-мутация	нонсенс-мутация	нет замен
<i>Сур9b1</i> (кодирует цитохром, устойчивость к ксенобиотикам) (Najarro et al., 2017)	нет замен	нет замен	нонсенс-мутация	нет замен

Дополнительно мы использовали результаты геномного секвенирования линии Canton-S на платформе Illumina из базы данных NCBI (SRR11396271). В результате ни одной из мутаций, кроме ВНП в гене *List*, в этой линии обнаружено не было. Так как линии SS, Д32 и Canton-S разные по происхождению, то мы предполагаем, что данная замена появилась и закрепилась до разделения лабораторных линий дрозофил и может быть широко распространена.

Таким образом, найденные мутации не связаны с генами, принимающими участие в рiРНК-интерференции, и, очевидно, фенотип *flamenco* не связан с потерей функции каких-либо белок-кодирующих генов.

#### 4.1.2. Анализ экспрессии ретротранспозонов и кластеров рiРНК у линий SS и Canton-S

Так как нарушение процессинга транскриптов кластеров рiРНК может приводить к накоплению сплайсированных форм транскриптов не только кластера *flamenco*, но и других кластеров, мы проанализировали экспрессию нескольких ретротранспозонов и кластеров рiРНК с разными механизмами регуляции экспрессии в тканях яичников, корпуса и головы взрослых самок линии SS. В качестве дополнительной ткани мы взяли ЦНС личинок, так как в последние годы появилась информация о роль рiРНК-интерференции в нервной системе (Wakisaka et al., 2019). В качестве контроля мы использовали линию Canton-S, а для отдельных ретротранспозонов – Д32.

Для анализа экспрессии МГЭ мы выбрали пять наиболее изученных ДКП-ретротранспозонов (*blood*, *copia*, *gypsy*, *roo*, *Tirant*) и четыре теломерных LINE-элемента (*HeT-A*, *TART-A*, *TART-B*, *TART-C*). Выбранные нами ДКП-ретротранспозоны принадлежат разным филогенетическим группам: *gypsy* – *blood*, *gypsy*, *Tirant*; BEL – *roo*; *copia* – *copia*.

При сравнении разных линий невозможно учесть такие факторы, как сила промоторов и регуляторных областей отдельных копий, а также количество копий определённых ретротранспозонов в геноме. Так как мы измеряем экспрессию не отдельных копий, а нескольких копий сразу, это может приводить к различию экспрессии между линиями. Поэтому мы проводили сравнение паттернов экспрессии ретротранспозонов не между линиями SS и Canton-S, а между тканями взрослых самок и личинок этих линий.

По экспрессии ДКП-ретротранспозонов в различных тканях между линиями нет различий (Рис. 13). Разница есть только среди LINE: *HeT-A* в голове у Canton-S экспрессируется не меньше, чем в ЦНС у личинок, а *TART-A* демонстрирует наибольшую экспрессию в голове у SS, в то время, как у Canton-S – в ЦНС личинок. Данные отличия можно отнести как к особенностям этих линий, так и связать с фенотипом flamenco, так как, согласно другим исследованиям, теломерные ретротранспозоны обладают механизмом саморегуляции посредством рiРНК-интерференции (Cacchione et al., 2020).

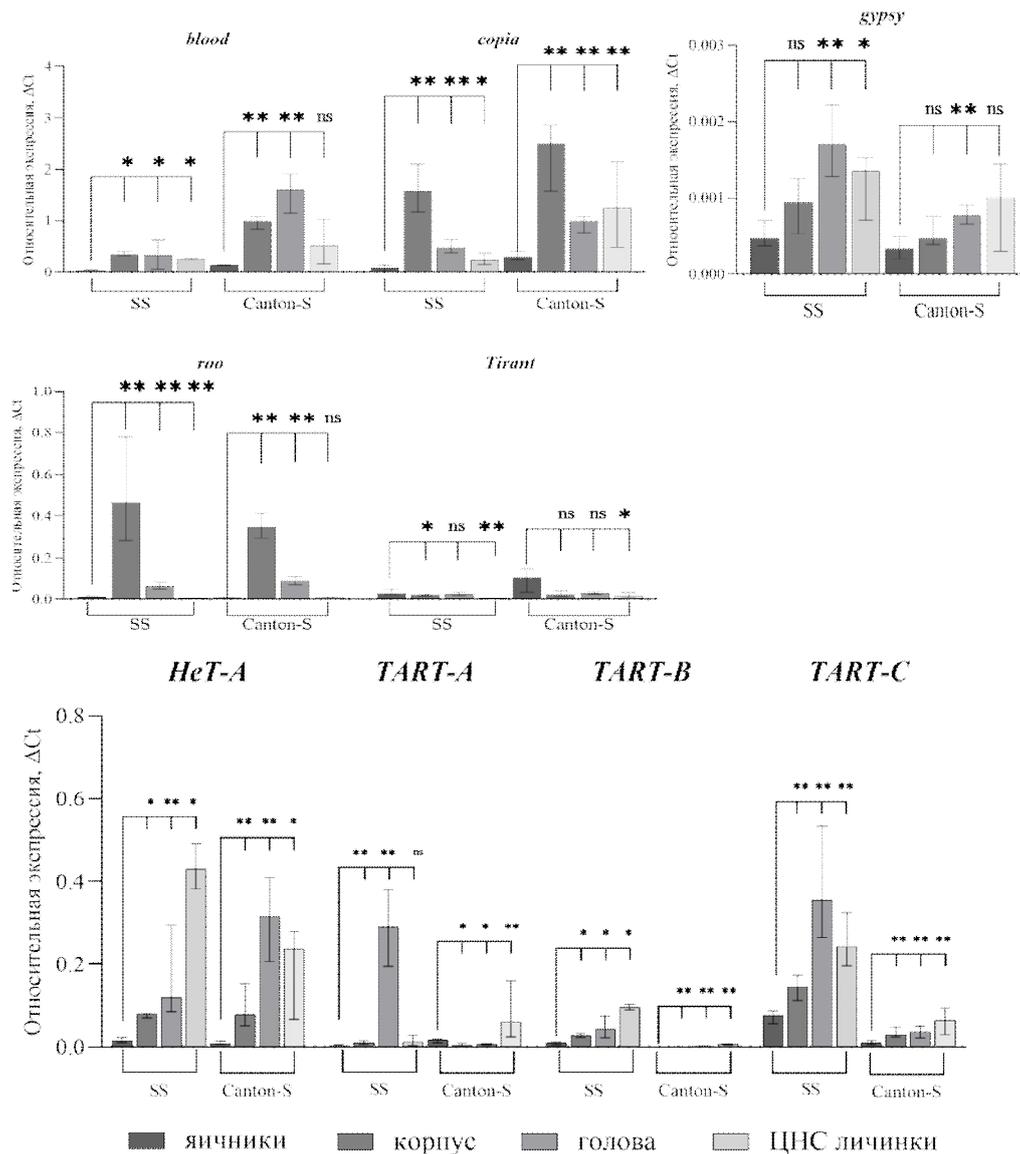


Рисунок 13. Относительная экспрессия ДКП-ретротранспозонов *blood*, *copia*, *gypsy*, *roo*, *Tirant* и теломерных LINE-элементов *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и *HeT-A* в тканях яичников, корпуса, головы самок и ЦНС личинок SS и Canton-S (\*- p < 0,05, \*\* — p < 0,01; ns, not significant – статистически не значимое изменение). Здесь и далее все первичные данные, использованные для построения диаграмм приведены в виде таблиц в Приложении 1.

Более того, по нашим наблюдениям, высокая экспрессия одного из теломерных транспозонов, *HeT-A*, в голове может быть характерна и для линии дикого типа. В связи с этим, мы можем заключить, что фенотип flamenco обуславливает изменение паттерна экспрессии теломерных ретротранспозонов. Экспрессия всех ретротранспозонов, за исключением *Tirant*, намного выше в соматических тканях, нежели в яичниках, что согласуется с данными из литературы (Akkouche et al., 2013). Для теломерных LINE и LTR-ретротранспозона *gypsy* наиболее высокий уровень экспрессии наблюдается в голове и ЦНС личинок, *blood* экспрессируется приблизительно одинаково в разных типах соматических тканей, в то время, как *coria* и *roo*, принадлежащие двум разным филогенетическим группам, проявляют наибольшую активность в тканях корпуса. Таким образом, тканеспецифическая экспрессия ретротранспозонов не зависит от филогенетической группы, к которой он принадлежит.

Также мы измерили экспрессию некоторых отдельных ретротранспозонов в линии Д32 и выявили те же закономерности распределения экспрессии по тканям для этих ретротранспозонов, что и в двух других линиях (Рис. 14).

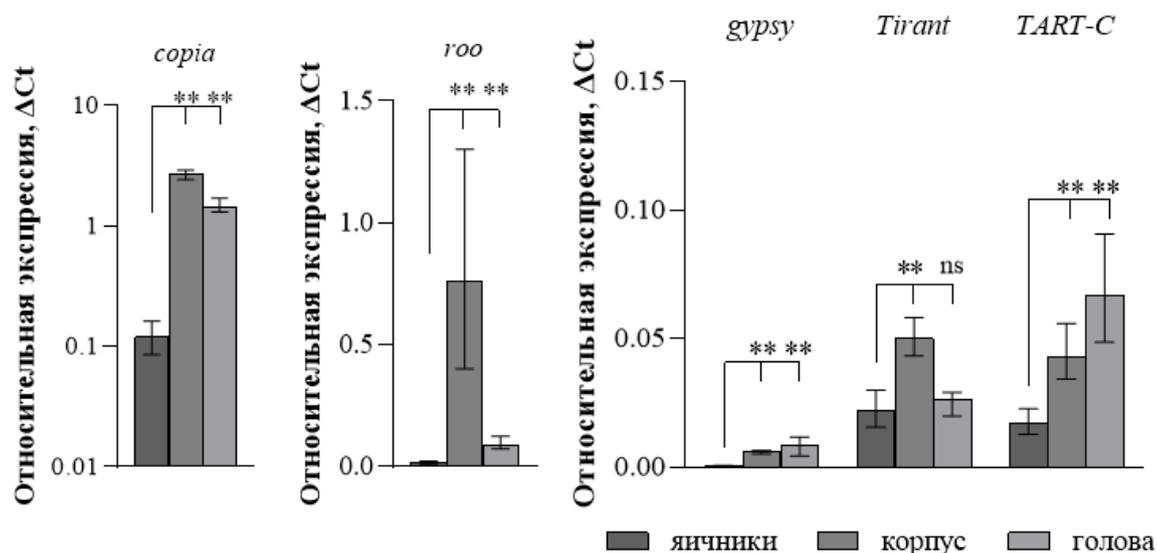


Рисунок 14. Относительная экспрессия ДКП-ретротранспозонов *coria*, *gypsy*, *roo*, *Tirant* и теломерного LINE-элемента *TART-C* в тканях яичников, корпуса, головы самок Д32 (\*\* —  $p < 0,01$ ; ns, not significant – статистически не значимое изменение).

Таким образом, паттерн экспрессии ретротранспозонов в линии SS с фенотипом flamenco практически не отличается от линий дикого типа, и мы видим, что в независимости от состояния системы рiРНК-интерференции различные ретротранспозоны характеризуются более высокой экспрессией в определённых генеративных либо в

соматических тканях. В связи с этим далее мы измерили уровень экспрессии основных генов-участников РНК-интерференции и кластеров рiРНК, чтобы учесть особенности работы системы рiРНК-интерференции в этих тканях.

В рамках системы рiРНК-интерференции кластер – это участок генома, где произошло накопление ретротранспозонов, и с которого РНК-полимераза II транскрибирует единые протяжённые транскрипты. По современным представлениям функцию кластера могут выполнять и одиночные последовательности МГЭ (Miller et al., 2023), причём новые вставки ретротранспозонов могут значительно изменять работу сайтов инсерции, поэтому измерить экспрессию всех источников рiРНК невозможно. В связи с этим, мы провели анализ экспрессии наиболее изученных кластеров рiРНК *flamenco*, *42AB*, *20A*, *38C*, описанных в работах (Hur et al., 2016; Potapova et al., 2009; Zanni et al., 2013; Zhang et al., 2014) в линиях Oregon R, w<sup>1118</sup>, SS, MS.

Для кластеров *flamenco* и *42AB* мы проводили анализ сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов. Для остальных двух кластеров, *20A* и *38C*, мы провели анализ только несплайсированных форм транскриптов, так как сплайсоформы для них не аннотированы.

Кластер *flamenco* является одноцепочечным кластером, а *42AB* – двуцепочечным. Транскрипты одноцепочечных кластеров в норме подвергаются сплайсингу, в то время, как сплайсингу транскриптов двуцепочечных кластеров препятствует комплекс RDC (Rhino, Deadlock, Cutoff) (Mohn et al., 2014). Однако, это не означает, что в клетке присутствуют только сплайсированные либо несплайсированные транскрипты соответствующих кластеров: для нормальной работы системы рiРНК-интерференции необходим баланс между двумя формами транскриптов. Слишком активный сплайсинг транскриптов кластеров, как и его отсутствие могут приводить к изменению количества рiРНК, которые содержатся в интронах.

Мы выявили, что линии SS и Canton-S различаются по уровню экспрессии кластера *42AB*: у линии SS мы наблюдаем большее количество несплайсированных форм в яичниках. В то же время, сплайсированные формы транскриптов кластера *flamenco* накапливаются в большом количестве у линии SS, в то время, как у Canton-S эти формы транскриптов практически отсутствуют (Рис.15). Такой же результат был получен и для линии Д32 ранее в нашей лаборатории (Лавренов и др., 2014). Экспрессия двуцепочечного кластера *38C* в обеих точках у двух линий одинакова, однако, экспрессия одноцепочечного кластера *20A* высокая у линии SS во всех тканях, кроме ЦНС личинок, в то время, как у Canton-S, наоборот, транскрипты кластера *20A* высоко экспрессируются в

ЦНС личинок. Таким образом, линии SS и Canton-S отличаются по экспрессии транскриптов обоих типов кластеров.

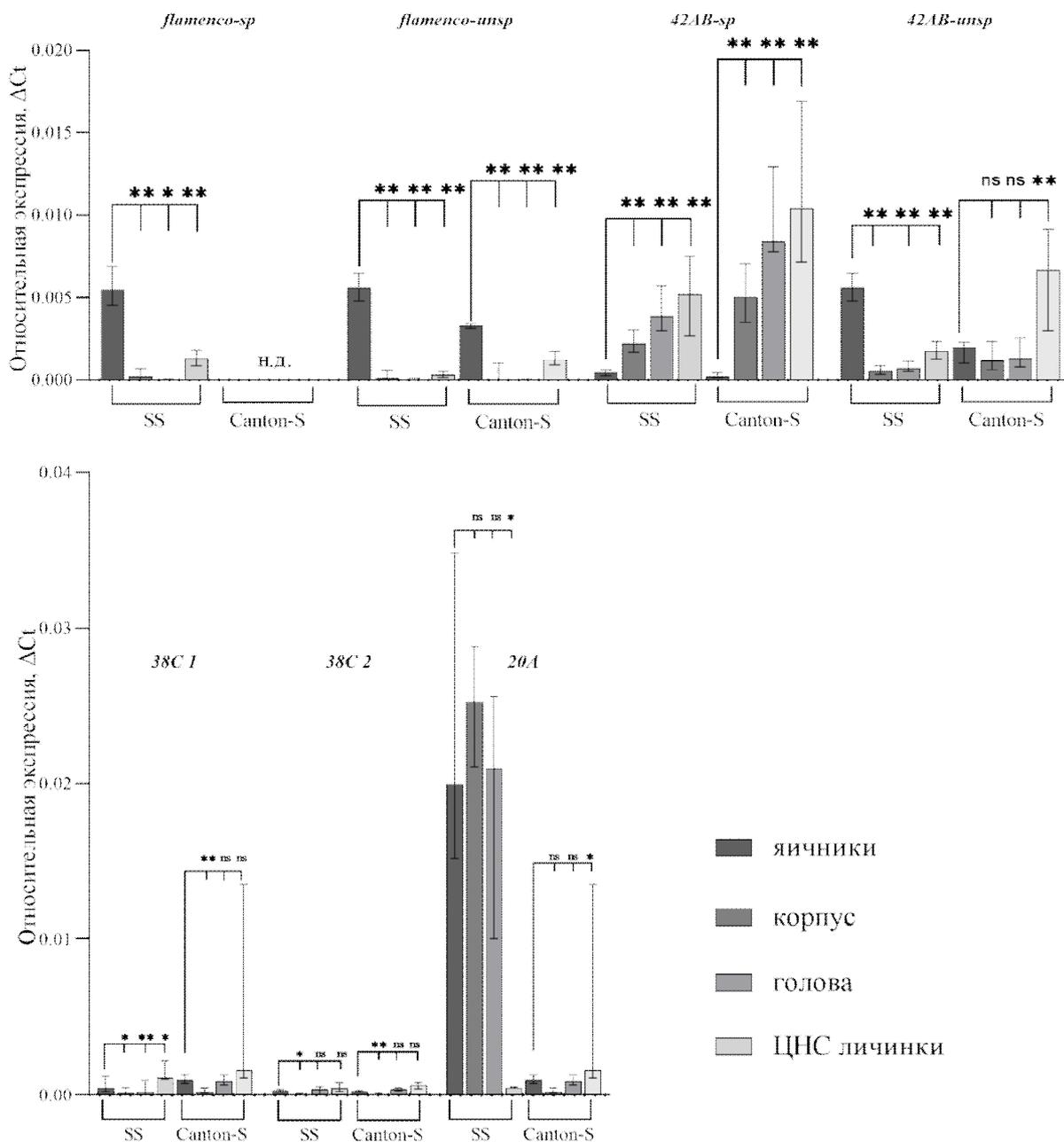


Рисунок 15. Относительная экспрессия различных кластеров piRNA в тканях яичников, головы и корпуса у самок SS и Canton-S (sp – сплайсированные формы, unsp – несплайсированные формы (\*-  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ ; ns, not significant – статистически незначимое изменение; н.д. – не детектируется).

Согласно базе данных FlyBase, кластер *20A* содержит копии *roo*, *scopia* и *blood*, а кластер *flamenco* – копию *gypsy*. Однако между линиями SS и Canton-S мы наблюдаем только различия по экспрессии *blood* и *scopia*, что может быть также следствием и разной

последовательности регуляторных участков отдельных копий этих МГЭ. Линия SS обнаруживает изменённый процессинг транскриптов обоих типов кластеров, однако это не сказывается на экспрессии ДКП-ретротранспозонов. Тем не менее, в линии SS теломерные LINE, находящиеся под контролем пути процессинга двуцепочечных кластеров, демонстрируют повышенную экспрессию в тканях головы имаго и ЦНС личинки, поэтому мы видим в данном случае корреляцию между нарушением процессинга транскриптов кластеров и повышенной экспрессией LINE в соматических тканях.

Также мы обнаружили, что МГЭ наиболее активно экспрессируются в соматических тканях, за исключением ДКП-ретротранспозона *Tirant*. При этом наибольшая экспрессия почти всех исследуемых кластеров наблюдается в яичниках и ЦНС личинки. Однако прямого соответствия между экспрессией ретротранспозонов и кластеров нет.

Также мы проанализировали экспрессию *flamenco* и *42AB* в яичниках у линии Д32: экспрессия данных кластеров у этой линии близка к таковой у линии Canton-S (Рис.16).

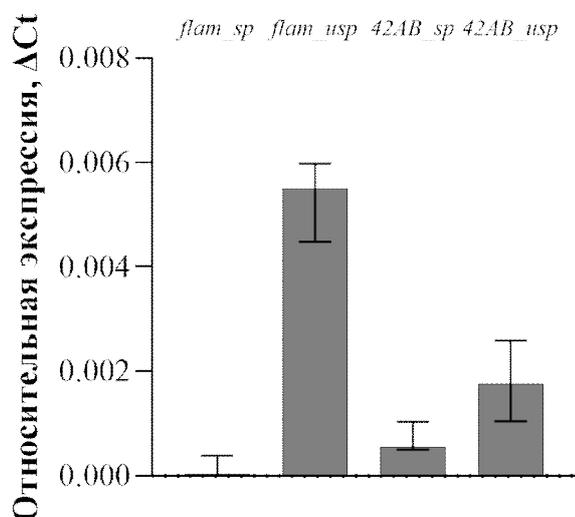


Рисунок 16. Относительная экспрессия различных кластеров рiРНК в тканях яичников Д32 (sp – сплайсированные формы транскриптов, usp – несплайсированные формы транскриптов).

#### 4.1.3. Анализ экспрессии генов, участвующих в рiРНК-интерференции, в линии Canton-S

Так как мы наблюдаем тканеспецифичную экспрессию кластеров рiРНК и ретротранспозонов, однако нет чёткой корреляции между этими двумя факторами, мы измерили экспрессию генов-участников рiРНК-интерференции в тех же тканях.

Для анализа экспрессии генов рiРНК-интерференции мы использовали линию дикого типа Canton-S. По данным, полученным в нашей лаборатории при анализе транскриптома, у линии SS нет отличий по экспрессии данных генов от дикого типа (Кукушкина et al., 2020). В связи с этим потканевую экспрессию этих генов рiРНК-интерференции анализировали только у линии Canton-S (Рис.17).

Как и следовало ожидать, наибольшая экспрессия всех основных генов, участвующих в рiРНК-интерференции наблюдается в тканях яичников. Исключение составляет ген *cas*, экспрессия которого наиболее высокая в ЦНС личинок. Как было продемонстрировано другими исследователями, снижение экспрессии *cas* ведет к накоплению предшественников рiРНК в нервной системе и снижению количества зрелых рiРНК. Это сказывается на подвижности личинок и 30-ти дневных мух (Wakisaka et al., 2019). Также было показано влияние мутаций в генах *aub*, *armi* и *ago3* на экспрессию ретротранспозонов в голове дрозофилы: определенные LINE и ДКП-ретротранспозоны (*HeT-A*, *blood*, *gypsy*) повышают свою экспрессию при мутациях отдельных генов-участников, более того, эти гены экспрессируются в отдельных нейронах головных ганглиев дрозофилы (Perrat et al., 2013). Вероятно, низкая экспрессия отдельных генов рiРНК-интерференции в соматических тканях по сравнению с яичниками связана с тем, что в этих тканях данный способ контроля МГЭ используется только в небольших группах клеток. Мы не обнаружили экспрессию *cuff*, *VoYb*, *zuc* и *vasa* в тканях головы. Однако мы не исключаем, что рiРНК-интерференция может идти в этих тканях по измененному механизму.

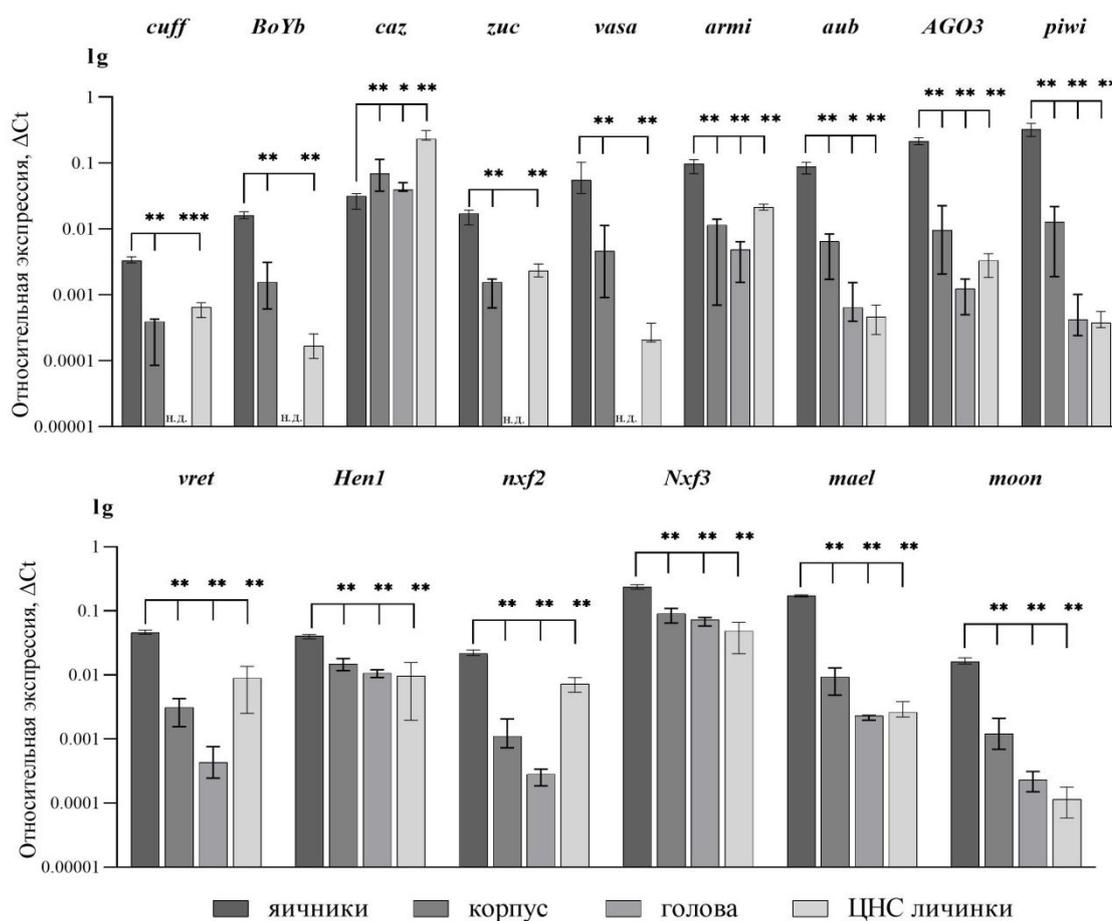


Рисунок 17. Логарифм относительной экспрессии генов-участников piRNA-интерференции в тканях яичников, корпуса и головы самок, а также в тканях ЦНС личинок третьего возраста линии Canton-S (н.д. – не детектируется; \*-  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ ).

Таким образом, мы выявили, что ретротранспозоны и кластеры обладают тканеспецифичной экспрессией, однако нет прямой зависимости между выявленными нами особенностями линии SS и экспрессией в ней ретротранспозонов. Более того, тканеспецифичная экспрессия ретротранспозонов не объясняется только сниженной экспрессией генов-участников piRNA-интерференции в соматических тканях. В связи с этим, далее мы проанализировали, как отсутствие функции основных генов-участников piRNA-интерференции (*rhino* и *piwi*) повлияет на экспрессию ретротранспозонов в различных тканях дрозофилы.

#### 4.1.4. Влияние *rhino* на экспрессию кластеров piRNA и ретротранспозонов в генеративных и соматических тканях

Влияние геномного стресса, возникающего в результате нарушения работы отдельных генов, участвующих в процессе рiРНК-интерференции, наиболее подробно изучено на яичниках *D. melanogaster*. Такие мутации могут приводить как к нарушению фертильности, так и значимо сказываться на развитии эмбрионов вплоть до нарушения осевой разметки. Гены, участвующие в рiРНК-интерференции, работают в разных клеточных структурах и на разных этапах этого процесса. В связи с этим эффект от изменения функции отдельных компонентов этого механизма оказывают не одинаковые эффекты на развитие дрозофилы. Роль компонентов системы рiРНК-интерференции в соматических тканях изучена мало, однако исследования отдельных генов-участников рiРНК-интерференции показывают, что при их мутации изменяется экспрессия ретротранспозонов в соматических тканях. Мы выбрали для исследования два центральных гена рiРНК-интерференции: *rhino*, который отвечает за процессинг транскриптов двуцепочечных кластеров и экспрессия которого снижена у линии *SS*, и *piwi*, который играет важную роль в процессинге транскриптов обоих типов кластеров.

Мы провели нокдаун гена *rhino* и подтвердили снижение его экспрессии с помощью количественной ПЦР (Рис.18).

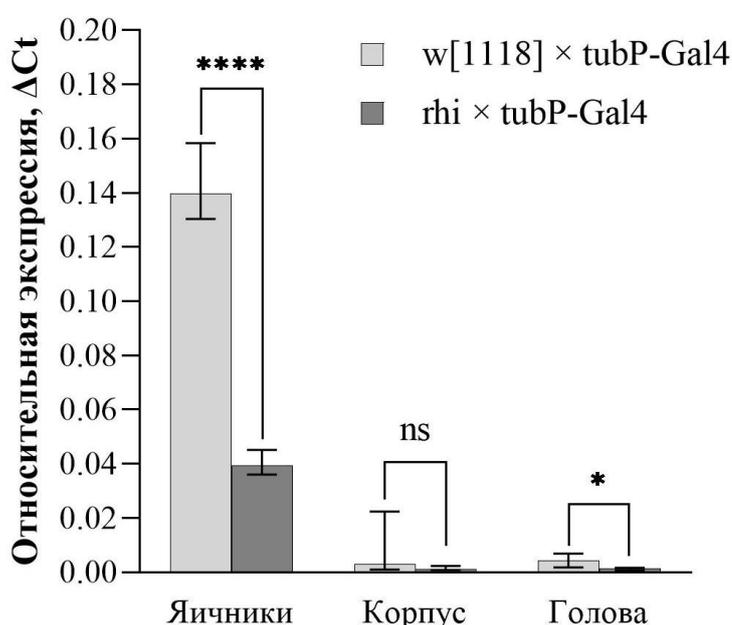


Рисунок 18. Относительная экспрессия гена *rhino* в тканях яичников, корпуса и головы у семидневных самок гибридов с нокдауном гена *rhino* и контрольных гибридов (\* -  $p < 0,05$ , \*\*\*\* —  $p < 0,0001$  по критерию Манна-Уитни; ns, not significant – статистически незначимое изменение).

Наиболее сильное снижение экспрессии выявлено в яичниках, основном месте работы *rhino*. В соматических тканях снижение было слабым либо статистически не

значимым, однако мы предполагаем, что это могло быть следствием изначально низкого уровня экспрессии *rhino* в соматических тканях.

Оценив экспрессию ретротранспозонов в различных тканях, мы отметили более высокую экспрессию ретротранспозонов *HeT-A*, *TART-C*, *gypsy* и *copia* в тканях яичников и корпуса гибридов с нокдауном *rhino* относительно контрольных гибридов. При этом эволюционно близкие ретротранспозоны по-разному реагируют на снижение экспрессии *rhino*: *TART-B* значимо повышает экспрессию как в яичниках, так и в других соматических тканях, в то время как *TART-A* – исключительно в тканях головы. Для *blood* и *Tirant* мы обнаружили снижение экспрессии только в одной из исследуемых тканей, в то время как экспрессия *roo* повышается в яичниках, но снижается в корпусе (Рис.19).

После этого мы измерили экспрессию кластеров рiРНК (Рис.20а). Мы выявили, что у гибридов с нокдауном *rhino* значительно больше сплайсированных форм транскриптов кластеров *42AB* и *flamenco* относительно гибридов от контрольного скрещивания. Для кластера *42AB* такой результат был ожидаем, так как в работах других исследователей была показана зависимость процессинга транскриптов данного кластера от функциональности комплекса RDC (Zhang et al., 2014). Примечательно, что мы наблюдаем эти изменения не только в яичниках, но и в соматических тканях – тканях головы. В тканях корпуса мы не обнаружили изменений, так как количество несплайсированных форм кластера в этих тканях оказалось выше, чем в контроле.

Мы также зарегистрировали повышение количества сплайсированных транскриптов кластера *flamenco* и вычислили соотношение сплайсированных форм к несплайсированным в каждом образце (Рис.20б). В случае кластера *flamenco* мы также обнаружили статистически значимые различия между опытом и контролем, однако значимость была гораздо ниже, чем для кластера *42AB*.

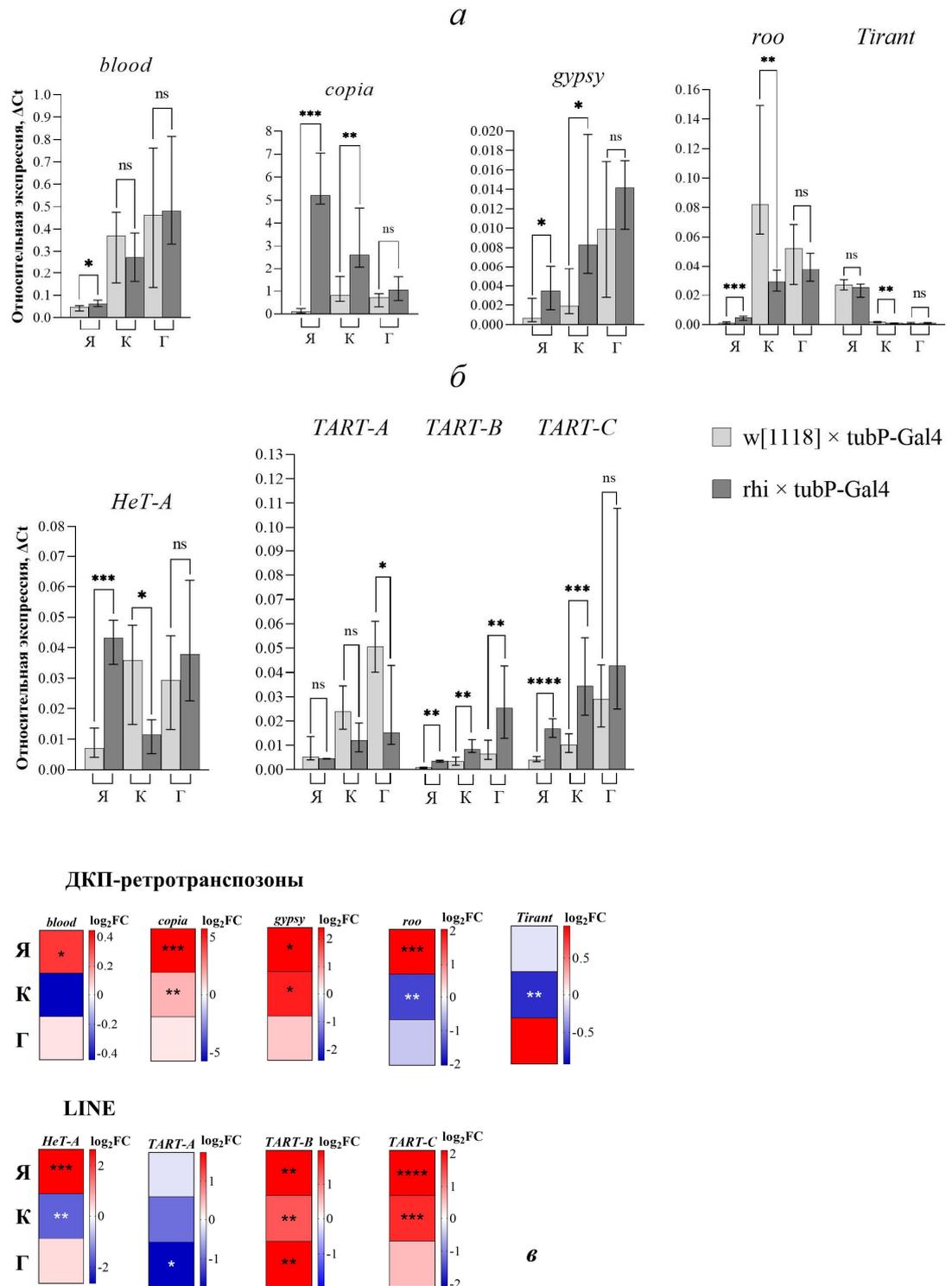


Рисунок 19. Относительная экспрессия различных ретротранспозонов в тканях яичников, головы и корпуса. а – ДКП-ретротранспозоны; б – LINE-элементы; в – изменение тканеспецифичной экспрессии ретротранспозонов при нокадауне *rhino* относительно контроля (FC – Fold Change – кратность изменения экспрессии) (Я – яичники, К – корпус, Г – голова) (\*-  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$  по критерию Манна-Уитни; ns, not significant – статистически незначимое изменение).

Далее мы решили проверить, влияют ли найденные изменения на процессинг транскриптов одноцепочечного кластера *flamenco*. Для проверки методом ОТ-ПЦР измерили уровень транскрипции рiРНК *11620* в яичниках гибридов. Эта рiРНК кодируется в интроне, который не входит в область нашего анализа, однако интересна тем, что комплементарна копии ДКП-ретротранспозона *gypsy* из кластера. Для исследуемой рiРНК мы не наблюдали изменения экспрессии в нашем эксперименте (Рис.20в). Другими исследователями также было выявлено, что нарушение работы гена *rhino* не приводит к изменению экспрессии рiРНК *flamenco* (Klattenhoff et al., 2009; Zhang et al., 2014).

Также показано, что кластеры, в том числе и *42AB*, могут транскрибироваться с помощью комплекса RDC только в одном из направлений (Parhad et al., 2020). Более того, подавляющее большинство (но не все) последовательности ретротранспозонов в кластере *flamenco* транскрибируются в одном и том же направлении. Отдельные копии в этом кластере встроены коллинеарно транскрипции самого кластера. Так как кластеры рiРНК – это быстро изменяющиеся участки генома, мы не можем отрицать, что наблюдаемые нами эффекты при нокдауне *rhino* могут быть связаны с постепенным изменением механизмов регуляции *flamenco*. И что в ходе эволюции он не начнёт функционировать как двуцепочечный кластер.

Таким образом, не все ретротранспозоны отвечают повышением экспрессии в ответ на нарушение сплайсинга РНК-предшественников рiРНК, хотя затрагивается сплайсинг обоих типов кластеров. Мы предполагаем, что такое изменение экспрессии ретротранспозонов может быть связано с перенаправлением неправильно сплайсированных транскриптов по пути siРНК-интерференции, что было показано на дрожжах (Fleckner et al., 1997). Более того, известно, что соматические siРНК также картируются на кластеры рiРНК (Chung et al., 2008), поэтому не исключено, что в соматических тканях при снижении экспрессии *rhino* сплайсированные формы транскриптов двуцепочечных кластеров остаются в качестве источников siРНК, и это приводит к дополнительной репрессии отдельных ретротранспозонов. Более того, Rhino контролирует экспрессию *24AB* за пределами гонад. И при отсутствии его функции происходит генерализованное повышение экспрессии большинства ретротранспозонов в соматических тканях.

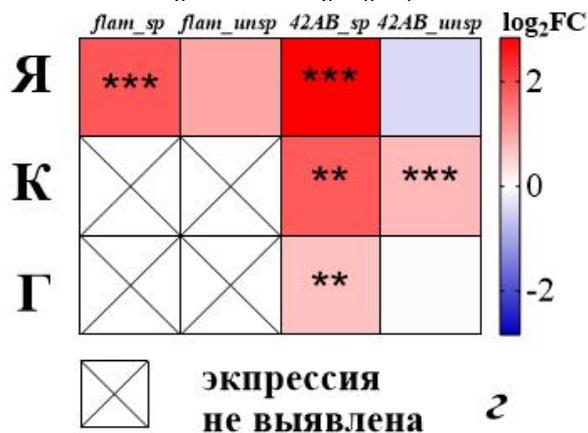
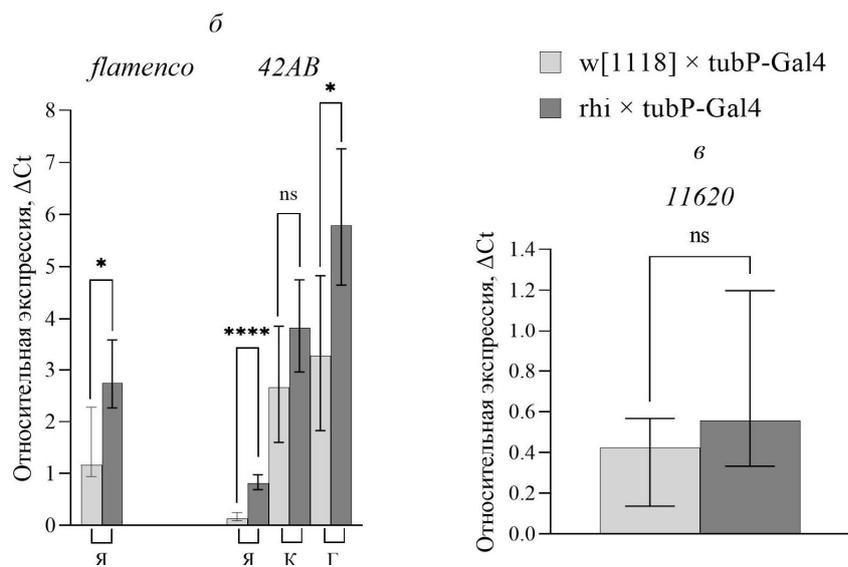
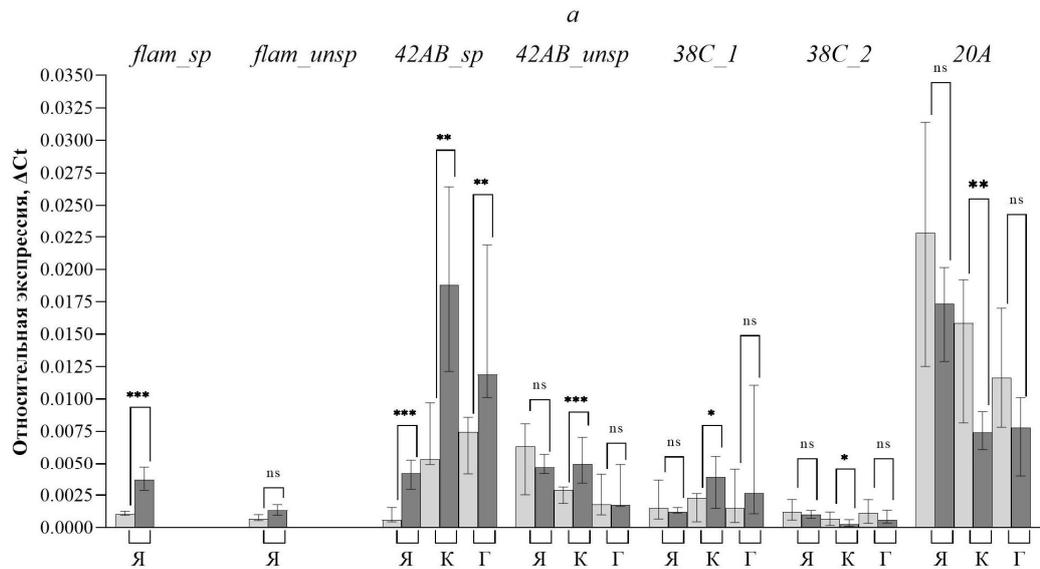


Рисунок 20. Относительный уровень транскрипции различных кластеров рiРНК в тканях яичников, головы и корпуса. а – Относительный уровень транскрипции сплайсированных и несплайсированных форм одноцепочечных и

двучепочечных кластеров; б – Соотношение уровней транскрипции сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов кластеров *flamenco* (одноцепочечный) и *42AB* (двучепочечный); в – относительный уровень транскрипции рiРНК *11620* (кластер *flamenco*) в яичниках; z - изменение тканеспецифичной экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов кластеров рiРНК при нокдауне *rhino* относительно контроля (FC – Fold Change – кратность изменения экспрессии) Я – яичники, К – корпус, Г - голова) (\*—  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$ , \*\*\*\* —  $p < 0,0001$  по критерию Манна-Уитни; ns, not significant – статистически незначимое изменение).

#### 4.1.5. Влияние *piwi* на экспрессию кластеров рiРНК и ретротранспозонов в генеративных и соматических тканях

Белок PIWI является одним из центральных компонентов обоих механизмов рiРНК-интерференции, протекающих в соматических и питающих клетках яичников дрозофилы. Его функция необходима для переноса рiРНК в ядро и индукции гетерохроматинизации последовательностей, которым комплементарны рiРНК, получаемые PIWI из цикла «пинг-понг» и Yb-body (Yamashiro and Siomi, 2018). Мы получили гибриды в реципрокных скрещиваниях линий *piwi*[2] и *piwi*[3]. В обоих направлениях скрещивания мы не наблюдали у самок яичников. Ранее в работах (Klenov et al., 2011; Wang and Elgin, 2011) было продемонстрировано, что у гомозигот мутантов *piwi*[2] яичники состоят исключительно из соматических тканей, а клетки зародышевого пути отсутствуют, так как ткань дифференцировалась полностью.

Как и в работах других авторов (Klenov et al., 2011; Wang and Elgin, 2011), мы наблюдали повышение экспрессии *gypsy* и *coria*, однако, только в одном из направлений скрещивания, и повышение экспрессии *roo* в обоих направлениях скрещивания (рис. 21). Таким образом, при мутации *piwi* отдельные ДКП-ретротранспозоны повышают экспрессию, в то время как теломерные ретротранспозоны в нашем случае не повышали экспрессию, а *HeT-A* снизил экспрессию в обоих случаях, хотя по литературным данным отсутствие PIWI приводит к повышению экспрессии этого LINE, так как отсутствует антисмысловая РНК (Klenov et al., 2011) (Рис.21). Однако, в данной работе рассматривались только мутации в гомозиготе, а в случае компаунда мутаций мы наблюдаем обратный эффект.

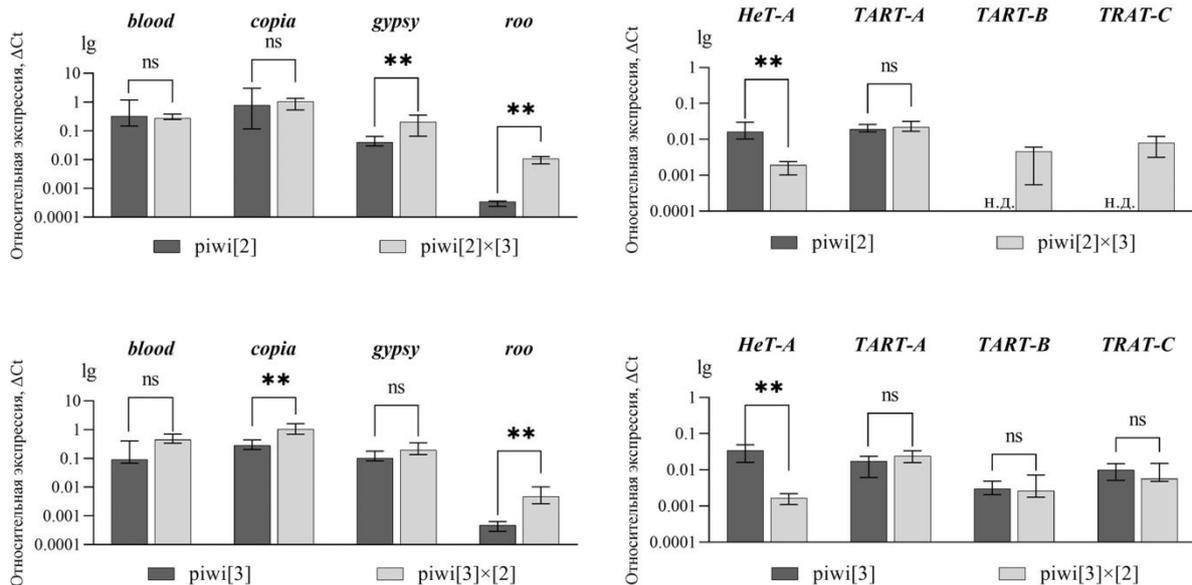


Рисунок 21. Логарифм относительной экспрессии ДКП-ретротранспозонов *blood*, *copia*, *gypsy*, *roo* и *Tirant* (а) и теломерных ретротранспозонов *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и *HeT-A* (б) в тканях яичников линий *piwi[2]* и *piwi[3]*, а также самок F<sub>1</sub> (К - корпус, Г — голова; н.д. – не детектируется; \*\* —  $p < 0.01$ ; ns, not significant – статистически незначимое изменение).

В обоих направлениях скрещивания снижается экспрессия кластера *flamenco*, однако кластер *42AB* экспрессируется выше у гибридов по сравнению с родительскими линиями. Таким образом, компаунд мутаций *piwi* в нашем случае приводит к повышенной экспрессии двуцепочечного кластера *42AB*. Так как экспрессия теломерных кластеров, также как и *42AB*, зависит от комплекса RDC, возможно, что экспрессия *HeT-A* ниже у гибридов, чем у родительских линий, так как теломерные кластеры могли повысить экспрессию в тканях яичников у гибридов (на диаграммах в этом разделе логарифмическая шкала) (Рис.22).

В тканях головы влияние мутаций *piwi* на экспрессию кластеров рiРНК и ретротранспозонов ранее не изучалось. Так как для двух других центральных участников РНК-интерференции, *ago3* и *aub*, ранее была продемонстрирована слабая экспрессия в отдельных нейронах дрозофилы (Perrat et al., 2013), мы решили проверить, насколько комбинация мутаций *piwi* повлияет на экспрессию кластеров рiРНК и ретротранспозонов в соматических тканях.

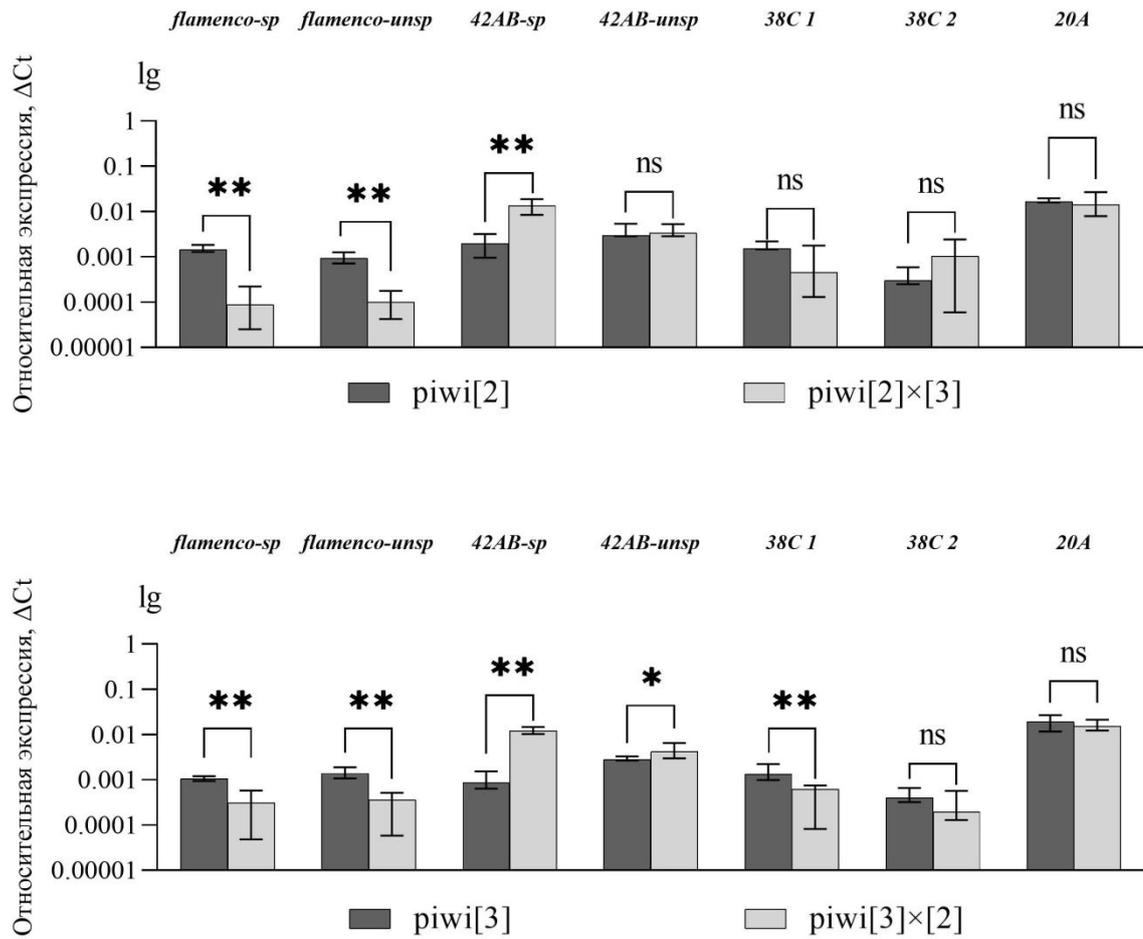


Рисунок 22. Логарифм относительной экспрессии различных кластеров piRNA в тканях яичников линий piwi[2] и piwi[3], а также самок F<sub>1</sub> (sp – сплайсированные формы, unsp – несплайсированные формы. К – корпус, Г – голова; н.д. – не детектируется; \* – p<0.05, \*\* – p<0.01; \*\*\* – p<0.001; ns, not significant – статистически незначимое изменение).

Измерив экспрессию ретротранспозонов у piwi[2] и piwi[3], мы обнаружили, что вне зависимости от направления скрещивания экспрессия ДКП-ретротранспозона *gypsy* повышается в голове и корпусе, хотя в случае скрещивания piwi[3] x piwi[2] это различие статистически незначимо. Экспрессия ретротранспозонов *copia* и *TART-A* снижается в корпусе и голове в обоих направлениях. Для ретротранспозонов *blood* и *roo* мы обнаружили различия между направлениями скрещиваний: в случае направления ♀piwi[2] x ♂piwi[3] их экспрессия в голове остаётся неизменной, а у других гибридов она снижается. Примечательно, что на фоне пониженной экспрессии *42AB* у piwi[3] повышена экспрессия ретротранспозона *blood*. Однако в данном случае, мы не можем выявить четкие причинно-следственные связи между этими двумя наблюдениями. Также мы не смогли обнаружить разницу в экспрессии *TART-B* и *TART-C*, так как их экспрессия у самок piwi[2] практически отсутствует, однако мы видим, что у гибридов

♀*piwi*[2]×♂*piwi*[3] экспрессия этих ретротранспозонов не превосходит уровень экспрессии у ♀*piwi*[3], а у гибридов ♀*piwi*[3]×♂*piwi*[2] эта экспрессия ниже, чем у ♀*piwi*[3]. Таким образом, при отсутствии нормальной функции PIWI экспрессия теломерных LINE в соматических тканях повышается (Рис.23).

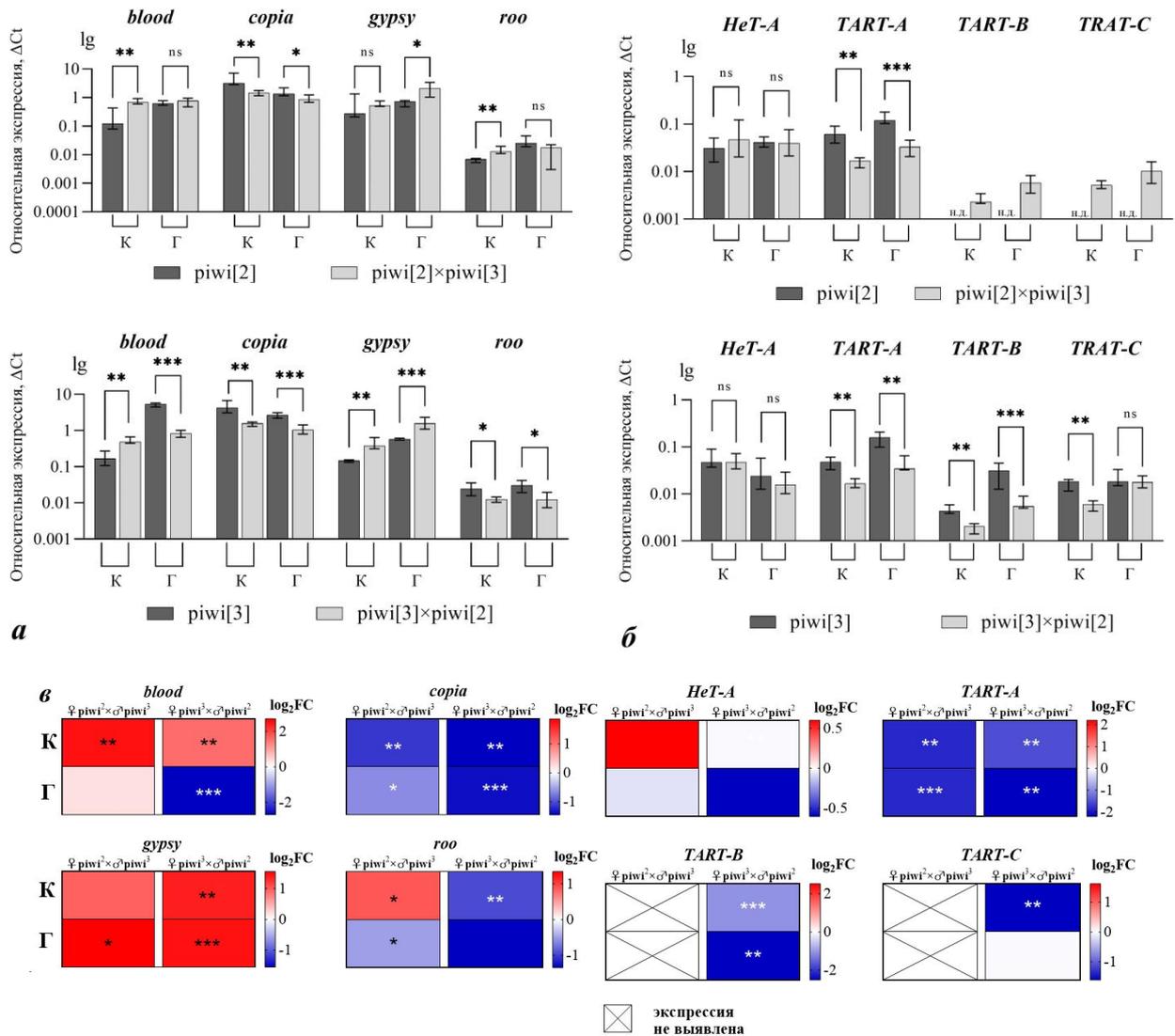


Рисунок 23. Логарифм относительной экспрессии ДКП-ретротранспозонов *blood*, *copia*, *gypsy*, *roo* и *Tirant* (а) и теломерных ретротранспозонов *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и *HeT-A* (б) в тканях корпуса и головы самок линий *piwi*[2] и *piwi*[3], а также самок F<sub>1</sub>. в – Относительная экспрессия ретротранспозонов в соматических тканях гибридов *piwi*<sup>2</sup>/*piwi*<sup>3</sup> и *piwi*<sup>3</sup>/*piwi*<sup>2</sup> относительно родительских самок (FC – Fold Change – кратность изменения экспрессии) (К - корпус, Г — голова; н.д. – не детектируется; \* - p<0.05, \*\* — p<0.01; \*\*\* — p<0.001; ns, not significant – статистически незначимое изменение).

Так как PIWI индуцирует метилирование гистонов на участках генома, которые содержат последовательности ретротранспозонов, тем самым способствуя превращению

их в кластеры, мы решили посмотреть, как мутация *piwi* повлияет на работу кластеров у гибридов в соматических тканях (Рис.23). Мы обнаружили, что при компаунде мутаций *piwi* количество сплайсированных форм кластера *42AB* увеличивается в соматических тканях. Это может быть связано как с накоплением сплайсированных форм, в связи с невозможностью их утилизации белком PIWI, так и с тотальным нарушением поддержания стволовых клеток, в которых *piwi* работает наиболее активно.

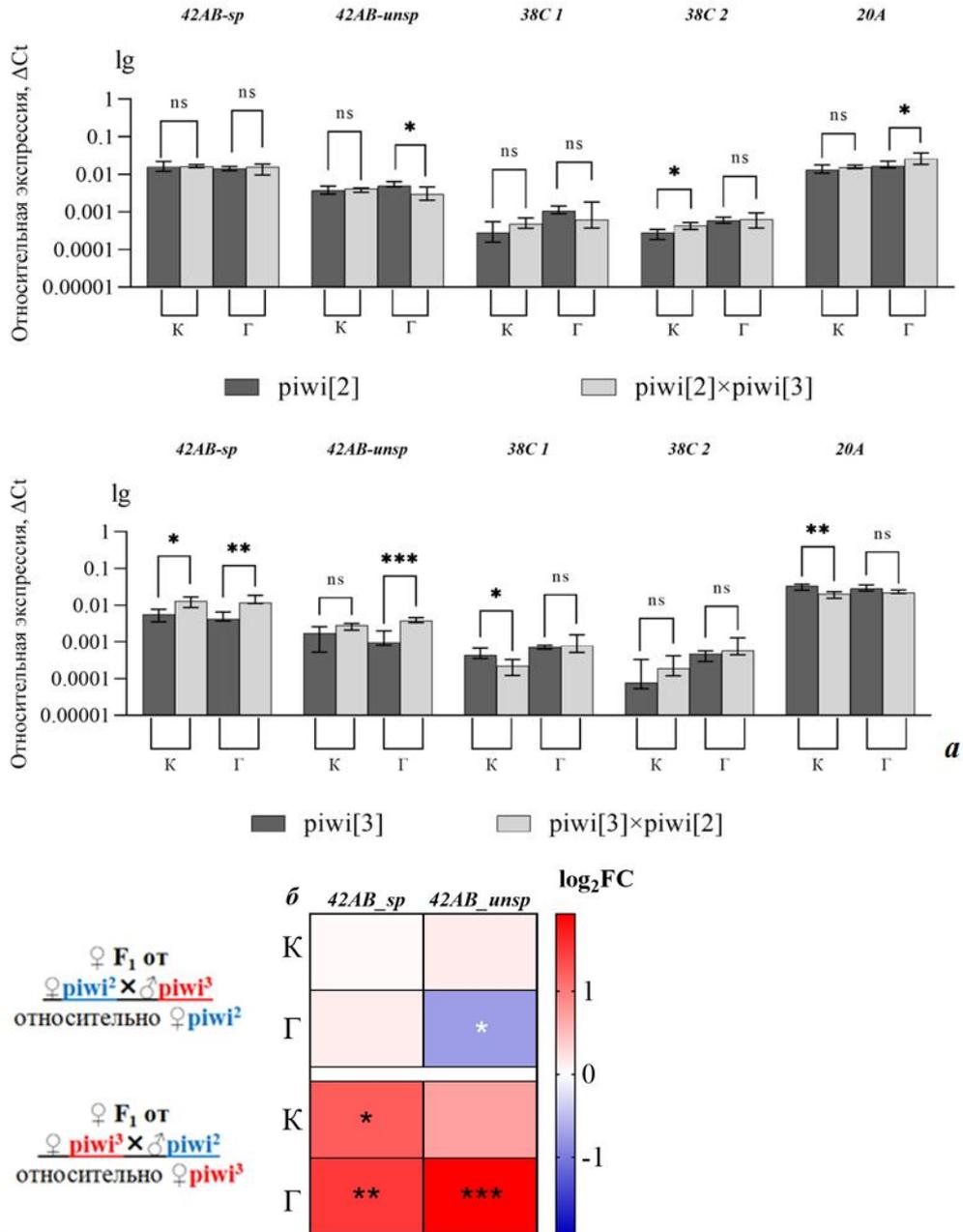


Рисунок 24. Логарифм относительной экспрессии различных кластеров рiРНК в тканях корпуса и головы самок линий *piwi*[2] и *piwi*[3], а также самок F<sub>1</sub> (а) и экспрессия сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов кластера рiРНК *42AB* в соматических тканях гибридов *piwi*<sup>2</sup>/*piwi*<sup>3</sup> и *piwi*<sup>3</sup>/*piwi*<sup>2</sup> относительно родительских самок (б) (FC – Fold Change – кратность изменения экспрессии; sp – сплайсированные формы, unsp – несплайсированные формы; К – корпус, Г – голова; н.д. –

не детектируется; \* –  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$ ; ns, not significant – статистически незначимое изменение).

Таким образом, отсутствие нормальной функции PIWI приводит к повышению экспрессии отдельных ретротранспозонов в соматических тканях. А также влияет на процессинг кластера *42AB*.

Подводя итоги рассмотренных нарушений контроля экспрессии ретротранспозонов, отметим, что мутации в основных генах piРНК-интерференции влияют на экспрессию ретротранспозонов и процессинг транскриптов кластеров, в то время как линия с фенотипом *flamenco* демонстрирует только нарушение процессинга транскриптов кластеров piРНК. Так как система piРНК-интерференции может быть подвержена влиянию стресса, мы решили проанализировать экспрессии РТ и кластеров в линии *SS* и *Canton-S* в стрессовых условиях.

## 4.2. Экспрессия ретротранспозонов во время стресса

В предыдущих разделах мы продемонстрировали, что у линии *SS* нарушен процессинг транскриптов кластеров piРНК. Также другими исследователями на комаре было продемонстрировано, что цитохром *CpCYP307B1* регулируется с помощью *piРНК-3878* (Ye et al., 2017). Такой способ регуляции описан и для самих генов-участников piРНК-интерференции (Ramat and Simonelig, 2021). В связи с этим мы не исключаем, что во время стресса система piРНК-интерференции дрозофилы, так же как у комара, может регулировать силу стрессового ответа, и разница в процессинге транскриптов кластера *flamenco* между линией *SS* и линиями дикого типа, *Canton-S* и *Д32*, может сказаться на экспрессии ретротранспозонов у этих линий при стрессе.

### 4.2.1. Устойчивость линии *SS* к борной кислоте

Борная кислота является одним из широко применяемых в быту инсектицидов. Данное вещество оказывает влияние, как на пищеварительную, так и на нервную систему, являясь индуктором окислительного стресса и одновременно нейропаралитическим ядом. Попадая в организм насекомого, борная кислота приводит к эрозии кишечника, аномалии мальпигиевых сосудов и жирового тела (Büyükgüzel et al., 2013; Da Silva Cruz et al., 2010; Habes et al., 2006; Klotz et al., 2002; Sumida et al., 2010). На дрозофиле данный инсектицид изучался наряду с другими ксенобиотиками, и было показано, что устойчивость к борной

кислоте определяется *Cyp9b2*, нокдаун которого приводит к снижению устойчивости к этому агенту в 1,5 раза (Najarro et al., 2017).

В ходе секвенирования генома линии SS была обнаружена мутация в гене *Cyp9b1* (см. раздел 4.1.1), который совпадает по последовательности с геном *Cyp9b2* на 81%, а аминокислотные последовательности их продуктов совпадают на 75% (согласно выравниванию нуклеотидных и аминокислотных последовательностей соответственно). Гены *Cyp9b1* и *Cyp9b2* находятся в одном локусе и образовались в результате дупликации. Поэтому мы не исключали, что в исследовании с нокдауном гена *Cyp9b2* мог иметь место оффтаргет-эффект, и фенотип полученных гибридов является результатом снижения экспрессии обоих цитохромов. SS является мутантом со стоп-кодоном в гене *Cyp9b1*, что позволяет рассматривать функцию этого гена независимо от *Cyp9b2*.

Для начала мы измерили выживаемость самок линий SS и  $w^{1118}$ , чтобы проверить, не влияет ли отсутствие функции гена *w* на выживаемость мух. Эти две линии гомозиготны по двум разным аллелям гена *w*. Опытным путем мы подобрали концентрацию борной кислоты в корме 1%. В качестве дополнительного контроля взяли линию Д32, которая имеет алели дикого типа генов *w* и *Cyp9b1*. Через 98,5 часов после начала эксперимента среди самок линии SS было живо 65,7%, в то время как в  $w^{1118}$  и Д32 осталось только 22,7% и 46% соответственно (Рис.25). Таким образом, мы увидели, что линия SS, обладающая мутацией в гене *Cyp9b1*, наиболее устойчива к борной кислоте, нежели две других контрольных линии.

После этого мы взяли наиболее широко используемую линию дикого типа, Canton-S и проверили её генотип на присутствие мутации в гене *Cyp9b1* с помощью аллель-специфичной ПЦР. Мы выявили у этой линии гетерогенность по наличию данной мутации, поэтому вывели из неё линию со стоп-кодоном в гене *Cyp9b1* (CS-) и сравнили её выживаемость с линиями SS и Д32 (Рис. 25).

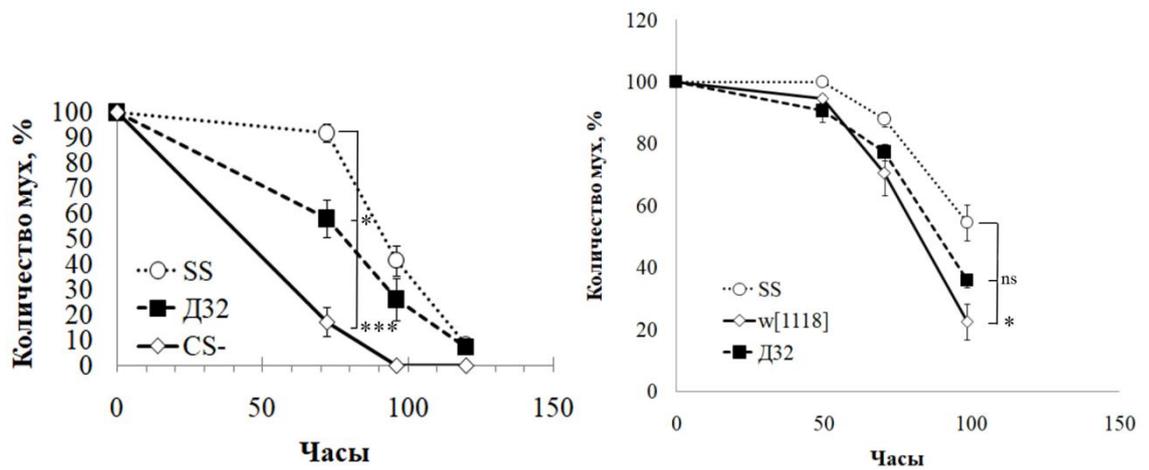


Рисунок 25. Выживаемость линий SS, Д32 и Canton-S и  $w^{1118}$  на среде, содержащей борную кислоту (\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  по критерию Манна–Уитни; ns, not significant – незначимое изменение).

Мы получили гибридов первого и второго поколения от линий SS и Д32 и проверили их на устойчивость к борной кислоте. Обнаружили в обоих направлениях скрещивания эффект гетерозиса, как в первом, так и во втором поколениях. Отобрав наиболее жизнеспособных гибридов второго поколения, мы провели их генотипирование. Соотношение среди гибридов второго поколения было 1:2:1 по гену *Sup9b1*. Это означает, что устойчивость к борной кислоте не зависит от мутации в этом гене (Рис.26).

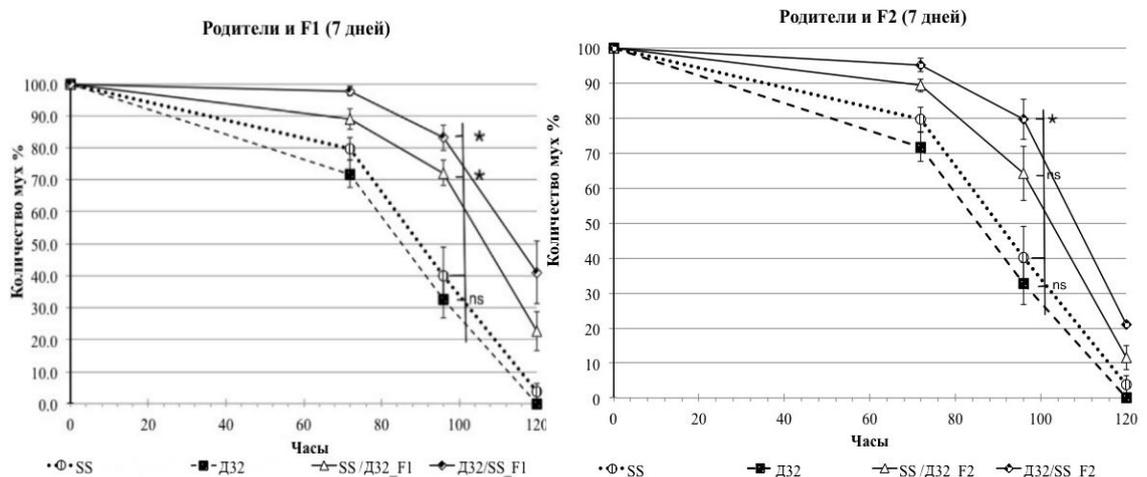


Рисунок 26. Выживаемость гибридов  $F_1$  и  $F_2$  линий SS и Д32 по сравнению с родительскими линиями на среде, содержащей борную кислоту (\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  по критерию Манна–Уитни; ns, not significant – незначимое изменение).

Мы также измерили уровень экспрессии генов *Cyp9b1* и *Cyp9b2* у родителей и гибридов при инкубации на нормальной среде и среде с борной кислотой. В результате мы увидели, что ген *Cyp9b2* индуцируется только у линии Д32, однако эти мухи погибают на борной кислоте быстрее, чем SS и гибриды обоих поколений. В отличие от него, экспрессия гена *Cyp9b2* коррелирует с выживаемостью на борной кислоте: гибриды первого и второго поколений отличаются повышенной устойчивостью к борной кислоте и обладают наибольшей экспрессией *Cyp9b2* при инкубации на среде с окислителем (Рис. 27).

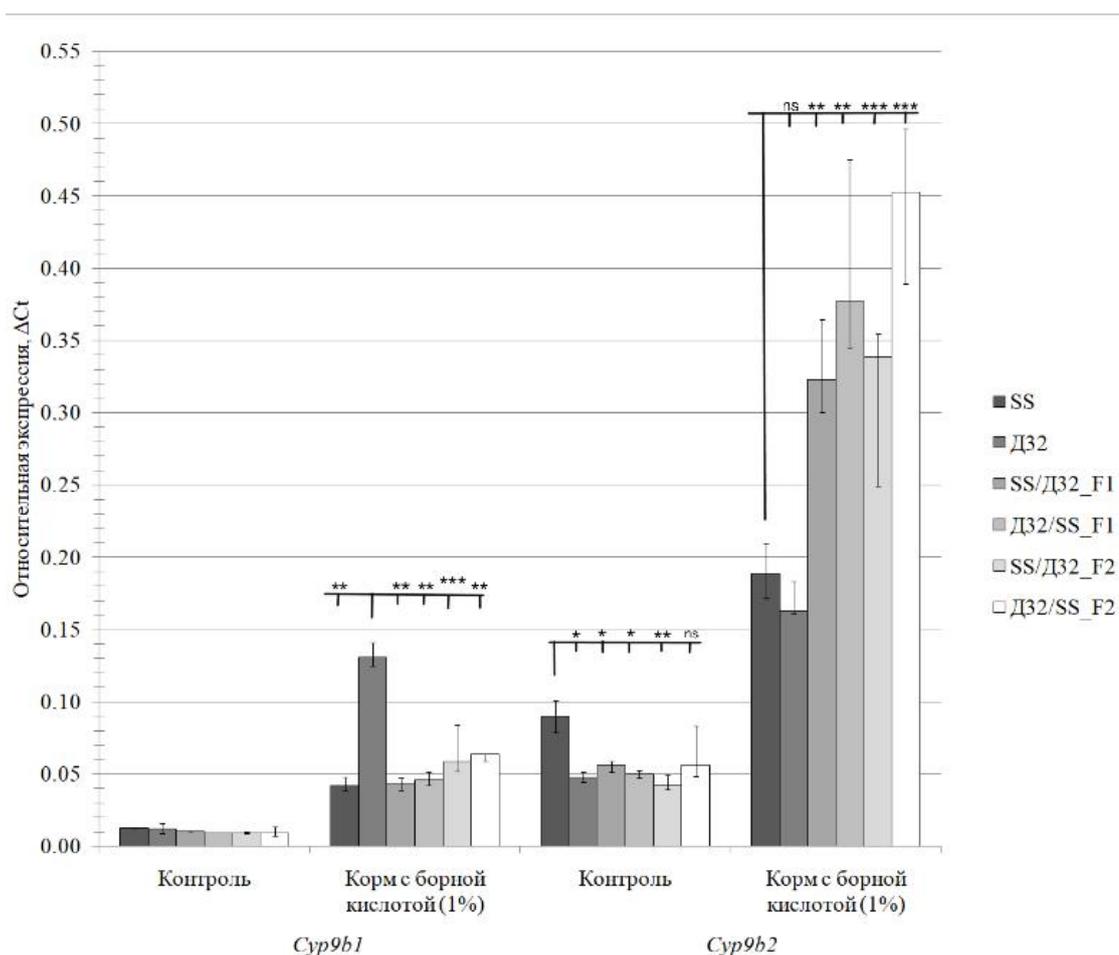


Рисунок 27. Уровень экспрессии генов *Cyp9b1* и *Cyp9b2* у самок линий SS, D32, а также их гибридов первого и второго поколений (\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  по критерию Манна–Уитни; ns, not significant – незначимое изменение).

Таким образом, линия SS отличается повышенной устойчивостью к борной кислоте, однако эта устойчивость связана не с мутацией в гене *Cyp9b1*, а с повышенным уровнем экспрессии гена *Cyp9b2*. Судя по эффекту гетерозиса, наблюдаемому у гибридов, устойчивость может носить полигенный характер и связана не столько с самими

цитохромами, сколько с механизмами их регуляции. Так как активация *Cyp9b2* у гибридов F<sub>1</sub> оказывается выше, чем у любого из родителей.

#### 4.2.2. Влияние окислительного и хронического теплового стрессов на активацию экспрессии ДКП-ретротранспозонов у линий SS и Canton-S

Для исследования влияния окислительного стресса на активацию ДКП-ретротранспозонов мы взяли в качестве окислителя аммония персульфат (АПС) ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>6</sub>(O<sub>2</sub>)). Ранее в нашей лаборатории было показано, что АПС индуцирует окислительный стресс (Makhnovskii et al., 2020). В связи с этим мы не исключали, что исследуемые нами ретротранспозоны также могут активироваться в ответ на воздействие АПС. Для подтверждения индукции окислительного стресса мы измерили экспрессию генов-маркеров окислительного стресса в ответ на 24-часовую инкубацию мух на среде с содержанием 0,1 М АПС: *Unpaired3 (upd3)* (активатор пути Jak-STAT) (Gold and Brückner, 2015), *Sid (Stressinduced DNase)* (активируется в ответ на бактериальный и окислительный стрессы) (Seong et al., 2014) и *hsp22 (heatshock protein 22)* (кодирует шаперон, локализованный в митохондриях и отвечающий за продолжительность жизни и устойчивость к стрессу) (Dabbaghizadeh, Tanguay, 2020). Мы выявили повышение экспрессии всех трёх генов у всех исследуемых линий. Таким образом, мы подтвердили наличие окислительного стресса в нашем эксперименте (Рис.28).

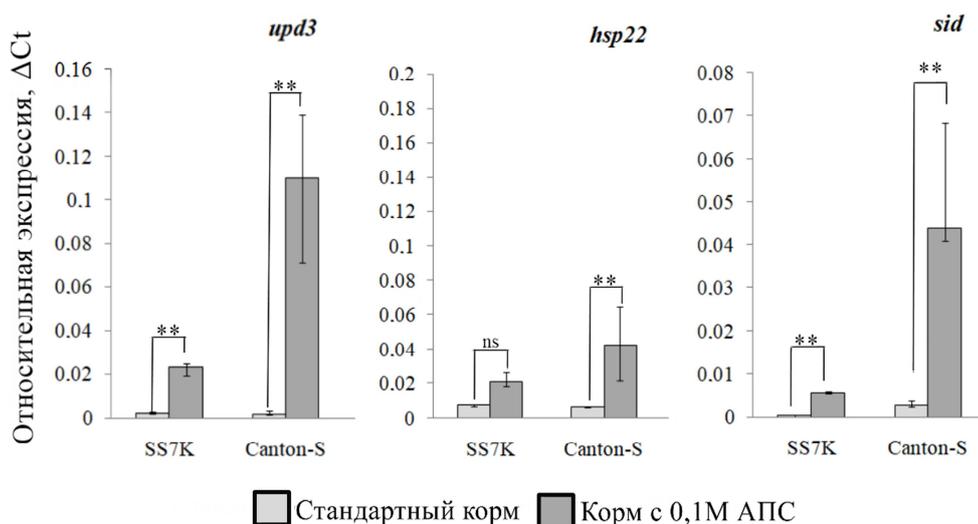


Рисунок 28. Относительная экспрессия генов, принимающих участие в ответе на окислительный стресс при индукции 0,1М персульфатом аммония. (\*-  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ ).

После этого мы измерили экспрессию четырёх ДКП-ретротранспозонов *copia*, *gypsy*, *Tirant*, *springer*. Данные МГЭ были выбраны для анализа по предварительным данным, полученным в нашей лаборатории. *Copia* относится к одноименной группе, представители которой нередко используются для изучения активации МГЭ в ответ на окислительный стресс, вызванный паракватом у *Arabidopsis thaliana*, а также на другие стрессы у *Oriza sativa* (Mhiri et al., 1997; Wessler, 1996). *Gypsy*, *Tirant* и *springer* относятся к группе *gypsy*, представители которой часто используются для оценки нарушения контроля транспозиции (Parhad et al., 2020; Perrat et al., 2013; Yu V. et al., 2018). Также большим преимуществом этих трёх ДКП-ретротранспозонов для изучения причин их активации является малокопийность, которая позволяет оценить влияние геномного окружения на отдельные копии. Мы выявили, что *copia*, *springer* и *Tirant* повышают свою экспрессию у обеих линий во время окислительного стресса. (Рис.29).

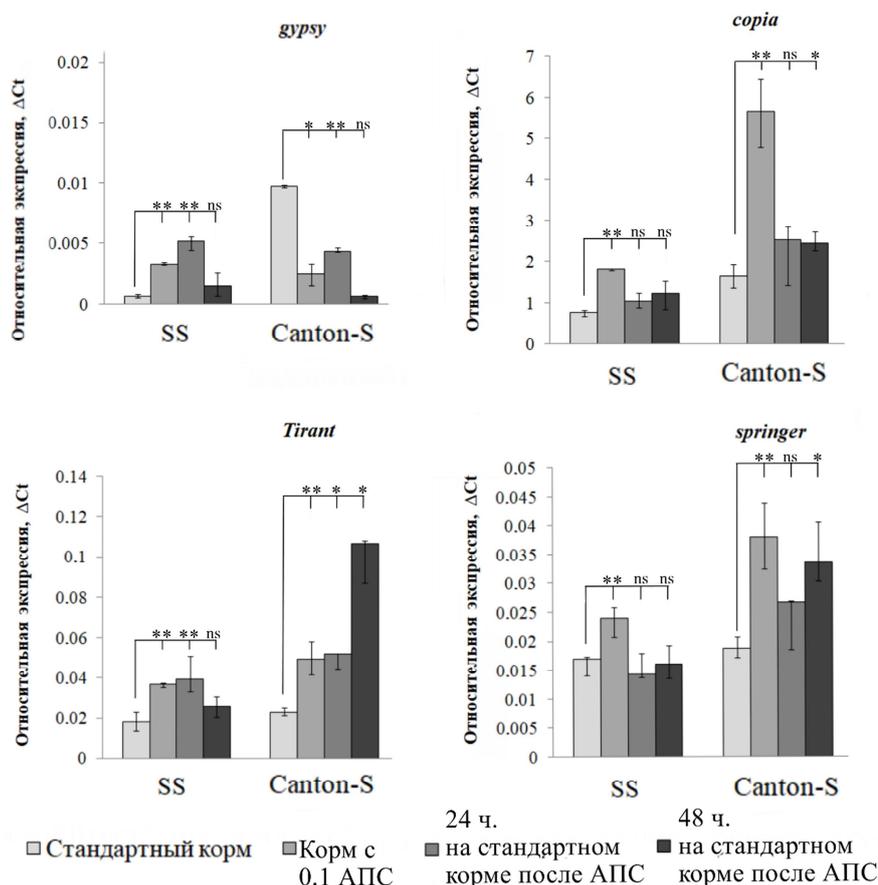


Рисунок 29. Относительная экспрессия ДКП-ретротранспозонов *copia*, *gypsy*, *springer* и *Tirant* в условиях окислительного стресса и при снятии его индукции (\*-  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ ; ns, notsignificant – статистически незначимое изменение).

Чтобы оценить динамику экспрессии МГЭ, мы использовали временные точки 24 и 48 часов после снятия стресса. Мы обнаружили, что уровень экспрессии *gypsy*, *coria* и *Tirant* сохраняется на высоком уровне в течение 24 часов после активации.

Мы измерили экспрессию генов-мвркеро окислительного стресса у линии Canton-S и обнаружили, что спустя 48 часов после пересадки мух на стандартных корм экспрессия этих генов снижается, таким образом, экспрессия ретротранспозонов продолжает поддерживаться на высоком уровне после снятия стресса (рис.30).

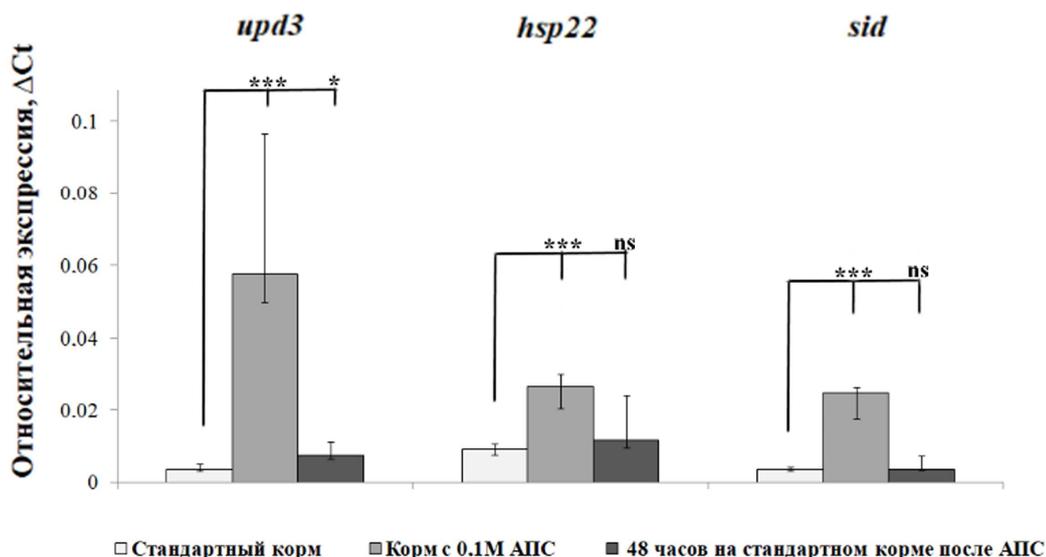


Рисунок 30. Относительная экспрессия генов, принимающих участие в ответе на окислительный стресс в условиях окислительного стресса и при снятии его индукции. (\*-  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ ).

В качестве второго вида стресса мы использовали хронический тепловой стресс. Так как данный вид стресса наименее изучен, в качестве маркера стресса мы использовали потерю плодовитости у самцов. После выращивания мух при повышенной температуре, через 7 дней после переноса имаго на новую среду, в пробирках не было личинок. Мы обнаружили, что на тепловой стресс реагирует только ретротранспозон *Tirant*. Для *springer* мы обнаружили снижение экспрессии у линии Canton-S. Причём изменение уровня экспрессии в любую сторону сохраняется в ближайшие 24 часа после переноса мух в нормальные температурные условия. Вероятно, что 24 часов недостаточно для снятия эффекта теплового стресса, однако мы не исключаем, что такой эффект может держаться в течение всей жизни мухи (Рис.31).

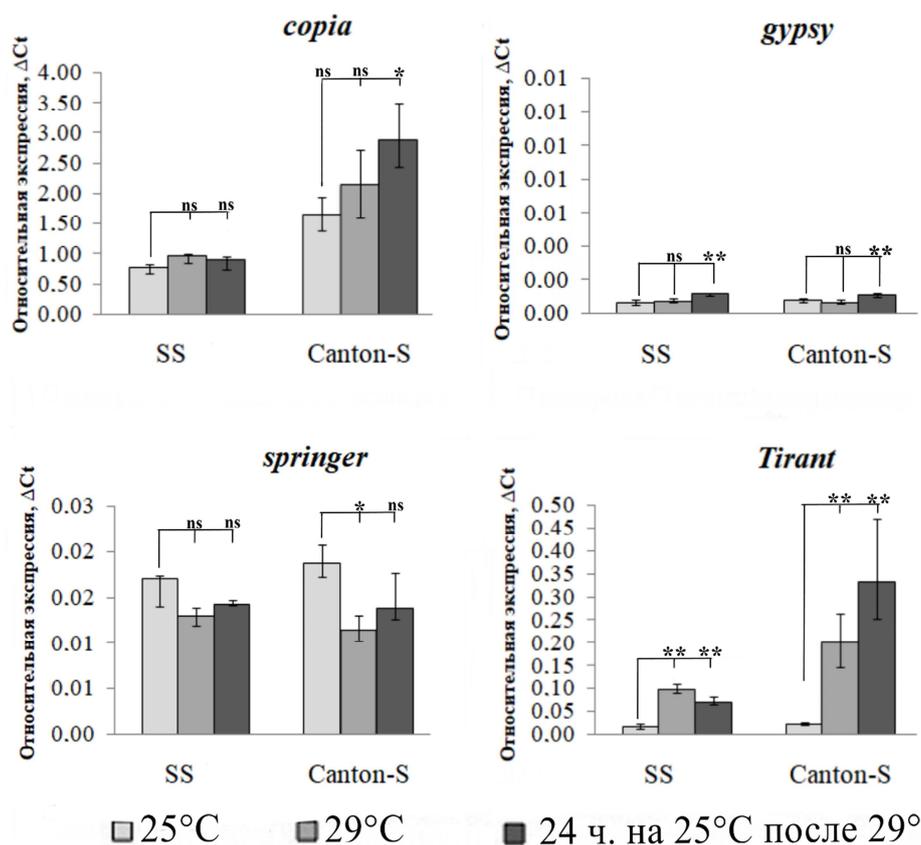


Рисунок 31. Относительная экспрессия ДКП-ретротранспозонов *copia*, *gypsy*, *springer* и *Tirant* в условиях хронического теплового стресса и при снятии его индукции (\*-  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ ; ns, not significant – статистически незначимое изменение)

Таким образом, ретротранспозоны, принадлежащие к одной группе, могут реагировать по-разному на различные виды стресса. Это может быть вызвано изменением работы системы рiРНК-интерференции во время стресса, влиянием геномного окружения и активацией ретротранспозонов за счёт коэкспрессии, так и наличием у МГЭ сайтов связывания транскрипционных факторов (ТФ).

#### 4.2.3. Влияние окислительного стресса на активацию кластеров рiРНК в линии Canton-S

Так как окислительный стресс влияет на экспрессию МГЭ наиболее сильно, мы последовательно оценили различные факторы, которые могут влиять на их активность во время стресса. Прежде всего мы предположили, что во время стресса может происходить снижение экспрессии кластеров рiРНК, и это приводит к дерепрессии МГЭ. Поэтому мы проследили динамику экспрессии наиболее известных кластеров при инкубации мух на

стандартном корме, корме с АПС и 48 часах восстановления после стрессового воздействия (Рис.32). В результате мы выявили, что экспрессия кластеров *flamenco* и *42AB* повышается при стрессе, а экспрессия *38C* и *20A* снижается. При этом нет взаимосвязи со способом регуляции, так как повышать либо понижать экспрессию способны как одноцепочечные (*flamenco*, *20A*), так и двуцепочечные кластеры (*42AB*, *38C*).

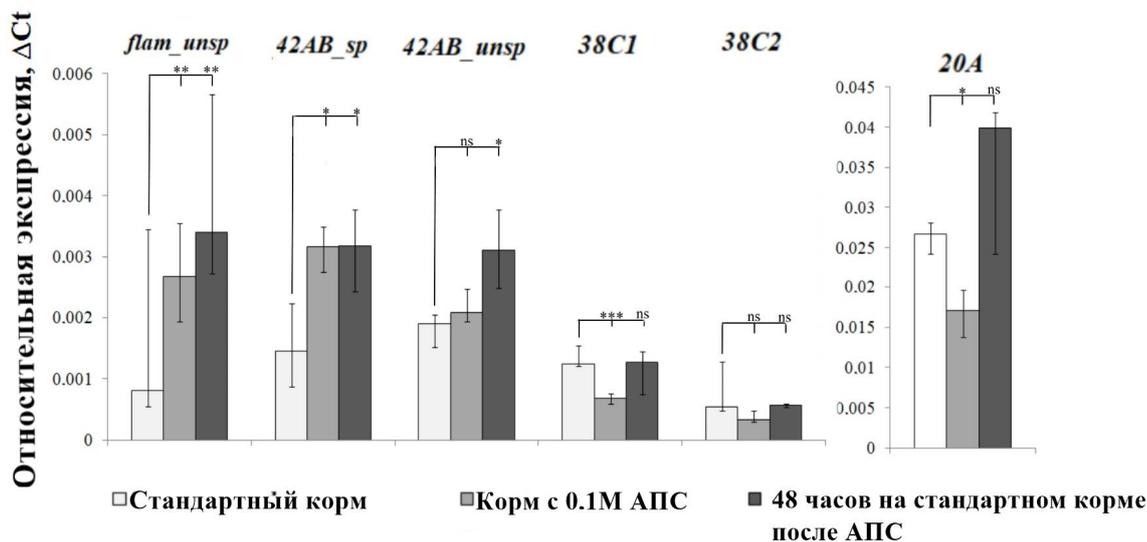


Рисунок 32. Динамика изменения экспрессии кластеров рiРНК во время и после снятия окислительного стресса (\*-  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$ , по критерию Манна-Уитни; ns, not significant – статистически незначимое изменение).

Снижение экспрессии отдельных кластеров ещё не гарантирует дерепрессию МГЭ, копии которых находятся в этих кластерах, и служит лишь отражением общего состояния экспрессии кластеров о время стресса. Более того, кластер *38C* (снижает экспрессию во время стресса) содержит последовательности *gypsy* и *coria*, кластер *42AB* (повышает экспрессию во время стресса) содержит последовательности *gypsy* и *Tirant*, однако экспрессия этих мобильных элементов при стрессе растёт. Более того, к 48 часам на стандартной среде после стресса экспрессия кластеров либо остаётся повышенной, либо приходит к базовому значению, в то время как ретротранспозоны продолжают высоко экспрессироваться даже после снятия стресса. Таким образом, во время стресса различные кластеры экспрессируются по-разному: может быть как снижение, так и повышение экспрессии. Это нельзя связать с активностью ретротранспозонов, потому что вне зависимости от повышения экспрессии кластеров, содержащих копии отдельных МГЭ, эти же ретротранспозоны не подавляются. Тем не менее, мы не исключаем, что изменение экспрессии и процессинга кластеров *flamenco* и *42AB* отражает состояние системы процессинга транскриптов кластеров лучше, чем *38C* и *20A*, так как в предыдущих

разделах мы наблюдали, что именно *flamenco* и *42AB* наиболее подвержены закономерному изменению экспрессии в ответ на эндогенные факторы.

#### **4.3. Влияние количества и положения отдельных копий в геноме на экспрессию ретротранспозонов в различных тканях и во время стресса**

Так как на экспрессию ретротранспозонов может влиять количество и положение отдельных копий в геноме, мы решили проверить, не влияют ли эти факторы на различия в экспрессии между линиями SS и Canton-S. Чтобы определить, насколько возможно влияние количества копий ретротранспозона, мы взяли ретротранспозоны, которые использовали для анализа влияния стрессовых воздействий и сравнили с результатами, полученными в разделе 4.2.2.

Для оценки влияния количества копий на различие экспрессии ретротранспозонов между линиями мы использовали метод количественной ПЦР. В данном случае в качестве референсных генов использовали *Tub*, и *BoYb*, так как в случае оценки количества копий этим методом важно только то, чтобы референсный ген присутствовал в двух копиях. Так как в данном исследовании экспрессию ретротранспозонов проводили на самках, подсчёт также осуществили с использованием их ДНК. Стоит отметить, что в силу отсутствия значимого давления отбора на отдельные копии МГЭ, используемые праймеры могут подходить лишь к ограниченному количеству копий, поэтому мы учитывали только те копии, экспрессию которых имели возможность зафиксировать с помощью количественной ПЦР, так как именно к этим копиям подходят праймеры.

Мы обнаружили, что по количеству инсерций малокопийных ретротранспозонов линии не имеют значительных различий (Табл. 4). У *scopia* наиболее высокая копийность и экспрессия наблюдается в Canton-S, что закономерно. Однако большее количество копий не означает пропорционально большую экспрессию. Так экспрессия *scopia* в линии Canton-S вдвое больше, чем в линии SS, однако у линии Canton-S всего на 11 инсерций больше. Следующий важный момент касается экспрессии копий в условиях стресса. Как было описано выше для окислительного и хронического теплового стрессов, копии одного и того же МГЭ в разных линиях при стрессе могут вести себя по-разному. Например, при окислительном стрессе экспрессия *springer* наиболее активно индуцируется у линии Canton-S, по сравнению с SS. Поэтому изменение экспрессии ретротранспозона при изменении средовых условий происходит непропорционально количеству его копий.

Это наблюдение показывает, что попытка нормирования экспрессии на количество копий только искажает получаемые результаты. Прежде всего, это происходит по причине

возникающих в ПЦР ошибок, не позволяющих получить число копий в точности до 1. Вторая, более, значимая причина, – это нелинейная зависимость экспрессии от числа копий ретротранспозонов, а также их разная экспрессия при стрессе. Также метод нормирования на количество копий абсолютно неприменим для ретротранспозонов с очень низкой копийностью, таким, как *Tirant*.

Табл. 4. Подсчет копий ретротранспозонов методом количественной ПЦР.

	<i>gypsy</i>	<i>copia</i>	<i>Tirant</i>	<i>springer</i>
SS	3	44	5	6
Canton-S	3	55	4	6

Таким образом, экспрессия МГЭ не линейно зависит от копийности. В связи с этим, мы рассмотрели следующий фактор – положение отдельных копий в геноме дрозофилы. Для осуществления этой задачи мы воспользовались результатами нанопорового секвенирования генома линии SS, которое было осуществлено в нашей лаборатории. Также мы использовали секвенированный тем же методом геном Canton-S из базы данных NCBI. Сначала мы провели поиск последовательностей исследуемых ретротранспозонов в базе данных FlyBase с помощью функции blast. Для анализа мы брали результаты выравнивания, которые на 99% совпадали с искомыми последовательностями. Большинство взятых в анализ точек содержало полноразмерные либо максимально протяженные участки ретротранспозонов и, обязательно, сайт амплификации. Таким образом, мы отобрали инсерции ретротранспозонов, экспрессию которых потенциально могли амплифицировать с помощью наших праймеров. Затем по базе данных FlyBase мы проверили, повышают ли эти гены, в которых находятся инсерции ретротранспозонов, экспрессию в ответ на исследуемые стрессы, и работают ли эти гены в исследуемых тканях. Так как *blood* и *springer* использованы нами для анализа тканеспецифичной экспрессии и изучения реакции на стресс соответственно, для них смотрели только те параметры, которые необходимы были для оценки результатов соответствующих экспериментов. В большинстве случаев эти ретротранспозоны в референсном геноме находились в межгенном пространстве, поэтому близлежащие гены не могли повлиять на их экспрессию. Только 4 инсерции находились после генов, у 3-х из этих инсерций направление транскрипции коллинеарно с близлежащими генами, однако эти гены не обладают высокой экспрессией в исследуемых тканях и не отвечают на используемые

стрессовые состояния, поэтому не могут влиять на экспрессию этих копий ретротранспозонов.

После этого мы оценили наличие в геномах SS и Canton-S копий ретротранспозонов, которые находятся в генах, представляющих для нас интерес, так как экспрессируются в исследуемых тканях либо повышают экспрессию при стрессе (Приложение 2). Почти все проверенные участки содержат делеции в несколько тысяч нуклеотидов наряду с уникально картированными прочтениями. Лишь 6 участков, содержащих последовательности ретротранспозонов в референсном геноме, полностью отсутствуют у линии Canton-S. Это наблюдение говорит о том, что данные инсерции ретротранспозонов в большинстве случаев уже не подвергаются отбору, и любая лабораторная линия обладает полиморфизмом по большинству инсерций МГЭ. Причем в генах остаются, как правило, инсерции, которые находятся в интронах, а все остальные инсерции, вероятно, элиминируются отбором, поэтому мы не видим их в референсном геноме и геномах лабораторных линий.

Среди всех генов, которые экспрессируются во время стресса на среднем уровне (согласно анализу на микрочипах в FlyBase.org) либо выше среднего, только одна инсерция *coria* направлена коллинеарно транскрипции гена, в котором она находится. Среди инсерций в генах, которые реагируют на тепловой стресс, ни одна инсерция *coria* не находится коллинеарно транскрипции гена. Мы также нашли 2 инсерции *gypsy*, которые ориентированы коллинеарно направлению транскрипции генов, реагирующих на оба стресса. Однако ни одной инсерции *Tirant* и *springer*, удовлетворяющих данным условиям, найдено не было. Это говорит о том, что активация транскрипции ретротранспозонов во время стресса за счёт активации участка генома, в котором он находится, – это частный случай, нежели правило, так как большинство инсерций располагается в межгенном пространстве либо в генах с низкой экспрессией.

Тот же подход мы использовали, чтобы сравнить результаты анализа экспрессии ретротранспозонов по тканям и экспрессию генов, в которых они находятся. Для *coria* мы нашли только одну инсерцию, которая находится в гене, экспрессия которого преобладает в тканях корпуса (*Snap25*), в случае *roo* мы нашли три таких инсерции (в генах *CG43867*, *dnc* и *Pka-C3*). Однако мы наблюдаем, что часть инсерций находится в генах, экспрессия которых в яичниках не меньше, чем в соматических тканях. Мы не нашли ни одной инсерцией *gypsy* и *blood*, экспрессию которой можно было бы объяснить в тканях яичников благодаря положению в геноме. Точно такой же результат мы получили и для *Tirant*, который экспрессируется преимущественно в яичниках, однако его инсерции

находятся также в генах, которые высоко экспрессируются в соматических тканях. Для *springer* анализ потканевой экспрессии генов, в которых находятся его инсерции не проводили, так как изначально не проводили измерение экспрессии данного ретротранспозона с помощью количественной ПЦР по тканям.

Таким образом, анализ положения инсерций МГЭ, характерных для разных линий, не позволяет выявить корреляцию уровня экспрессии ретротранспозона и положения его инсерций в геноме. Так как уникальные для линий инсерции, вероятно, наиболее транскрипционно активны, мы решили проверить их наличие в геноме наших линий. Для этого мы проанализировали результаты секвенирования Canton-S и SS с помощью программы TLDR на наличие искомым ретротранспозонов среди последовательностей инсерций и проверили в UGENE комплементарность используемых праймеров. Разница в количестве копий, найденных в используемых линиях связана исключительно с разницей в покрытии (Приложение 3, Рис. 33).



Рисунок 33. Экспрессия генов, содержащих инсерции ретротранспозонов, во время стресса, а также распределение их экспрессии по тканям согласно базе данных FlyBase.

В случае уникальных для линий инсерций мы нашли те же закономерности, что и для неуникальных: значительная часть этих инсерций находится в межгенном пространстве и все инсерции гетерозиготны.

Мы проверили влияние геномного окружения на экспрессию двух инсерций *Tirant* в генах *cactus* и *Nuak* при хроническом тепловом стрессе. Данный вид стресса был выбран в связи с тем, что *Tirant* в таких условиях реагирует сильнее, и изменение экспрессии отдельных копий можно будет проследить легче, чем при слабой активации при окислительном стрессе. Выбор инсерций связан с тем, что данный ретротранспозон малокопиен, его копии находятся в двух генах, характеризующихся разным уровнем экспрессии во время стресса, копии этого ретротранспозона уникальны для линии SS,

которая содержится и была секвенирована в нашей лаборатории, а значит, результат геномного анализа для этой линии наибольшим образом сопоставим с полиморфизмом по инсерциям ретротранспозонов в этой линии, в отличие от Canton-S, сиквенс для которой мы брали из базы данных (SRR11460803). Нас интересовали наиболее активные копии, поэтому мы обратились к набору инсерций, которые были уникальны для этой линии, а следовательно, они более новые по отношению к копиям, которые характерны для обеих линий. Экспрессию отдельных копий *Tirant* измеряли с помощью аллель-специфичных праймеров.

При хроническом тепловом стрессе мы наблюдали общее повышение экспрессии *Tirant*, а также повышение экспрессии отдельных копий. Однако мы наблюдали при этом повышение экспрессии только *Nuak*. Так как в базе данных представлены данные только для теплового шока, они могут не совпадать с результатами нашего эксперимента для этих генов (Рис.34).

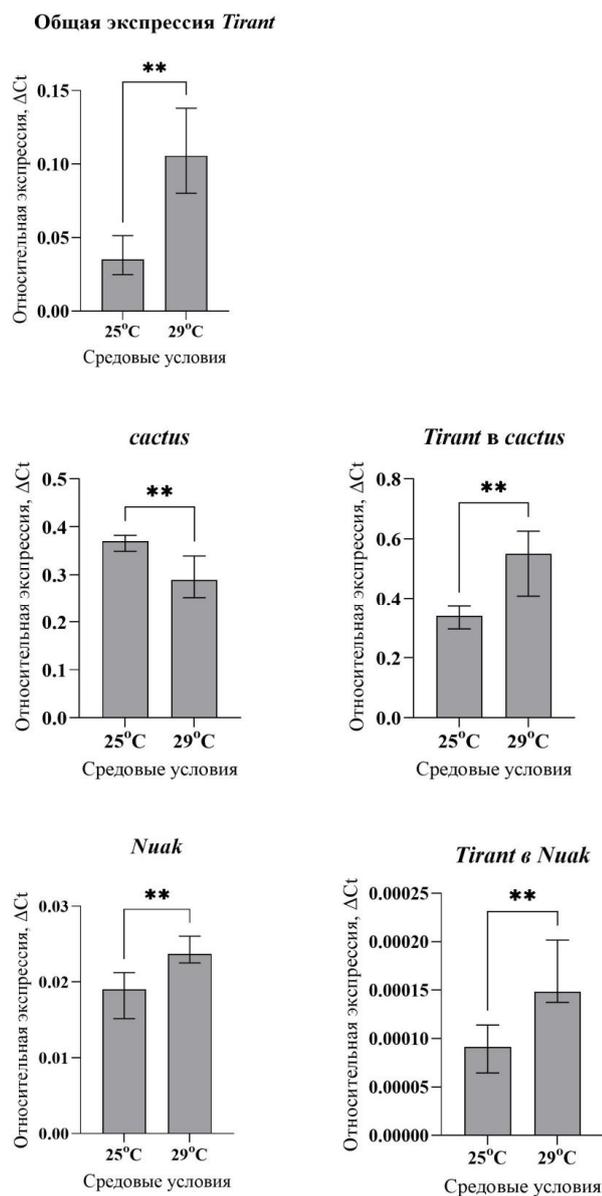


Рисунок 34. Экспрессия *Tirant* и генов, в которых находятся его инсерции, при нормальной температуре и хроническом тепловом стрессе (\*-  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$  по критерию Манна-Уитни).

Также мы наблюдали, что помимо изменения экспрессии отдельных копий *Tirant* независимо от изменения направления экспрессии генов, разница между двумя температурными режимами для общей экспрессии не эквивалентна разнице для отдельных копий. Таким образом, экспрессия мобильного элемента регулируется независимо от участка генома, в котором он находится.

Проанализировав положение отдельных копий ретротранспозонов в геноме, мы показали, что инсерций ретротранспозонов, которые могут быть потенциально подвержены влиянию геномного окружения, крайне мало. Более того, с помощью

количественной ПЦР мы показали, что экспрессия отдельных копий может не зависеть от направления экспрессии гена, в интроне которого она находится, и изменение экспрессии отдельных копий не эквивалентно изменению общей экспрессии ретротранспозона. Это может быть связано как с регуляцией экспрессии отдельных копий ретротранспозона, так и с тем, что частота встречаемости отдельных инсерций в лабораторной популяции может быть различной, и количество транскриптов в каждом образце будет разным по причине разного количества матриц для транскрипции.

#### 4.4 Анализ регуляторных областей ДКП-ретротранспозонов

Ранее другими исследователями было показано наличие сайтов связывания ТФ у ретротранспозонов и связывание с ними ТФ во время стресса. Предполагается, что таким образом ретротранспозоны могут регулировать экспрессию находящихся рядом генов ответа на стрессовое воздействие (Moschetti et al., 2020).

Мы провели анализ регуляторных последовательностей ретротранспозонов с помощью программы LASAGNA на наличие сайтов связывания ТФ. После этого мы использовали найденные уникальные для исследуемых линий инсерции ретротранспозонов для оценки консервативности найденных программой сайтов связывания ТФ (Приложение 4).

В результате для всех исследуемых ретротранспозонов мы нашли такие сайты. И, что примечательно, ТФ, которые экспрессируются в яичниках также ответственны за устойчивость к определённым стрессовым воздействиям. Исключение составил ретротранспозон *coria*, у которого регуляторные области бедны сайтами связывания ТФ. (Табл.5, Рис. 35).

Найденные нами сайты связывания ТФ для *Tirant* и *gypsy* плохо поддаются верификации нашим подходом, так как эти ретротранспозоны малокопийные и поэтому уникальных для линий, а, следовательно, наиболее новых инсерций этих ретротранспозонов в исследуемых линиях крайне мало. В связи с этим невозможно дать однозначный ответ, почему у *Tirant* присутствуют сайты связывания соматических ТФ, но при этом экспрессия этого ретротранспозона в любых тканях, кроме яичников, незначительна.

Таблица 5. Консервативные сайты связывания ТФ у уникальных копий ретротранспозонов

Участок ретротранспозона	Ретротранспозон	Транскрипционный фактор	Сайт связывания
Сайты связывания ТФ, которые индуцируются стрессом			
ДКП	<i>blood</i>	Cf2_II(MA0015.1)	ATATATGCAC ATATATATAT
		dl_1(MA0022.1)	TGGTTTATTACA
		ovo(MA0126.1)	AGAAACGGT
		HSF(M00163)	CGAAGAGATAAGAAG
		HSF(M00166)	CTACTCGAAGAGATA
	<i>copia</i>	HSF(M00164)	AGAGTGGTATTCTCT
	<i>gypsy</i>	Bcd(T00063)	ACCTAATCTCCA
	<i>roo</i>	dl_1(MA0022.1)	TGGGATTTTACA
		h(MA0449.1)	GTCACTTGAG
		z(MA0255.1)	ATGAGTCAGT
		C/EBP(T00106)	TTTTTACAAAACT
		HSF(M00164)	CGAGTAAAGTCTTCT
	<i>springer</i>	Cad(T00079)	GGCCAAATGC
	<i>Tirant</i>	Cad(T00079)	AGCATAATGA
		Cad(T00079)	GGCCGAATG
		Deaf1(MA0185.1)	AGCATTCGGCCGGAA
		h(MA0449.1)	GCCACATGCC
	Участок между ДКП и gag	<i>blood</i>	bcd(MA0212.1)
<i>copia</i>		Zeste(M00283)	GAATTTGAGTGAAAA
<i>roo</i>		Cf2_II(MA0015.1)	ATACACGTAC
		Cf2_II(MA0015.1)	ATATATATAT
		Cf2_II(MA0015.1)	GTGTATATGC
		HSF(M00164)	AAACAAGAATTTTCT
		HSF(M00166)	CTTAAAGAAGAGAAG
<i>springer</i>		cad(MA0216.1)	CTTATTG
		ovo(MA0126.1)	TGTTACTGT
		dl(M00120)	TAAGAAAATCG
		dl(M00043)	CGGCATTTCCA
<i>Tirant</i>		Cad(T00079)	GTCATAATTT
		dl(M00043)	CGGTATGTCCA
		CF2-II(M00012)	CTATATACA
		CF2-II(M00012)	ATATATGTG
	Cad(T00079)	GТАСТАААГА	
	CF2-II(M00012)	CTATATGCA	

		Сайты связывания ТФ, которые не индуцируются стрессом	
ДКП	<i>blood</i>	slp1(MA0458.1)	GTGTTTTTCCTT
		sna(MA0086.1)	CAAGTG
		vvl(MA0254.1)	TATGCA
	<i>copia</i>	br_Z1(MA0010.1)	TAAACTTGACT
	<i>gypsy</i>	brk(MA0213.1)	GTGGCGAT
		caup(MA0217.1)	TAACA
		ct(MA0218.1)	TTGAAC
	<i>roo</i>	br_Z1(MA0010.1)	GACTATTT
		onecut(MA0235.1)	CTGATTT
		tup(MA0248.1)	CTAAGGG
	<i>Titant</i>	sd(MA0243.1)	GACATTCCGGCC
		pan(MA0237.1)	TTTTGAAC
		mirr(MA0233.1)	TGACA
		mirr(MA0233.1)	TGACA
		ct(MA0218.1)	TTGAAC
		caup(MA0217.1)	TGACA
		caup(MA0217.1)	TGACA
Abd-A(T01992)		CATTATGCTTACAAT TAAGA	
Участок между ДКП и gag	<i>blood</i>	run::Bgb(MA0242.1)	AAGCCGCAA
		Optix(MA0199.1)	TGATA
	<i>copia</i>	Sd(T02030)	TTGTGAAATAGCTT
		br_Z1(MA0010.1)	CTAATAACAATTA
		br_Z4(MA0013.1)	TTGTGAATTA
	<i>roo</i>	caup(MA0217.1)	TAACA
		CG4328(MA0182.1)	CTTATGG
		Hmx(MA0192.1)	TAAATCG
		NK7.1(MA0196.1)	CTAATAG
		pan(MA0237.1)	CTTTGGTA
		slp1(MA0458.1)	CTGTTTATCCA
		Tll(T00789)	AGGAAGTCAAATTC
	<i>Tirant</i>	Adf-1(M00171)	GCGCTGACGTGGAA TC
		vvl(MA0254.1)	TATGCA
		CG4328(MA0182.1)	CCTATTA
		br_Z1(MA0010.1)	CTAGTAAACAAGAA
		Su(H)(M00234)	ACCGTGGTAAACA
Su(H)(MA0085.1)		CCGTGGTAAACAAA CA	
tll(MA0459.1)		TAAAGCCAAA	

		tII(MA0459.1)	AGAAGTCGAC
--	--	---------------	------------



Рисунок 35. Сайты связывания стресс-индуцируемых транскрипционных факторов в 5'НТО ДКП-ретротранспозонов.

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ

### 5.1. Экспрессия ретротранспозонов в линии с фенотипом flamenco

Мы не нашли у линии SS каких-либо мутаций, которые можно было бы связать с фенотипом flamenco, однако эта линия оказалась устойчива к действию борной кислоты – распространённому окислителю и нейротоксину. Тем не менее, эта устойчивость не повлияла на индукцию окислительного стресса персульфатом аммония, а также не вызвала отличий экспрессии ретротранспозонов *copia*, *gypsy*, *Tirant* и *springer* по сравнению с линией дикого типа Canton-S. Потканевый анализ также не выявил серьёзных различий, кроме экспрессии теломерных ретротранспозонов в соматических тканях, также мы наблюдали, что для разных ретротранспозонов характерны свои паттерны экспрессии, и большинство ретротранспозонов экспрессируется в соматических тканях выше, чем в яичниках имаго либо в ЦНС личинки. По экспрессии кластеров линия SS обнаруживает нарушения процессинга транскриптов обоих типов кластеров, что может быть связано с повышенной экспрессией теломерных ретротранспозонов у этой линии. Примечательно, что кластеры, как правило, экспрессируются в яичниках имаго и ЦНС личинки, что отрицательно коррелирует с экспрессией ретротранспозонов. Однако это не объясняет причины экспрессии ретротранспозонов в других тканях.

### 5.2. Влияние отсутствия функции генов *rhino* и *piwi* на экспрессию ретротранспозонов

Мы провели нокдаун гена *rhino*, а также получили гибриды с компаундом мутаций гена *piwi*. В обоих случаях мы наблюдали повышение экспрессии отдельных ретротранспозонов, причём в случае снижения экспрессии *rhino*, изменение коснулось большего спектра ретротранспозонов, нежели в случае с *piwi*. Для этих мутаций был характерен уникальный набор ретротранспозонов, изменивший свою экспрессию в соматических тканях, за исключением *gypsy*, который повышал экспрессию в случае снижения экспрессии *rhino* в тканях корпуса, а в случае *piwi* – в яичниках, корпусе и голове. В случае *copia* и *TART-A* мы наблюдаем повышение экспрессии при нокдауне *rhino*, однако у гибридов с компаундом мутаций *piwi* их экспрессия снижается. Такое вполне возможно при анализе экспрессии ретротранспозонов на фоне разных мутаций, что ещё раз доказывает неоднозначность в регуляции экспрессии разных ретротранспозонов (Perrat et al., 2013). Помимо этого мы наблюдали изменение экспрессии *blood* и *roo* в зависимости от направления скрещивания, что также встречается в случае МГЭ *Helena* при межвидовом скрещивании дрозофил (Romero-Soriano and Guerreiro, 2016). Примечательно, что *gypsy*, который регулируется в основном PIWI-зависимой piRNA-интерференцией (Handler et al., 2013), повышает экспрессию как при снижении экспрессии *rhino*, так и в случае компаунда мутаций *piwi*. Однако, учитывая, что PIWI способен использовать piRNA из цикла «пинг-понг», то, что в случае мутации *rhino*, мы также наблюдаем эффект на соматических тканях, может быть закономерным следствием слабого эффекта мутации *rhino* на экспрессию *gypsy* в корпусе.

Экспрессия кластеров значительно изменяется только при нокдауне *rhino*, что согласуется с его функцией. Однако мутации *piwi* влияют на экспрессию кластера *42AB* в соматических тканях. Кластеры piRNA, как и супрессированные копии ретротранспозонов содержат метки H3K9me3, более того, согласно современной теории (ссылка), кластеры появляются благодаря последовательным инсерциям ретротранспозонов в участке генома. Возможно, что метилирование кластеров также зависит от *piwi*. Однако мы не исключаем вариант, что эффект нарушения процессинга кластера *42AB* при компаунде мутаций *piwi* возникает из-за невозможности белком PIWI использовать часть транскриптов этого кластера. Так же в случае нокдауна *rhino*, мы видим слабый эффект от мутации *piwi* на сплайсинг транскриптов *flamenco*, но на экспрессию piRNA *11620* это не влияет. Возможно, что кластер *flamenco* слабо регулируется *rhino* благодаря небольшому количеству ретротранспозонов, встроенных в кластер по направлению его транскрипции.

Стоит отметить, что у личинок в ЦНС экспрессируется гораздо больше генов-участников piRNA-интерференции, чем у имаго в голове. В совокупности с результатами,

полученными (Wakisaka et al., 2019) и свидетельствующими о важности системы piRNA интерференции в ЦНС личинок дрозофилы, наши наблюдения позволяют сделать предположение, что система piRNA-интерференции устанавливает паттерн экспрессии ретротранспозонов во время эмбриогенеза, и в случае если метилирования инсерций ретротранспозонов не произошло во время эмбриогенеза, система siRNA-интерференции уже не способна полностью компенсировать её отсутствие у имаго даже несмотря на то, что piRNA-кластеры могут играть роль источников siRNA в голове у дрозофилы (Chung et al., 2008; Perrat et al., 2013). Это предположение объясняет, почему в норме в голове у дрозофилы осуществляется экспрессия не всех генов-участников piRNA-интерференции, но мы наблюдаем эффекты в этих тканях от мутаций генов *piwi* и *rhino*.

### 5.3 Влияние копийности и положения ретротранспозонов в геноме на их экспрессию

На примере четырёх ретротранспозонов, *copia*, *gypsy*, *Tirant* и *springer*, мы выявили, что зависимость экспрессии от копийности существует, однако, эта зависимость хорошо работает, если разница между линиями в количестве копий рассматриваемого ретротранспозона различается хотя бы вдвое. В случае, когда МГЭ малокопиен, возможны сильные искажения в ПЦР. Более того, у разных линий при общей индукции ретротранспозонов во время стресса, степень изменения экспрессии отдельных ретротранспозонов не коррелирует с разницей между двумя линиями в копийности ретротранспозона. Разницу экспрессии в отдельных тканях в рамках одной линии также не удаётся обосновать их копийностью, так как количество копий в разных тканях у одной и той же дрозофилы в норме не может различаться вдвое.

В связи с этим мы провели нанопоровое секвенирование и проанализировали положение отдельных копий в геноме. Так как мы выбирали только копии, которые амплифицировали в наших экспериментах, и предположили, что можно использовать данный метод для нормирования копийности ретротранспозонов на их число, как более точный подход к учёту копийности в экспериментах. Однако, как оказалось, не уникальные и уникальные для линий инсерции ретротранспозонов обладают высоким уровнем полиморфизма, который может скачкообразно меняться за счёт дрейфа, и, следовательно, невозможно получить точное количество копий ретротранспозонов, на которое следовало бы нормировать результаты. В связи с этим метод ПЦР оказывается более целесообразным подходом, так как учитывает именно среднее количество копий в

линии и может быть применён как дополнительный анализ сравнения линий или популяций дрозофил, но не как способ нормирования.

В случае же выявления новых инсерций ретротранспозонов наиболее продуктивным оказывается метод нанопорового секвенирования по сравнению с такими подходами, как вычитающая гибридизация или транспозонный дисплей. На примере инсерции *Tirant* в гене *cactus* в линиях SS и MS, которая содержит огомозиготную инсерцию, можно наблюдать, что вычитающая гибридизация будет давать результат, позволяющий утверждать, что это новая инсерция, в то время как на самом деле она присутствует в линии SS, но настолько редкая, что вычитая геном SS из MS, мы получаем недостаток суммы инсерций *Tirant* в *cactus* в линии SS, что приводит к искажению результатов. Положение копий как широко распространённых, так и уникальных инсерций ретротранспозонов в геноме не даёт основания сказать, что повышение экспрессии ретротранспозонов во время стресса является следствием геномного окружения ретротранспозонов, так как большинство генов, содержащих инсерции, не реагируют на стрессовое воздействие. Также положение отдельных копий ретротранспозонов в геноме не объясняет, почему они, как правило, наиболее высоко экспрессируются в соматических тканях.

#### **5.4 Изменение экспрессии ретротранспозонов в ответ на стресс и паттерн экспрессии в тканях определяется наличием сайтов связывания ТФ в регуляторных областях ретротранспозонов и функциональностью системы рiРНК-интерференции**

Мы увидели, что некоторые из ретротранспозонов, отвечающих на стрессовое воздействие повышением экспрессии, обладают сайтами связывания ТФ, что также отражено в литературе с помощью иных методов (Moschetti et al., 2020). Важно отметить, что доместигированные ретротранспозоны действительно нередко становятся источниками микро-РНК либо регуляторных элементов, контролирующих экспрессию генов хозяина во время развития, в частности, ретротранспозоны помогают правильному протеканию нейрогенеза (Mustafin and Khusnutdinova, 2020). Учитывая, что ТФ ответа на стресс являются единственным связующим звеном между эмбриогенезом и механизмом ответа на стресс, объясняющим, почему на разные химические агенты в физические факторы отвечает разный спектр ретротранспозонов, организация регуляторных областей ретротранспозонов является наиболее логичным объяснением их поведения во время стресса и во время эмбриогенеза.

Таким образом, именно регуляция за счёт ТФ представляется нам наиболее логичным объяснением поведения ретротранспозонов при стрессе и их экспрессии в соматических тканях. В случае окислительного стресса основным фактором активации ретротранспозонов вероятно является не сам стресс, а запускаемый им процесс регенерации тканей, что согласуется с ролью *piwi* в делении стволовых клеток кишечника дрозофилы в ответ на стрессовое воздействие и тем фактом, что мы и другие исследователи наблюдаем повышенную экспрессию ретротранспозонов спустя 24-48 часов после стресса (Carrucci et al., 2019; Sousa-Victor et al., 2017). Также влияет и изменение экспрессии и процессинга транскриптов кластеров piRNA. Согласно нашим результатам большинство сайтов связывания в регуляторных областях ретротранспозонов предназначено для связывания ТФ в яичниках имаго либо в ЦНС личинки, в этих же тканях кластеры piRNA экспрессируются наиболее высоко, и в этих же тканях происходит наибольшее подавление ДКП-ретротранспозонов. Таким образом ретротранспозоны – это полноценные симбионты эукариотического генома, экспансия которых сдерживается врождённым иммунитетом эукариотической клетки – системой piRNA-интерференции как во время эмбрионального развития, так и в процессе регенерации.

## 6. 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 piRNA, 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 piRNA 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 piRNA-интерференции и siRNA-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 в 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.

## 7. 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.

## 7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adashev, V.E., Kotov, A.A., Bazylev, S.S., Shatskikh, A.S., Aravin, A.A., Olenina, L.V., 2021. Stellate Genes and the piRNA Pathway in Speciation and Reproductive Isolation of *Drosophila melanogaster*. *Front. Genet.* 11, 610665.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.610665>
2. Akkouche, A., Grentzinger, T., Fablet, M., Armenise, C., Bulet, N., Braman, V., Chambeyron, S., Vieira, C., 2013. Maternally deposited germline piRNAs silence the *tirant* retrotransposon in somatic cells. *EMBO Reports* 14, 458–464.  
<https://doi.org/10.1038/embor.2013.38>
3. Akulenko, N., Ryazansky, S., Morgunova, V., Komarov, P.A., Olovnikov, I., Vaury, C., Jensen, S., Kalmykova, A., 2018. Transcriptional and chromatin changes accompanying de novo formation of transgenic piRNA clusters. *RNA* 24, 574–584.  
<https://doi.org/10.1261/rna.062851.117>
4. Andersen, P.R., Tirian, L., Vunjak, M., Brennecke, J., 2017. A heterochromatin-dependent transcription machinery drives piRNA expression. *Nature* 549, 54–59.  
<https://doi.org/10.1038/nature23482>
5. Andreev, V.I., Yu, C., Wang, J., Schnabl, J., Tirian, L., Gehre, M., Handler, D., Duchek, P., Novatchkova, M., Baumgartner, L., Meixner, K., Sienski, G., Patel, D.J., Brennecke, J., 2022. Panoramix SUMOylation on chromatin connects the piRNA pathway to the cellular heterochromatin machinery. *Nat Struct Mol Biol* 29, 130–142.  
<https://doi.org/10.1038/s41594-022-00721-x>
6. Anne, J., 2010. Targeting and Anchoring Tudor in the Pole Plasm of the *Drosophila* Oocyte. *PLoS ONE* 5, e14362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014362>
7. Aravin, A.A., Hannon, G.J., Brennecke, J., 2007. The Piwi-piRNA Pathway Provides an Adaptive Defense in the Transposon Arms Race. *Science* 318, 761–764.  
<https://doi.org/10.1126/science.1146484>
8. Arnault, C., Heizmann, A., Loevenbruck, C., Biéumont, C., 1991. Environmental stresses and mobilization of transposable elements in inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 248, 51–60.  
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90087-5](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90087-5)
9. Assumpção, C.B., Calcagno, D.Q., Araújo, T.M.T., Batista Dos Santos, S.E., Ribeiro Dos Santos, Â.K.C., Riggins, G.J., Burbano, R.R., Assumpção, P.P., 2015. The role of piRNA and its potential clinical implications in cancer. *Epigenomics* 7, 975–984.  
<https://doi.org/10.2217/epi.15.37>
10. Baumgartner, L., Handler, D., Platzer, S.W., Yu, C., Duchek, P., Brennecke, J., 2022. The *Drosophila* ZAD zinc finger protein Kipferl guides Rhino to piRNA clusters. *eLife* 11, e80067. <https://doi.org/10.7554/eLife.80067>

11. Belicard, T., Jareosettasin, P., Sarkies, P., 2018. The piRNA pathway responds to environmental signals to establish intergenerational adaptation to stress. *BMC Biol* 16, 103. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0571-y>
12. Bodelón, A., Fablet, M., Siqueira De Oliveira, D., Vieira, C., García Guerreiro, M.P., 2023. Impact of Heat Stress on Transposable Element Expression and Derived Small RNAs in *Drosophila subobscura*. *Genome Biology and Evolution* 15, evad189. <https://doi.org/10.1093/gbe/evad189>
13. Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., 2007. Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell* 128, 1089–1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>
14. Brennecke, J., Malone, C.D., Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Stark, A., Hannon, G.J., 2008. An Epigenetic Role for Maternally Inherited piRNAs in Transposon Silencing. *Science* 322, 1387–1392. <https://doi.org/10.1126/science.1165171>
15. Bushman, F.D., 2003. Targeting Survival. *Cell* 115, 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00760-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00760-8)
16. Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Snela, M., Erdem, M., Radtke, K., Ziemnicki, K., Adamski, Z., 2013. Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*. *Cell Biol Toxicol* 29, 117–129. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9240-7>
17. Cacchione, S., Cenci, G., Raffa, G.D., 2020. Silence at the End: How *Drosophila* Regulates Expression and Transposition of Telomeric Retroelements. *Journal of Molecular Biology* 432, 4305–4321. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.06.004>
18. Cappucci, U., Noro, F., Casale, A.M., Fanti, L., Berloco, M., Alagia, A.A., Grassi, L., Le Pera, L., Piacentini, L., Pimpinelli, S., 2019. The Hsp70 chaperone is a major player in stress-induced transposable element activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 17943–17950. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903936116>
19. Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
20. Casacuberta, E., 2017. *Drosophila*: Retrotransposons Making up Telomeres. *Viruses* 9, 192. <https://doi.org/10.3390/v9070192>
21. Chambeyron, S., Popkova, A., Payen-Groschêne, G., Brun, C., Laouini, D., Pelisson, A., Bucheton, A., 2008. piRNA-mediated nuclear accumulation of retrotransposon transcripts in the *Drosophila* female germline. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14964–14969. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805943105>
22. Chang, T.H., Mattei, E., Gainetdinov, I., Colpan, C., Weng, Z., Zamore, P.D., 2019. Maelstrom Represses Canonical Polymerase II Transcription within Bi-directional piRNA Clusters in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Cell* 73, 291–303.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.038>
23. Chang, Y.-H., Dubnau, J., 2019. The Gypsy Endogenous Retrovirus Drives Non-Cell-Autonomous Propagation in a *Drosophila* TDP-43 Model of Neurodegeneration. *Current Biology* 29, 3135–3152.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.071>

24. Chen, P., Kotov, A.A., Godneeva, B.K., Bazylev, S.S., Olenina, L.V., Aravin, A.A., 2021. piRNA-mediated gene regulation and adaptation to sex-specific transposon expression in *D. melanogaster* male germline. *Genes Dev.* 35, 914–935. <https://doi.org/10.1101/gad.345041.120>
25. Chung, H., Bogwitz, M.R., McCart, C., Andrianopoulos, A., French-Constant, R.H., Batterham, P., Daborn, P.J., 2007. *Cis*-Regulatory Elements in the *Accord* Retrotransposon Result in Tissue-Specific Expression of the *Drosophila melanogaster* Insecticide Resistance Gene *Cyp6g1*. *Genetics* 175, 1071–1077. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066597>
26. Chung, W.-J., Okamura, K., Martin, R., Lai, E.C., 2008. Endogenous RNA Interference Provides a Somatic Defense against *Drosophila* Transposons. *Current Biology* 18, 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.05.006>
27. Clark, J.P., Rahman, R., Yang, N., Yang, L.H., Lau, N.C., 2017. *Drosophila* PAF1 Modulates PIWI/piRNA Silencing Capacity. *Current Biology* 27, 2718–2726.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.052>
28. Claycomb, J.M., 2014. Emerging from the Clouds: Vasa Helicase Sheds Light on piRNA Amplification. *Developmental Cell* 29, 632–634. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.009>
29. Cui, M., Bai, Y., Li, K., Rong, Y.S., 2021. Taming active transposons at *Drosophila* telomeres: The interconnection between HipHop's roles in capping and transcriptional silencing. *PLoS Genet* 17, e1009925. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009925>
30. Da Silva Cruz, A., Da Silva-Zacarin, E.C.M., Bueno, O.C., Malaspina, O., 2010. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: Morphological alterations in the midgut of *A. mellifera*. *Cell Biol Toxicol* 26, 165–176. <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9126-x>
31. Dabbaghizadeh, A., Tanguay, R.M., 2020. Structural and functional properties of proteins interacting with small heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 25, 629–637. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01097-x>
32. Dej, K., 1998. A hotspot for the *Drosophila* gypsy retroelement in the ovo locus. *Nucleic Acids Research* 26, 4019–4025. <https://doi.org/10.1093/nar/26.17.4019>
33. Denner, J., 2016. How Active Are Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs)? *Viruses* 8, 215. <https://doi.org/10.3390/v8080215>
34. Detzer, A., Engel, C., Wünsche, W., Sczakiel, G., 2011. Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells. *Nucleic Acids Research* 39, 2727–2741. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1216>
35. Ding, D., Lipshitz, H.D., 1994. Spatially regulated expression of retrovirus-like transposons during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *Genet. Res.* 64, 167–181. <https://doi.org/10.1017/S0016672300032833>
36. Dragh, M.A., Xu, Z., Al-Allak, Z.S., Hong, L., 2017. Vitamin K2 Prevents Lymphoma in *Drosophila*. *Sci Rep* 7, 17047. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17270-9>

37. Evgen'ev, M.B., Yenikolopov, G.N., Peunova, N.I., Ilyin, Y.V., 1982. Transposition of mobile genetic elements in interspecific hybrids of *Drosophila*. *Chromosoma* 85, 375–386. <https://doi.org/10.1007/BF00330360>
38. Ewing, A.D., Smits, N., Sanchez-Luque, F.J., Faivre, J., Brennan, P.M., Richardson, S.R., Cheetham, S.W., Faulkner, G.J., 2020. Nanopore Sequencing Enables Comprehensive Transposable Element Epigenomic Profiling. *Molecular Cell* 80, 915-928.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.024>
39. Fagegaltier, D., Bougé, A.-L., Berry, B., Poisot, É., Sismeiro, O., Coppée, J.-Y., Théodore, L., Voinnet, O., Antoniewski, C., 2009. The endogenous siRNA pathway is involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21258–21263. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809208105>
40. Feschotte, C., Jiang, N., Wessler, S.R., 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet* 3, 329–341. <https://doi.org/10.1038/nrg793>
41. Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
42. Fleckner, J., Zhang, M., Valcárcel, J., Green, M.R., 1997. U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction. *Genes Dev.* 11, 1864–1872. <https://doi.org/10.1101/gad.11.14.1864>
43. Funikov, S.Y., Ryazansky, S., Zelentsova, E., Popenko, V., Leonova, O., Garbuz, D., Evgen'ev, M., Zatsepina, O., 2015. The peculiarities of piRNA expression upon heat shock exposure in *Drosophila melanogaster*. *Mobile Genetic Elements* 5, 72–80. <https://doi.org/10.1080/2159256X.2015.1086502>
44. Gao, X., Hou, Y., Ebina, H., Levin, H.L., Voytas, D.F., 2008. Chromodomains direct integration of retrotransposons to heterochromatin. *Genome Res.* 18, 359–369. <https://doi.org/10.1101/gr.7146408>
45. Gebert, D., Neubert, L.K., Lloyd, C., Gui, J., Lehmann, R., Teixeira, F.K., 2021. Large *Drosophila* germline piRNA clusters are evolutionarily labile and dispensable for transposon regulation. *Molecular Cell* 81, 3965-3978.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.011>
46. Gebert, D., Zischler, H., Rosenkranz, D., 2019. Primate piRNA Cluster Evolution Suggests Limited Relevance of Pseudogenes in piRNA-Mediated Gene Regulation. *Genome Biology and Evolution* 11, 1088–1104. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz060>
47. Gold, K.S., Brückner, K., 2015. Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*. *Seminars in Immunology* 27, 357–368. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.010>
48. Gonis, E., Fraichard, S., Chertemps, T., Hecker, A., Schwartz, M., Canon, F., Neiers, F., 2022. Expression Patterns of *Drosophila Melanogaster* Glutathione Transferases. *Insects* 13, 612. <https://doi.org/10.3390/insects13070612>
49. Gramates L.S., Agapite J., Attrill H., 2022. FlyBase: a guided tour of highlighted features. *Genetics* 220. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac035>

50. Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B.J., Chiang, H.R., King, N., Degnan, B.M., Rokhsar, D.S., Bartel, D.P., 2008. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 455, 1193–1197. <https://doi.org/10.1038/nature07415>
51. Guerreiro, M.P.G., 2012. What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? *Heredity* 108, 461–468. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.89>
52. Guida, V., Cernilogar, F.M., Filograna, A., De Gregorio, R., Ishizu, H., Siomi, M.C., Schotta, G., Belenchi, G.C., Andrenacci, D., 2016. Production of Small Noncoding RNAs from the *flamenco* Locus Is Regulated by the *gypsy* Retrotransposon of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 204, 631–644. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.187922>
53. Habes, D., Morakchi, S., Arbi, N., Farine, J.-P., Soltani, N., 2006. Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione *S*-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.05.002>
54. Hafer, N., Schedl, P., 2006. Dissection of Larval CNS in *Drosophila Melanogaster*. *JoVE* 85. <https://doi.org/10.3791/85>
55. Handler, D., Meixner, K., Pizka, M., Lauss, K., Schmied, C., Gruber, F.S., Brennecke, J., 2013. The Genetic Makeup of the *Drosophila* piRNA Pathway. *Molecular Cell* 50, 762–777. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.031>
56. Hetru, C., Hoffmann, J.A., 2009. NF- $\kappa$ B in the Immune Response of *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1, a000232–a000232. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000232>
57. Hirakata, S., Siomi, M.C., 2019. Assembly and Function of Gonad-Specific Non-Membranous Organelles in *Drosophila* piRNA Biogenesis. *ncRNA* 5, 52. <https://doi.org/10.3390/ncrna5040052>
58. Hirakata, S., Siomi, M.C., 2016. piRNA biogenesis in the germline: From transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.09.002>
59. Hombría, J.C.-G., Sotillos, S., 2013. JAK-STAT pathway in *Drosophila* morphogenesis: From organ selector to cell behavior regulator. *JAK-STAT* 2, e26089. <https://doi.org/10.4161/jkst.26089>
60. Horváth, V., Merenciano, M., González, J., 2017. Revisiting the Relationship between Transposable Elements and the Eukaryotic Stress Response. *Trends in Genetics, Transposable Elements* 33, 832–841. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.08.007>
61. Hoskins, R.A., Carlson, J.W., Wan, K.H., Park, S., Mendez, I., Galle, S.E., Booth, B.W., Pfeiffer, B.D., George, R.A., Svirskas, R., Krzywinski, M., Schein, J., Accardo, M.C., Damia, E., Messina, G., Méndez-Lago, M., De Pablos, B., Demakova, O.V., Andreyeva, E.N., Boldyreva, L.V., Marra, M., Carvalho, A.B., Dimitri, P., Villasante, A., Zhimulev, I.F., Rubin, G.M., Karpen, G.H., Celniker, S.E., 2015. The Release 6 reference sequence of the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res.* 25, 445–458. <https://doi.org/10.1101/gr.185579.114>

62. Huang, S., Yoshitake, K., Asakawa, S., 2021. A Review of Discovery Profiling of PIWI-Interacting RNAs and Their Diverse Functions in Metazoans. *IJMS* 22, 11166. <https://doi.org/10.3390/ijms222011166>
63. Hunter, R.G., Gagnidze, K., McEwen, B.S., Pfaff, D.W., 2015. Stress and the dynamic genome: Steroids, epigenetics, and the transposome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 6828–6833. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411260111>
64. Hur, J.K., Luo, Y., Moon, S., Ninova, M., Marinov, G.K., Chung, Y.D., Aravin, A.A., 2016. Splicing-independent loading of TREX on nascent RNA is required for efficient expression of dual-strand piRNA clusters in *Drosophila*. *Genes Dev.* 30, 840–855. <https://doi.org/10.1101/gad.276030.115>
65. Hwang, Y.E., Baek, Y.M., Baek, A., Kim, D.-E., 2019. Oxidative stress causes *Alu* RNA accumulation via PIWIL4 sequestration into stress granules. *BMB Rep.* 52, 196–201. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.3.146>
66. Ikeda, K., Nakayashiki, H., Takagi, M., Tosa, Y., Mayama, S., 2001. Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Gen Genomics* 266, 318–325. <https://doi.org/10.1007/s004380100560>
67. Ishizu, H., Siomi, H., Siomi, M.C., 2012. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes Dev.* 26, 2361–2373. <https://doi.org/10.1101/gad.203786.112>
68. Johnson, W.E., 2019. Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses. *Nat Rev Microbiol* 17, 355–370. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0189-2>
69. Junakovic, N., Di Franco, C., Barsanti, P., Palumbo, G., 1986. Transposition of copia-like nomadic elements can be induced by heat shock. *J Mol Evol* 24, 89–93. <https://doi.org/10.1007/BF02099955>
70. Kaminker, J.S., Bergman, C.M., Kronmiller, B., Carlson, J., Svirskas, R., Patel, S., Frise, E., Wheeler, D.A., Lewis, S.E., Rubin, G.M., Ashburner, M., Celniker, S.E., 2002. The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biology* 3, research0084.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-12-research0084>
71. Kasuya, J., Kaas, G.A., Kitamoto, T., 2009. A putative amino acid transporter of the solute carrier 6 family is upregulated by lithium and is required for resistance to lithium toxicity in *Drosophila*. *Neuroscience* 163, 825–837. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.027>
72. Kidwell, M.G., 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115, 49–63. <https://doi.org/10.1023/A:1016072014259>
73. Kidwell, M.G., Kidwell, J.F., Sved, J.A., 1977. HYBRID DYSGENESIS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*: A SYNDROME OF ABERRANT TRAITS INCLUDING MUTATION, STERILITY AND MALE RECOMBINATION. *Genetics* 86, 813–833. <https://doi.org/10.1093/genetics/86.4.813>

74. Kidwell, M.G., Novy, J.B., 1979. HYBRID DYSGENESIS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* : STERILITY RESULTING FROM GONADAL DYSGENESIS IN THE P-M SYSTEM. *Genetics* 92, 1127–1140. <https://doi.org/10.1093/genetics/92.4.1127>
75. Kim, K.W., 2019. PIWI Proteins and piRNAs in the Nervous System. *Mol Cells* 42, 828–835. <https://doi.org/10.14348/molcells.2019.0241>
76. Klattenhoff, C., Xi, H., Li, C., Lee, S., Xu, J., Khurana, J.S., Zhang, F., Schultz, N., Koppetsch, B.S., Nowosielska, A., Seitz, H., Zamore, P.D., Weng, Z., Theurkauf, W.E., 2009. The *Drosophila* HP1 Homolog Rhino Is Required for Transposon Silencing and piRNA Production by Dual-Strand Clusters. *Cell* 138, 1137–1149. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.014>
77. Klenov, M.S., Sokolova, O.A., Yakushev, E.Y., Stolyarenko, A.D., Mikhaleva, E.A., Lavrov, S.A., Gvozdev, V.A., 2011. Separation of stem cell maintenance and transposon silencing functions of Piwi protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18760–18765. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106676108>
78. Klotz, J.H., Amrhein, C., McDaniel, S., Rust, M.K., Reiersen, D.A., 2002. Assimilation and Toxicity of Boron in the Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Entomological Science* 37, 193–199. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-37.2.193>
79. Kneuss, E., Munafò, M., Eastwood, E.L., Deumer, U.-S., Preall, J.B., Hannon, G.J., Czech, B., 2019. Specialization of the *Drosophila* nuclear export family protein Nxf3 for piRNA precursor export. *Genes Dev.* 33, 1208–1220. <https://doi.org/10.1101/gad.328690.119>
80. Komarov, P.A., Sokolova, O., Akulenko, N., Brasset, E., Jensen, S., Kalmykova, A., 2020. Epigenetic Requirements for Triggering Heterochromatinization and Piwi-Interacting RNA Production from Transgenes in the *Drosophila* Germline. *Cells* 9, 922. <https://doi.org/10.3390/cells9040922>
81. Labrador, M., Fontdevila, A., 1994. High transposition rates of Osvaldo, a new *Drosophila buzzatii* retrotransposon. *Molec. Gen. Genet.* 245, 661–674. <https://doi.org/10.1007/BF00297273>
82. Lanciano, S., Cristofari, G., 2020. Measuring and interpreting transposable element expression. *Nat Rev Genet* 21, 721–736. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0251-y>
83. Le Bourg, É., 2001. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters* 498, 183–186. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02457-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02457-7)
84. Lee Ch., Huang Ch.-Hs., 2013. LASAGNA-Search: an integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization. *BioTechniques* 54, 141–153. <https://doi.org/doi/10.2144/000113999>
85. Liu, N., Neuenkirchen, N., Zhong, M., Lin, H., 2021. Genome-wide mapping of Piwi association with specific loci in *Drosophila* ovaries. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 11, jkaa059. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkaa059>
86. Makhnovskii, P., Balakireva, Y., Nefedova, L., Lavrenov, A., Kuzmin, I., Kim, A., 2020. Domesticated gag Gene of *Drosophila* LTR Retrotransposons Is Involved in Response to Oxidative Stress. *Genes* 11, 396. <https://doi.org/10.3390/genes11040396>

87. Malik, H.S., Eickbush, T.H., 1999. Modular Evolution of the Integrase Domain in the Ty3/Gypsy Class of LTR Retrotransposons. *J Virol* 73, 5186–5190. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.6.5186-5190.1999>
88. McClintock, B., 1984. The Significance of Responses of the Genome to Challenge. *Science* 226, 792–801. <https://doi.org/10.1126/science.15739260>
89. Meister, M., Lagueux, M., 2003. *Drosophila* blood cells. *Cellular Microbiology* 5, 573–580. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00302.x>
90. Meyer, H., Buhr, A., Callaerts, P., Schiemann, R., Wolfner, M.F., Marygold, S.J., n.d. Identification and bioinformatic analysis of neprilysin and neprilysin-like metalloendopeptidases in *Drosophila melanogaster*. *MicroPubl Biol* 2021, 10.17912/micropub.biology.000410. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000410>
91. Mhiri, C., Morel, J.-B., Vernhettes, S., Casacuberta, J.M., Lucas, H., Grandbastien, M.-A., 1997. The promoter of the tobacco Tnt1 retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Mol Biol* 33, 257–266. <https://doi.org/10.1023/A:1005727132202>
92. Miller, D.E., Dorador, A.P., Van Vaerenberghe, K., Li, A., Grantham, E.K., Cerbin, S., Cummings, C., Barragan, M., Egidy, R.R., Scott, A.R., Hall, K.E., Perera, A., Gilliland, W.D., Hawley, R.S., Blumenstiel, J.P., 2023. Off-target piRNA gene silencing in *Drosophila melanogaster* rescued by a transposable element insertion. *PLoS Genet* 19, e1010598. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010598>
93. Miyao, A., Tanaka, K., Murata, K., Sawaki, H., Takeda, S., Abe, K., Shinozuka, Y., Onosato, K., Hirochika, H., 2003. Target Site Specificity of the *Tos17* Retrotransposon Shows a Preference for Insertion within Genes and against Insertion in Retrotransposon-Rich Regions of the Genome. *Plant Cell* 15, 1771–1780. <https://doi.org/10.1105/tpc.012559>
94. Mohn, F., Sienski, G., Handler, D., Brennecke, J., 2014. The Rhino-Deadlock-Cutoff Complex Licenses Noncanonical Transcription of Dual-Strand piRNA Clusters in *Drosophila*. *Cell* 157, 1364–1379. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.031>
95. Morrow, G., Samson, M., Michaud, S., M. Tanguay, R., 2004. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *The FASEB Journal* 18, 598–599. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0860fje>
96. Moschetti, R., Palazzo, A., Lorusso, P., Viggiano, L., Massimiliano Marsano, R., 2020. “What You Need, Baby, I Got It”: Transposable Elements as Suppliers of Cis-Operating Sequences in *Drosophila*. *Biology* 9, 25. <https://doi.org/10.3390/biology9020025>
97. Moshkovich, N., Lei, E.P., 2010. HP1 Recruitment in the Absence of Argonaute Proteins in *Drosophila*. *PLoS Genet* 6, e1000880. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000880>
98. Mugat, B., Akkouche, A., Serrano, V., Armenise, C., Li, B., Brun, C., Fulga, T.A., Van Vactor, D., Pélisson, A., Chambeyron, S., 2015. MicroRNA-Dependent Transcriptional Silencing of Transposable Elements in *Drosophila* Follicle Cells. *PLoS Genet* 11, e1005194. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005194>
99. Mugat, B., Nicot, S., Varela-Chavez, C., Jourdan, C., Sato, K., Basyuk, E., Juge, F., Siomi, M.C., Pélisson, A., Chambeyron, S., 2020. The Mi-2 nucleosome remodeler and the Rpd3

- histone deacetylase are involved in piRNA-guided heterochromatin formation. *Nat Commun* 11, 2818. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16635-5>
100. Mustafin, R.N., Khusnutdinova, E.K., 2020. Involvement of transposable elements in neurogenesis. *Vestn. VOGiS* 24, 209–218. <https://doi.org/10.18699/VJ20.613>
  101. Myllymäki, H., Rämet, M., 2014. JAK/STAT Pathway in *Drosophila* Immunity. *Scand J Immunol* 79, 377–385. <https://doi.org/10.1111/sji.12170>
  102. Nagao, A., Sato, K., Nishida, K.M., Siomi, H., Siomi, M.C., 2011. Gender-Specific Hierarchy in Nuage Localization of PIWI-Interacting RNA Factors in *Drosophila*. *Front. Gene. 2*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00055>
  103. Najjarro, M.A., Hackett, J.L., Macdonald, S.J., 2017. Loci Contributing to Boric Acid Toxicity in Two Reference Populations of *Drosophila melanogaster*. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 7, 1631–1641. <https://doi.org/10.1534/g3.117.041418>
  104. Nefedova, L.N., Kuzmin, I.V., Makhnovskii, P.A., Kim, A.I., 2014. Domesticated retroviral GAG gene in *Drosophila*: New functions for an old gene. *Virology* 450–451, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.024>
  105. Nefedova, L.N., Mannanova, M.M., Kim, A.I., 2011. Integration specificity of LTR-retrotransposons and retroviruses in the *Drosophila melanogaster* genome. *Virus Genes* 42, 297–306. <https://doi.org/10.1007/s11262-010-0566-4>
  106. Nishida, K.M., Okada, T.N., Kawamura, T., Mituyama, T., Kawamura, Y., Inagaki, S., Huang, H., Chen, D., Kodama, T., Siomi, H., Siomi, M.C., 2009. Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in *Drosophila* germlines. *EMBO J* 28, 3820–3831. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.365>
  107. Nishida, K.M., Saito, K., Mori, T., Kawamura, Y., Nagami-Okada, T., Inagaki, S., Siomi, H., Siomi, M.C., 2007. Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine–piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. *RNA* 13, 1911–1922. <https://doi.org/10.1261/rna.744307>
  108. Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, M.K., Bonnefond, L., Matsumoto, N., Nishizawa, T., Nakanaga, K., Aoki, J., Ishitani, R., Siomi, H., Siomi, M.C., Nureki, O., 2012. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491, 284–287. <https://doi.org/10.1038/nature11509>
  109. Ochoa Thomas, E., Zuniga, G., Sun, W., Frost, B., 2020. Awakening the dark side: retrotransposon activation in neurodegenerative disorders. *Current Opinion in Neurobiology* 61, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.01.012>
  110. Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., the UGENE team, 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
  111. Oliveira, D.S., Rosa, M.T., Vieira, C., Loreto, E.L.S., 2021. Oxidative and radiation stress induces transposable element transcription in *Drosophila melanogaster*. *J of Evolutionary Biology* 34, 628–638. <https://doi.org/10.1111/jeb.13762>
  112. Olovnikov, I., Ryazansky, S., Shpiz, S., Lavrov, S., Abramov, Y., Vaury, C., Jensen, S., Kalmykova, A., 2013. De novo piRNA cluster formation in the *Drosophila* germ line

- triggered by transgenes containing a transcribed transposon fragment. *Nucleic Acids Research* 41, 5757–5768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt310>
113. Onishi, R., Sato, K., Murano, K., Negishi, L., Siomi, H., Siomi, M.C., 2020. Piwi suppresses transcription of Brahma-dependent transposons via Maelstrom in ovarian somatic cells. *Sci. Adv.* 6, eaaz7420. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7420>
  114. Onishi, R., Yamanaka, S., Siomi, M.C., 2021. piRNA- and siRNA-mediated transcriptional repression in *Drosophila*, mice, and yeast: new insights and biodiversity. *EMBO Reports* 22, e53062. <https://doi.org/10.15252/embr.202153062>
  115. Orozco-Arias, S., Isaza, G., Guyot, R., Tabares-Soto, R., 2019. A systematic review of the application of machine learning in the detection and classification of transposable elements. *PeerJ* 7, e8311. <https://doi.org/10.7717/peerj.8311>
  116. Osumi, K., Sato, K., Murano, K., Siomi, H., Siomi, M.C., 2019. Essential roles of Wendei and nuclear monoubiquitination of Eggless/ SETDB 1 in transposon silencing. *EMBO Reports* 20, e48296. <https://doi.org/10.15252/embr.201948296>
  117. Pane, A., Wehr, K., Schüpbach, T., 2007. zucchini and squash Encode Two Putative Nucleases Required for rasiRNA Production in the *Drosophila* Germline. *Developmental Cell* 12, 851–862. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.022>
  118. Papaceit, M., Ávila, V., Aguadé, M., García-Dorado, A., 2007. The Dynamics of the *roo* Transposable Element In Mutation-Accumulation Lines and Segregating Populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 177, 511–522. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.076174>
  119. Parhad, S.S., Tu, S., Weng, Z., Theurkauf, W.E., 2017. Adaptive Evolution Leads to Cross-Species Incompatibility in the piRNA Transposon Silencing Machinery. *Developmental Cell* 43, 60-70.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.012>
  120. Parhad, S.S., Yu, T., Zhang, G., Rice, N.P., Weng, Z., Theurkauf, W.E., 2020. Adaptive Evolution Targets a piRNA Precursor Transcription Network. *Cell Reports* 30, 2672-2685.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.109>
  121. Patil, V.S., Kai, T., 2010. Repression of Retroelements in *Drosophila* Germline via piRNA Pathway by the Tudor Domain Protein Tejas. *Current Biology* 20, 724–730. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.046>
  122. Pavlova, G.A., Popova, J.V., Andreyeva, E.N., Yarinich, L.A., Lebedev, M.O., Razuvaeva, A.V., Dubatolova, T.D., Oshchepkova, A.L., Pellacani, C., Somma, M.P., Pindyurin, A.V., Gatti, M., 2019. RNAi-mediated depletion of the NSL complex subunits leads to abnormal chromosome segregation and defective centrosome duplication in *Drosophila* mitosis. *PLoS Genet* 15, e1008371. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008371>
  123. Perrat, P.N., DasGupta, S., Wang, J., Theurkauf, W., Weng, Z., Rosbash, M., Waddell, S., 2013. Transposition-Driven Genomic Heterogeneity in the *Drosophila* Brain. *Science* 340, 91–95. <https://doi.org/10.1126/science.1231965>
  124. Petrov, D.A., Schutzman, J.L., Hartl, D.L., Lozovskaya, E.R., 1995. Diverse transposable elements are mobilized in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8050–8054. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.8050>

125. Picard, G., Bregliano, J.C., Bucheton, A., Lavige, J.M., Pelisson, A., Kidwell, M.G., 1978. Non-mendelian female sterility and hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 32, 275–287. <https://doi.org/10.1017/S0016672300018772>
126. Pinal, N., Calleja, M., Morata, G., 2019. Pro-apoptotic and pro-proliferation functions of the JNK pathway of *Drosophila*: roles in cell competition, tumorigenesis and regeneration. *Open Biol.* 9, 180256. <https://doi.org/10.1098/rsob.180256>
127. Potapova, M.V., Nefedova, L.N., Kim, A.I., 2009. [Analysis of the structure and expression of the cluster of *Drosophila melanogaster* genes DIP1, CG32500, CG32819, and CG14476 in the flamenco gene region]. *Genetika* 45, 1324–1331.
128. Radion, E., Morgunova, V., Ryazansky, S., Akulenko, N., Lavrov, S., Abramov, Y., Komarov, P.A., Glukhov, S.I., Olovnikov, I., Kalmykova, A., 2018. Key role of piRNAs in telomeric chromatin maintenance and telomere nuclear positioning in *Drosophila* germline. *Epigenetics & Chromatin* 11, 40. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0210-4>
129. Ramat, A., Simonelig, M., 2021. Functions of PIWI Proteins in Gene Regulation: New Arrows Added to the piRNA Quiver. *Trends in Genetics* 37, 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.08.011>
130. Ratner, V.A., Zabanov, S.A., Kolesnikova, O.V., Vasilyeva, L.A., 1992. Induction of the mobile genetic element Dm-412 transpositions in the *Drosophila* genome by heat shock treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 5650–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5650>
131. Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., Mesirov, J.P., 2011. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29, 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
132. Romero-Soriano, V., Garcia Guerreiro, M.P., 2016. Expression of the Retrotransposon Helena Reveals a Complex Pattern of TE Dereglulation in *Drosophila* Hybrids. *PLoS ONE* 11, e0147903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147903>
133. Saint-Leandre, B., Christopher, C., Levine, M.T., 2020. Adaptive evolution of an essential telomere protein restricts telomeric retrotransposons. *eLife* 9, e60987. <https://doi.org/10.7554/eLife.60987>
134. Sarkar, A., Volff, J.-N., Vauray, C., 2017. piRNAs and their diverse roles: a transposable element-driven tactic for gene regulation? *The FASEB Journal* 31, 436–446. <https://doi.org/10.1096/fj.201600637RR>
135. Sato, K., Siomi, M.C., 2018. Two distinct transcriptional controls triggered by nuclear Piwi-piRISCs in the *Drosophila* piRNA pathway. *Current Opinion in Structural Biology* 53, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.06.005>
136. Schietgat, L., Vens, C., Cerri, R., Fischer, C.N., Costa, E., Ramon, J., Carareto, C.M.A., Blockeel, H., 2018. A machine learning based framework to identify and classify long terminal repeat retrotransposons. *PLoS Comput Biol* 14, e1006097. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006097>
137. Schlenke, T.A., Begun, D.J., 2004. Strong selective sweep associated with a transposon insertion in *Drosophila simulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 1626–1631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0303793101>

138. Schnabl, J., Wang, J., Hohmann, U., Gehre, M., Batki, J., Andreev, V.I., Purkhauer, K., Fasching, N., Duchek, P., Novatchkova, M., Mechtler, K., Plaschka, C., Patel, D.J., Brennecke, J., 2021. Molecular principles of Piwi-mediated cotranscriptional silencing through the dimeric SFiNX complex. *Genes Dev.* 35, 392–409. <https://doi.org/10.1101/gad.347989.120>
139. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B., Zamore, P.D., 2002. Evidence that siRNAs Function as Guides, Not Primers, in the *Drosophila* and Human RNAi Pathways. *Molecular Cell* 10, 537–548. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00651-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00651-2)
140. Senti, K.-A., Brennecke, J., 2010. The piRNA pathway: a fly's perspective on the guardian of the genome. *Trends in Genetics* 26, 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.08.007>
141. Seong, C.-S., Varela-Ramirez, A., Tang, X., Anchondo, B., Magallanes, D., Aguilera, R.J., 2014. Cloning and Characterization of a Novel *Drosophila* Stress Induced DNase. *PLoS ONE* 9, e103564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103564>
142. Silver-Morse, L., Li, W.X., 2013. JAK-STAT in heterochromatin and genome stability. *JAK-STAT* 2, e26090. <https://doi.org/10.4161/jkst.26090>
143. Simon, B., Kirkpatrick, J.P., Eckhardt, S., Reuter, M., Rocha, E.A., Andrade-Navarro, M.A., Sehr, P., Pillai, R.S., Carlomagno, T., 2011. Recognition of 2'-O-Methylated 3'-End of piRNA by the PAZ Domain of a Piwi Protein. *Structure* 19, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.11.015>
144. Siomi, M.C., Saito, K., Siomi, H., 2008. How selfish retrotransposons are silenced in *Drosophila* germline and somatic cells. *FEBS Letters* 582, 2473–2478. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.06.018>
145. Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., Aravin, A.A., 2011. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 246–258. <https://doi.org/10.1038/nrm3089>
146. Sneddon, A., Flavell, A.J., 1989. The transcriptional control regions of the *copia* retrotransposon. *Nucl Acids Res* 17, 4025–4035. <https://doi.org/10.1093/nar/17.11.4025>
147. Soleimani, S., Valizadeh Arshad, Z., Moradi, S., Ahmadi, A., Davarpanah, S.J., Azimzadeh Jamalkandi, S., 2020. Small regulatory noncoding RNAs in *Drosophila melanogaster*: biogenesis and biological functions. *Briefings in Functional Genomics* 19, 309–323. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elaa005>
148. Sousa-Victor, P., Ayyaz, A., Hayashi, R., Qi, Y., Madden, D.T., Lunyak, V.V., Jasper, H., 2017. Piwi Is Required to Limit Exhaustion of Aging Somatic Stem Cells. *Cell Reports* 20, 2527–2537. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.059>
149. Spradling, A., 2018. Supplemental Material for DeLuca and Spradling, 2018. Figshare. <https://doi.org/10.25386/GENETICS.6089828>
150. Sumida S., Da Silva-Zacarin E. C., Decio P., Malaspina O., Bueno F. C., Bueno O. C., 2010. Toxicological and histopathological effects of boric acid on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers. *Journal of Economic Entomology* 103, 676–690.

151. Sykiotis, G.P., Bohmann, D., 2008. Keap1/Nrf2 Signaling Regulates Oxidative Stress Tolerance and Lifespan in *Drosophila*. *Developmental Cell* 14, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.12.002>
152. Tettweiler, G., Miron, M., Jenkins, M., Sonenberg, N., Lasko, P.F., 2005. Starvation and oxidative stress resistance in *Drosophila* are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP. *Genes Dev.* 19, 1840–1843. <https://doi.org/10.1101/gad.1311805>
153. Théron, E., Dennis, C., Brasset, E., Vaury, C., 2014. Distinct features of the piRNA pathway in somatic and germ cells: from piRNA cluster transcription to piRNA processing and amplification. *Mobile DNA* 5, 28. <https://doi.org/10.1186/s13100-014-0028-y>
154. Tsai, S.-Y., Huang, F., 2021. Acetyltransferase Enok regulates transposon silencing and piRNA cluster transcription. *PLoS Genet* 17, e1009349. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009349>
155. Valanne, S., Wang, J.-H., Rämet, M., 2011. The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. *The Journal of Immunology* 186, 649–656. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>
156. Vázquez, J.F., Albornoz, J., Domínguez, A., 2007. Direct determination of the effects of genotype and extreme temperature on the transposition of roo in long-term mutation accumulation lines of *Drosophila melanogaster*. *Mol Genet Genomics* 278, 653. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0282-5>
157. Vieira, C., Aubry, P., Lepetit, D., Bié Mont, C., 1998. A temperature cline in copy number for 412 but not roo/B104 retrotransposons in populations of *Drosophila simulans*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 1161–1165. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0413>
158. Voigt, F., Reuter, M., Kasaruho, A., Schulz, E.C., Pillai, R.S., Barabas, O., 2012. Crystal structure of the primary piRNA biogenesis factor Zucchini reveals similarity to the bacterial PLD endonuclease Nuc. *RNA* 18, 2128–2134. <https://doi.org/10.1261/rna.034967.112>
159. Volpe, A.M., Horowitz, H., Grafer, C.M., Jackson, S.M., Berg, C.A., 2001. *Drosophila rhino* Encodes a Female-Specific Chromo-domain Protein That Affects Chromosome Structure and Egg Polarity. *Genetics* 159, 1117–1134. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.3.1117>
160. Wakisaka Keiko Tsuji, Tanaka Ryo, Hirashima Tomoki, Muraoka Yuuka, Yumiko Azuma, Yoshida Hideki, Yoshida Hideki, Ichiyangi Kenji, Ohno Seiko, Itoh Masanobu, Yamaguchi Masamitsu, 2019. Novel roles of *Drosophila* FUS and Aub responsible for piRNA biogenesis in neuronal disorders. *Brain Research* 1708, Pages 207-219. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.028>
161. Wang, M.C., Bohmann, D., Jasper, H., 2003. JNK Signaling Confers Tolerance to Oxidative Stress and Extends Lifespan in *Drosophila*. *Developmental Cell* 5, 811–816. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00323-X)
162. Wang, S., Lu, X., Qiu, D., Yu, Y., 2021. To export, or not to export: how nuclear export factor variants resolve Piwi's dilemma. *Biochemical Society Transactions* 49, 2073–2079. <https://doi.org/10.1042/BST20201171>
163. Wang, S.H., Elgin, S.C.R., 2011. *Drosophila* Piwi functions downstream of piRNA production mediating a chromatin-based transposon silencing mechanism in female germ

- line. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 21164–21169.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1107892109>
164. Wei, X., Eickbush, D.G., Speece, I., Larracuenta, A.M., 2021. Heterochromatin-dependent transcription of satellite DNAs in the *Drosophila melanogaster* female germline. *eLife* 10, e62375. <https://doi.org/10.7554/eLife.62375>
  165. Wessler, S.R., 1996. Plant retrotransposons: Turned on by stress. *Current Biology* 6, 959–961. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00638-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00638-3)
  166. Wierzbicki, F., Kofler, R., Signor, S., 2023. Evolutionary dynamics of piRNA clusters in *Drosophila*. *Molecular Ecology* 32, 1306–1322. <https://doi.org/10.1111/mec.16311>
  167. Wilby, E.L., Weil, T.T., 2023. Relating the Biogenesis and Function of P Bodies in *Drosophila* to Human Disease. *Genes* 14, 1675. <https://doi.org/10.3390/genes14091675>
  168. Yamaguchi, S., Oe, A., Nishida, K.M., Yamashita, K., Kajiya, A., Hirano, S., Matsumoto, N., Dohmae, N., Ishitani, R., Saito, K., Siomi, H., Nishimasu, H., Siomi, M.C., Nureki, O., 2020. Crystal structure of *Drosophila* Piwi. *Nat Commun* 11, 858. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14687-1>
  169. Yamanaka, S., Siomi, M.C., Siomi, H., 2014. piRNA clusters and open chromatin structure. *Mobile DNA* 5, 22. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-5-22>
  170. Yamashiro, H., Siomi, M.C., 2018. PIWI-Interacting RNA in *Drosophila*: Biogenesis, Transposon Regulation, and Beyond. *Chem. Rev.* 118, 4404–4421. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00393>
  171. Yamazaki, M., Tsugawa, H., Miyao, A., Yano, M., Wu, J., Yamamoto, S., Matsumoto, T., Sasaki, T., Hirochika, H., 2001. The rice retrotransposon Tos17 prefers low-copy-number sequences as integration targets. *Mol Gen Genomics* 265, 336–344. <https://doi.org/10.1007/s004380000421>
  172. Yang, F., Xi, R., 2017. Silencing transposable elements in the *Drosophila* germline. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 435–448. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2353-4>
  173. Yannopoulos G., Stamatis N., Monastirioti M., Hatzopoulos P., Louis C., 1987. Hobo is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 487–495.
  174. Yashiro, R., Murota, Y., Nishida, K.M., Yamashiro, H., Fujii, K., Ogai, A., Yamanaka, S., Negishi, L., Siomi, H., Siomi, M.C., 2018. Piwi Nuclear Localization and Its Regulatory Mechanism in *Drosophila* Ovarian Somatic Cells. *Cell Reports* 23, 3647–3657. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.051>
  175. Ye, W., Liu, X., Guo, J., Sun, X., Sun, Y., Shen, B., Zhou, D., Zhu, C., 2017. piRNA-3878 targets P450 (CpCYP307B1) to regulate pyrethroid resistance in *Culex pipiens pallens*. *Parasitol Res* 116, 2489–2497. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5554-3>
  176. Yu B., Lin Y. A., Parhad S. S., Jin Z., Ma J., Theurkauf W. E., Huang Y., 2018. Structural insights into Rhino-Deadlock complex for germline piRNA cluster specification. 19, e45418.
  177. Zanni, V., Eymery, A., Coiffet, M., Zytnicki, M., Luyten, I., Quesneville, H., Vaury, C., Jensen, S., 2013. Distribution, evolution, and diversity of retrotransposons at the *flamenco*

- locus reflect the regulatory properties of piRNA clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 19842–19847. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313677110>
178. Zhang, S., Pointer, B., Kelleher, E.S., 2020. Rapid evolution of piRNA-mediated silencing of an invading transposable element was driven by abundant de novo mutations. *Genome Res.* 30, 566–575. <https://doi.org/10.1101/gr.251546.119>
  179. Zhang, Y., Liu, W., Li, R., Gu, J., Wu, P., Peng, C., Ma, J., Wu, L., Yu, Y., Huang, Y., 2018. Structural insights into the sequence-specific recognition of Piwi by *Drosophila* Papi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 3374–3379. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717116115>
  180. Zhang, Z., Wang, J., Schultz, N., Zhang, F., Parhad, S.S., Tu, S., Vreven, T., Zamore, P.D., Weng, Z., Theurkauf, W.E., 2014. The HP1 Homolog Rhino Anchors a Nuclear Complex that Suppresses piRNA Precursor Splicing. *Cell* 157, 1353–1363. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.030>
  181. Zhu, Y., Zou, S., Wright, D.A., Voytas, D.F., 1999. Tagging chromatin with retrotransposons: target specificity of the *Saccharomyces* Ty5 retrotransposon changes with the chromosomal localization of Sir3p and Sir4p. *Genes & Development* 13, 2738–2749. <https://doi.org/10.1101/gad.13.20.2738>
  182. Zou, S., Meadows, S., Sharp, L., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 2000. Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13726–13731. <https://doi.org/10.1073/pnas.260496697>
  183. Ким А.И., Беляева Е. С., Ларкина З. Г., Асланян М. М., 1989. Генетическая нестабильность и транспозиции мобильного элемента МДГ4 в мутаторной линии *drosophila melanogaster* . — 1989. — Т. 25, № 10. — С. 1747–1756. *Генетика* 25, 1747–1756.
  184. Кукушкина, И.В., Махновский, П.А., Нефедова, Л.Н., Миляева, П.А., Кузьмин, И.В., Лавренов, А.Р., Ким, А.И., 2020. Анализ транскриптома линий *Drosophila melanogaster* с нарушением контроля транспозиции ретротранспозона *gypsy*. *Генетика* 56, 550–560. <https://doi.org/10.31857/S0016675820050082>
  185. Лавренов, А.Р., Нефедова, Л.Н., Романова, Н.И., Ким, А.И., 2014. Экспрессия генов семейства *hp1* и их возможная роль в формировании фенотипа *flamenco* у *D. melanogaster*. *Биохимия* 79, 1554–1560.
  186. Нефедова, Л.Н., Ким, А.И., 2009. Молекулярная филогения и систематика ретротранспозонов и ретровирусов дрозофилы. *Молекулярная биология* 43, 807–817.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1. Первичные данные количественной ПЦР

К рисунку 13

		<i>αTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>copiA</i>	<i>gypsy</i>	<i>roo</i>	<i>Tirant</i>	<i>TART-A</i>	<i>TART-C</i>
SS яичники	1	19.36	21.37	17.29	22.14	30.59	25.67	24.61	27.55	22.99
	2	18.59	20.37	16.64	21.33	29.59	24.80	23.79	26.68	22.59
	3	18.58	20.57	16.57	23.46	29.02	23.93	22.66	25.55	21.72
	4	20.06	22.22	17.85	26.3	31.52	26.52	24.61	28.38	24.57
	5	19.11	21.10	17.19	22.42	29.61	25.38	24.89	26.64	22.76
	6	18.69	20.85	16.89	22.55	20.52	24.68	23.93	26.64	22.59
Canton-S яичники	1	19.7	21.56	17.83	21.49	30.8	25.57	25.45	28.18	26.46
	2	19.11	20.96	17.46	20.7	29.9	24.9	21.71	28.36	25.1
	3	19.67	21.67	17.93	22.02	31.89	26.27	22.59	29.32	27.11
	4	18.73	20.56	17.28	20.43	29.98	24.56	23.55	28.6	25.46
	5	19.2	20.96	17.58	20.01	31.77	26.04	22.77	29.04	26.63
	6	19.9	21.83	18.16	21.95	32.15	26.77	23	30.6	27.78
SS корпус	1	22.06	23.5	19.54	20.74	32.08	20.26	26.86	28.23	24.28
	2	22.2	23.7	19.58	21.65	31.62	22.04	27.75	29.11	25.3
	3	22.33	23.26	19.63	21.47	32.87	22.85	27.65	27.93	24.71
	4	22.33	23.91	19.77	20.76	26.59	22.52	27.47	28.59	24.55
	5	20.91	22.7	18.57	20.5	27.76	22.77	26.17	28.15	23.79
	6	21.51	22.57	18.82	19.97	30.55	22.59	26.8	26.76	23.49
Canton-S корпус	1	20.59	21.98	18.59	18.75	30.58	21.69	25.84	27.87	25.11
	2	20.89	22.21	18.87	19.34	31.69	21.89	26.65	29.62	24.78
	3	21.53	22.53	18.81	19.56	28.37	22.72	25.93	30.4	26.02
	4	22.29	23.33	19.72	21.53	33.16	23.53	27.97	28.57	27.05
	5	20.94	21.94	18.61	19.52	31.58	22.03	24.9	27.01	26.04
SS голова	1	21.80	23.47	19.11	22.66	31.62	25.75	27.05	23.85	23.07
	2	20.48	21.68	18.25	20.74	29.29	23.65	25.01	21.85	21.05
	3	20.75	22.56	18.68	21.65	29.77	24.28	25.60	22.04	21.54
	4	21.47	23.36	19.09	21.99	29.49	25.16	26.48	22.71	22.69
	5	21.35	23.37	19.07	22.57	30.51	25.55	26.99	23.12	23.29
	6	21.88	23.73	19.62	23.43	31.21	26.38	27.63	24.1	23.62
Canton-S голова	1	20.6	21.93	18.29	19.92	30.44	23.57	25.55	27.82	24.81
	2	22.42	23.96	18.98	21.79	32.36	25.72	26.98	29.6	27.45
	3	21.69	22.83	18.98	21.51	31.69	24.72	26.22	27.97	26.14
	4	21.55	22.97	18.97	21.14	31.35	24.58	26.13	28.84	25.48
	5	21.59	22.7	18.8	21.57	31.66	24.77	26.6	27.86	26.58
	6	21.54	22.52	18.65	20.92	30.84	23.86	25.5	27.57	25.19
SS ЦНС личинки	1	20.45	22.82	18.82	22.28	30.22	28.27	28.86	25.77	22.86
	2	20.49	25.7	20.65	24.18	31.81	29.67	30.51	27.95	24.86
	3	22.66	25.15	20.4	23.76	32.17	29.86	30.13	27.93	24.41
	4	19.77	26.05	21.76	24.72	33.07	30.56	30.62	34.72	24.81
	5	21.26	25.09	20.51	24.62	32.72	29.75	29.94	29.97	24.21
	6	19.67	25.07	20.9	27.9	31.03	29.56	29.56	29.6	23.34
Canton-S ЦНС личинки	1	19.59	23.82	20.06	22.17	32.78	31.04	28.61	27.75	27.49
	2	22.02	23.81	19.13	20.73	31.83	29.26	27.06	26.65	25.86

	3	22.03	27.51	20.73	24.53	35.31	32.63	30.03	28.48	29.44
	4	22.72	23.11	18.84	20.87	30.61	28.11	26.53	24.5	25.11
	5	22	25	20.06	22.5	31.96	29.98	28.46	27.7	26.79
	6	22.04	25.08	18.82	20.46	31.74	28.13	26.94	23.98	25.44
		<i>αTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>TART-B</i>	<i>Het-A</i>	<i>blood</i>			
SS яичники	1	19.37	21.6	17.66	26.05	25.58	23.58			
	2	18.61	19.93	17.06	24.95	23.78	23.48			
	3	20.33	21.68	18.31	28.27	26.96	25.24			
	4	19.56	19.89	17.13	25.77	24.58	23.13			
	5	19.13	20.46	17.44	25.45	25.23	23.7			
Canton-S яичники	1	19.57	20.96	17.89	30.93	26.59	22.38			
	2	18.9	20.62	17.72	29.94	24.56	21.83			
	3	19.97	21.58	18.43	31.57	27.04	22.91			
	4	19.54	20.91	17.95	30.25	26.48	22.48			
	5	19.64	20.99	17.95	30.53	26.21	22.15			
	6	19.49	20.51	17.8	30.62	25.66	22.03			
SS корпус	1	23.17	23.58	19.96	27.73	22.03	23.83			
	2	21.96	22.78	18.79	26.58	24.82	22.44			
	3	21.34	22.16	18.21	25.58	24.38	22.18			
	4	20.53	20.81	17.98	24.61	23.41	21.17			
Canton-S корпус	1	21.54	22.07	18.93	30.4	25.08	20.79			
	2	21.64	21.7	18.71	30	24.05	20.59			
	3	20.68	21.58	18.73	30.52	24.82	20.98			
	4	21.05	21.66	18.5	29.92	24.39	20.48			
	5	21.78	22.52	19.46	30.59	24.66	21.08			
	6	22.35	23.15	19.67	31.48	23.34	21.89			
SS голова	1	20	20.72	17.82	22.93	20.98	20.21			
	2	17.79	22.25	18.68	26.05	23.47	23.42			
	3	22.18	22.91	18.95	26.65	24.8	25.62			
	4	21.46	22.57	18.54	25.7	23.86	23.59			
	5	20.25	20.88	17.76	23.47	22.7	20.6			
	6	20.72	21.58	18.29	24.45	22.06	20.87			
Canton-S голова	1	21.11	21.68	18.49	28.9	22.05	19.62			
	2	20.83	21.42	18.53	28.86	21.51	N/A			
	3	21.04	21.52	18.61	28.6	22.66	19.71			
	4	21.63	21.87	18.69	29.12	22.43	19.65			
	5	20.27	21.02	18.05	28.26	22.07	19.77			
	6	19.95	20.73	17.89	27.67	20.82	19.18			
SS ЦНС личинки	1	18.65	21.62	17.17	22.42	20.17	21.15			
	2	18.6	21.05	17.53	22.42	20.45	20.89			
	3	18.7	21.6	18	22.89	20.65	21.41			
Canton-S ЦНС личинки	1	23.85	23.41	18.81	29.37	23.84	21.78			
	2	19.26	22.02	18.41	26.99	21.8	21.02			
	3	20.22	23.34	18.98	27.87	23.1	21.63			

	4	24.79	27.6	21.05	32.32	30.13	28.34		
--	---	-------	------	-------	-------	-------	-------	--	--

### К рисунку 14

		<i>αTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>gypsy</i>	<i>Tirant</i>	<i>roo</i>	<i>copia</i>	<i>TART-C</i>
Д32 яичники	1	18.52	20.76	17.29	29.54	23.92	24.27	21.55	24.15
	2	18.48	20.56	16.78	29.62	23.67	24.05	21.69	24.13
	3	18.67	21.01	17.34	30.10	24.47	24.94	22.05	24.81
	4	18.47	20.80	17.33	28.92	24.70	25.54	21.31	24.85
	5	19.12	21.56	17.85	30.61	25.10	25.33	23.05	25.57
	6	16.75	20.92	16.59	30.06	24.84	25.48	21.68	25.53
Д32 корпус	1	22.46	23.71	19.63	27.89	26.47	21.44	20.52	26.48
	2	20.9	22.35	18.67	28.16	24.57	22.51	19.54	25.48
	3	21.95	22.97	19.55	29.14	26.02	21.23	20.08	26.39
	4	21.56	22.67	18.7	28.26	25.28	21.89	19.53	25.04
	5	22.1	22.75	19.2	28.67	25.67	21.74	19.74	25.62
Д32 голова	1	20.83	22.60	18.70	27.21	25.81	24.39	20.2	24.46
	2	20.87	22.48	18.58	26.86	25.75	23.67	19.81	23.64
	3	22.58	24.90	19.68	29.47	27.88	25.81	21.92	26.47
	4	19.11	21.85	18.3	27.61	24.86	22.69	19.19	24.3
	5	18.88	21.36	17.81	26.1	24.73	23.44	18.61	23.01
	6	19.98	23.12	18.89	28.52	26.94	24.17	20.56	24.97

### К рисунку 15

		<i>αTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>flam_sp</i>	<i>flam_unsp</i>	<i>42AB_sp</i>	<i>42AB_unsp</i>
SS яичники	1	21.64	24.74	18.75	29.82	29.14	33.37	29.14
	2	20.94	23.68	18.46	28.72	28.69	32.02	28.69
	3	20.79	23.6	17.78	28.14	28.26	31.58	28.26
	4	22.64	26.04	19.8	30.44	30.21	35.74	30.21
	5	21.58	24.56	19.16	28.57	28.75	31.94	28.75
	6	21.45	24.21	18.71	28.79	29.28	32.78	29.28
Canton-S яичники	1	20.64	22.49	19.28	34.66	29.12	32.04	29.67
	2	20.39	22.26	19.08	N/A	28.72	33.03	29.63
	3	20.99	22.76	19.64	39	29.34	33.28	29.9
	4	20.3	21.81	19.11	35.25	28.61	31.59	29.18
	5	20.57	22.39	19.73	38.02	29.2	33.58	30.83
	6	21.07	22.89	19.65	N/A	29.48	37.35	31.25
SS корпус	1	21.08	22.14	18.42	31.65	32.7	28.99	31.01
	2	21.37	22.59	18.55	32.64	32.62	29.61	31.91
	3	20.99	21.86	18.41	35.25	35.02	29.3	31.14
	4	20.96	22.17	18.54	36.07	36.1	29.77	31.68
	5	20.33	22.17	17.87	29.59	29.65	29.34	29.64
	6	20.66	21.66	18.05	32.72	34.93	28.2	35.91

Canton-S корпус	1	20.86	22.45	18.88	N/A	36.26	29.57	31.01
	2	20.96	22.86	18.98	37.07	37.23	28.27	30.51
	3	21.69	22.89	19.23	N/A	30.8	29.02	29.54
	4	22.48	25.63	19.87	N/A	N/A	29.32	31.55
	5	22.34	21.5	19.05	37.15	36.95	28.49	37.01
	6	21.13	22.16	18.71	N/A	31.17	28.65	30.64
SS голова	1	22.07	23.95	19.2	36.63	0	29.82	32.95
	2	21.16	22.56	18.56	36.73	36.81	29.08	31.45
	3	21.11	22.95	18.63	36.69	0	29.42	31.17
	4	21.71	24.43	19.6	36.99	36.37	28.76	32.08
	5	21.58	23.58	18.85	36.61	0	29.07	32.17
	6	22.43	24.85	19.74	34.68	35.38	30.29	31.44
Canton-S голова	1	20.11	21.73	17.78	39	36.09	26.98	29.45
	2	21.76	23.61	18.52	31.85	34.99	27.97	30.2
	3	21.08	22.71	20.55	28.52	37.27	27.4	29.79
	4	21.14	22.71	18.82	N/A	35.53	27.78	30.67
	5	22.12	23.56	19.6	37.49	37.02	28.66	32.93
SS ЦНС личинки	1	20.45	22.82	18.82	29.81	31.54	27.85	29.63
	2	20.49	25.7	20.65	32.46	34.81	30.04	31.96
	3	22.66	25.15	20.4	31.9	34.75	29.53	32.1
	4	19.77	26.05	21.76	32.62	35.73	31.29	31.04
	5	21.26	25.09	20.51	32.51	33.61	29.73	31.06
	6	19.67	25.07	20.9	30.84	32.81	30.35	31.47
Canton-S ЦНС личинки	1	19.59	23.82	20.06	N/A	32.02	28.12	29.74
	2	22.02	23.81	19.13	39	30.67	27.39	28.45
	3	22.03	27.51	20.73	N/A	33.28	30.14	31.73
	4	22.72	23.11	18.84	37.91	31.49	27.49	28.6
	5	22	25	20.06	N/A	31.88	30.08	29.79
	6	22.04	25.08	18.82	39	31.16	28.45	28.69
		<i>aTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>38C 1</i>	<i>38C 2</i>	<i>20A</i>	
SS яичники	1	19.37	21.6	17.66	30.59	30.86	25.56	
	2	18.61	19.93	17.06	27.84	30.6	23.13	
	3	20.33	21.68	18.31	34.82	32.49	26.17	
	4	19.56	19.89	17.13	29.05	30.33	24	
	5	19.13	20.46	17.44	30.26	30.71	24.66	
Canton-S яичники	1	19.57	20.96	17.89	29.09	31.11	29.09	
	2	18.9	20.62	17.72	28.87	30.88	28.87	
	3	19.97	21.58	18.43	30.27	31.53	30.27	
	4	19.54	20.91	17.95	29.89	32.1	29.89	
	5	19.64	20.99	17.95	29.9	31.63	29.9	
	6	19.49	20.51	17.8	28.7	31.23	28.7	
SS корпус	1	23.17	23.58	19.96	34.59	37.17	27.5	
	2	21.96	22.78	18.79	36.98	36.29	26.53	
	3	21.34	22.16	18.21	34.66	34.73	25.64	

	4	20.53	20.81	17.98	30.53	32.59	25.42	
Canton-S корпус	1	21.54	22.07	18.93	32.54	35.99	32.54	
	2	21.64	21.7	18.71	33.32	34.99	33.32	
	3	20.68	21.58	18.73	30.55	32.73	30.55	
	4	21.05	21.66	18.5	32.91	34.96	32.91	
	5	21.78	22.52	19.46	32.79	37.63	32.79	
	6	22.35	23.15	19.67	35.05	N/A	35.05	
SS голова	1	20	20.72	17.82	29.34	30.64	24.97	
	2	17.79	22.25	18.68	34.96	35.55	26.74	
	3	22.18	22.91	18.95	37.91	37.46	27.85	
	4	21.46	22.57	18.54	35.13	32.56	26.56	
	5	20.25	20.88	17.76	29.75	30.31	25	
	6	20.72	21.58	18.29	31.59	31.1	25.26	
Canton-S голова	1	21.11	21.68	18.49	31.02	32.09	31.02	
	2	20.83	21.42	18.53	29.86	31.65	29.86	
	3	21.04	21.52	18.61	31.06	31.57	31.06	
	4	21.63	21.87	18.69	31.16	31.86	31.16	
	5	20.27	21.02	18.05	29.57	32.26	29.57	
	6	19.95	20.73	17.89	29.1	30.52	29.1	
SS ЦНС личинки	1	18.65	21.62	17.17	29.07	30.29	30.2	
	2	18.6	21.05	17.53	28.87	31.07	29.91	
	3	18.7	21.6	18	28.26	29.65	30.51	
Canton-S ЦНС личинки	1	23.85	23.41	18.81	31.23	32.25	31.23	
	2	19.26	22.02	18.41	29.27	N/A	29.27	
	3	20.22	23.34	18.98	30.87	32.08	30.87	
	4	24.79	27.6	21.05	30.32	N/A	30.32	

### К рисунку 16

		<i>αTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>flam_sp</i>	<i>flam_unsp</i>	<i>42AB_sp</i>	<i>42AB_unsp</i>
Д32 яичники	1	20.83	23.5	18.71	37.25	28.52	31.81	29.68
	2	21.3	23.63	18.22	39	28.16	31.84	29.47
	3	20.97	24.09	18.81	35.95	28.95	30.79	30.55
	4	21.29	23.81	19.17	33.98	28.93	32.54	30.47
	5	21.9	24.49	19.99	32.79	29.62	32.61	31.96
	6	21.35	22.92	18.72	N/A	29.36	26.5	31.15

### К рисунку 17

		<i>αTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>cuff</i>	<i>BoYb</i>	<i>caz</i>	<i>zuc</i>	<i>vasa</i>	<i>armi</i>	<i>aub</i>	<i>AGO3</i>	<i>pivi</i>
яичники	1	20.64	22.49	19.28	29.12	26.73	26.39	26.95	24.15	24.02	24.4	23.3	22.91
	2	20.39	22.26	19.08	28.69	26.65	25.55	26.49	24.33	24.49	23.95	22.66	22.03
	3	20.99	22.76	19.64	29.39	27.13	25.86	26.95	26.03	24.68	25	23.49	22.95

	4	20.3	21.81	19.11	28.62	26.19	26.29	25.8	23.54	23.53	23.48	22.47	21.55
	5	20.57	22.39	19.73	28.77	26.68	25.81	28.97	25.67	24.06	24.32	22.86	22.28
	6	21.07	22.89	19.65	29.67	27.5	26.19	27.02	26.03	25.04	25.07	23.57	23.16
корпус	1	20.94	22.11	18.67	31.89	29.74	24.68	29.8	27.14	26.64	27.42	25.83	25.61
	2	23.89	22.08	18.62	32.8	31.04	24.66	30.94	28.57	27.72	28.81	27.87	27.25
	3	21.99	24.45	19.59	35.31	30.14	25.15	31.17	28.24	28.62	28.96	27.56	27.9
	4	22.03	23.77	19.01	35.36	36.53	26.47	39	32.76	32.18	34.82	30.89	32.96
	5	23.2	25.33	19.87	37.27	30.47	27.5	39	32.67	33.25	36.84	31.61	31.5
	6	20.99	22.5	20.58	32.46	32.8	24.99	32.8	30.54	27.64	29.58	28.57	28.2
голова	1	21.32	22.34	18.62	N/A	33.52	25.5	36.18	34.61	27.96	34.95	N/A	31.87
	2	21.29	22.46	18.56	35.71	34.98	25.47	32.99	33.33	28.1	31.36	31.59	32.47
	3	21.95	23.05	18.76	N/A	38.15	25.57	34.96	36.54	30.67	30.61	30.29	36.82
	4	24.14	24.01	19.63	N/A	35.73	26.23	34.86	36.14	31.93	36.57	32.19	N/A
	5	21.72	22.57	19.36	37.99	N/A	25.65	37.03	34.74	29.36	35.25	32.72	30.52
	6	20.58	21.71	18.62	37.84	36.33	24.97	37.18	35.42	27.59	31.6	30.03	31.51
	7	21.17	22.23	18.84	35.69	N/A	26.19	35.31	N/A	28.42	35.92	29.96	33.19
личинки ЦНС	1	19.77	22.99	18.65	31.44	32.76	22.53	28.86	32.7	25.82	32.87	28.62	31.86
	2	19.78	22.95	18.53	30.7	32.48	22.7	28.84	32.8	31.93	31.01	28.74	31.8
	3	22.98	27.35	20.72	35.28	36.67	24.88	32.48	36.59	26.04	N/A	35.6	N/A
	4	19.09	21.92	18.28	30.15	31.39	21.89	28.47	31.47	25.34	30.83	28.48	30.42
	5	20.16	23.22	18.83	31.5	34.65	22.63	29.6	31.88	26.48	32.36	28.72	32.64
	6	19.06	21.88	17.96	30.05	32.46	21.77	29.53	31.94	25.14	30.02	27.3	30.61
		<i>αTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>vret</i>	<i>Hen-1</i>	<i>nxf2</i>	<i>Nxf3</i>	<i>mael</i>	<i>moon</i>			
яичники	1	19.57	20.96	17.89	23.81	24.05	24.96	21.47	21.99	25.53			
	2	18.9	20.62	17.72	23.55	23.84	24.45	21.27	21.67	25.03			
	3	19.97	21.58	18.43	24.52	24.66	25.67	22.21	22.61	25.78			
	4	19.54	20.91	17.95	23.91	24.03	25	21.52	21.95	25.44			
	5	19.64	20.99	17.95	24.06	24.34	25.15	21.65	22.09	25.61			
	6	19.49	20.51	17.8	23.5	23.78	24.54	21.11	21.75	24.9			
корпус	1	21.54	22.07	18.93	28.43	26.88	29.71	24.34	27.07	30.58			
	2	21.64	21.7	18.71	30.9	26.8	32	24.09	28.95	32.72			
	3	20.68	21.58	18.73	25.95	25.58	26.7	23.04	24.4	28.12			
	4	21.05	21.66	18.5	28.63	26.74	29.39	24.32	26.73	30.04			
	5	21.78	22.52	19.46	29.56	27.29	31.12	24.64	28.53	30.83			
	6	22.35	23.15	19.67	30.49	28.41	31.55	25.79	28.46	31.93			
голова	1	21.11	21.68	18.49	31.96	27.28	32.95	24.49	29.26	34.8			
	2	20.83	21.42	18.53	30.52	27.01	32.01	23.95	29.85	32.45			
	3	21.04	21.52	18.61	31.29	26.94	31.74	24.16	29.14	32.79			
	4	21.63	21.87	18.69	33.03	27.26	33.09	24.94	29.49	32.66			
	5	20.27	21.02	18.05	31.68	26.23	31.59	23.55	28.53	30.8			
	6	19.95	20.73	17.89	29.91	25.68	31.1	23.11	28.25	31.49			
ЦНС личинки	1	23.85	23.41	18.81	28.06	27.91	28.73	25.85	29.91	34.85			
	2	19.26	22.02	18.41	26.72	26.3	27.12	24.08	28.39	33.29			
	3	20.22	23.34	18.98	27.64	27.94	27.85	25.42	29.51	35.22			

	4	24.79	27.6	21.05	35.72	36.91	32.13	30.59	33.36	36.85		
--	---	-------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--	--

### К рисункам 18, 19, 20

		<i>αTub8 4D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>rhino</i>	<i>flam_s p</i>	<i>flam_u nsp</i>	<i>42AB_ sp</i>	<i>42AB_ unsp</i>	<i>38C 1</i>	<i>38C 2</i>	<i>20A</i>	
rhino x tubP- Gal4 голова	1	20.92	21.41	17.78	29.2	39	37.13	26.56	29.4	29.42	31.61	27.04	
	2	21.09	20.6	17.74	30.81	37.86	36.41	26.09	29.01	29.95	31.32	27.91	
	3	20.3	20.4	17.58	27.91	32.63	35.41	26.09	28.65	29.23	30.58	27.4	
	4	22.13	22.78	19.09		37.31	37.29	27.95	30.46	28.63	32.12	28.2	
	5	21.07	20.89	18.31	29.46			25.51	27.8	27.11	29.63	26.72	
	6	21.57	22.09	18.85	30.97	37.78	39	28.92	27.07	28.87	30.46	28.43	
	7	22.5	23.93	19.58	31.43			27.55	29.52	27.57	31.55	28.26	
	1 (повт. OT*)	21.59	21.91	18.49									
	2 (повт. OT*)	22.86	23.22	19.22									
	3 (повт. OT*)	20.92	21.01	17.87									
	4 (повт. OT*)	23	23.5	19.53	30.02								
	w[111 8] x tubP- Gal4 голова	1	22.16	22.52	19	29.79	N/A	37.78	30.05	31.79	33.21	33.36	28.87
		2	21.15	21.7	18.61	27.99	37.71	36.86	28.76	30.69	29.6	30.28	27.21
		1 (повт. OT*)	22.45	23.02	19.25								
2 (повт. OT*)		21.46	22.42	18.75									
3		20.55	21.5	18.4	29.54			26.75	29.65	27.09	29.18	26.47	
4		22.03	22.61	19.62	26.83			28.47	29.35	29.96	31.52	27.96	
5		24.32	25.57	20.73	30.87			30.35	30.93	35.24	32.4	29.11	
6		24.6	25.7	20.34	31.76			30.64	33.01	33.27	32.35	30.65	
7		24.27	27.95	22.28	31.98			31.88	32.75	35.36	36.39	30.92	
8		25.55	28.61	23.11	35.5			32.93	34.61	33.37	N/A	31.57	
rhino x tubP- Gal4 яични ки	1	19.29	20.49	16.98	23.66	27.12	28.89	26.82	26.59	28.57	28.83	24.64	
	2	19.64	20.4	17.71	23.74	27.47	28.65	27.56	27.19	29	29.71	24.87	
	3	19.18	20.98	16.85	23.82	26.81	28.67	26.9	26.41	28.5	28.52	24.54	
	4	19.4	20.62	17.17	24.09	27.1	29.11	27.48	26.88	28.87	28.9	25.17	
	5	20.13	21.54	17.7	24.45	27.53	29.31	28.06	27.51	29.12	29.23	25.78	
	6	19.55	20.7	17.55	23.66	28.08	30.29	28.6	28.5	30.13	30.19	25.89	
	7	20.5	21.69	18.5		29.95	30.69	29.39	29.03	30.02	31.73	26.86	
	1 (повт. OT*)	20.24	21.62	17.78									
	2 (повт. OT*)	20.21	21.42	18.15									
	3 (повт. OT*)	20.39	21.83	17.97									
	4 (повт. OT*)	20.6	21.74	18.29									

	5 (повт. ОТ*)	20.16	21.66	17.57								
	6 (повт. ОТ*)	19.85	20.92	17.35								
	7 (повт. ОТ*)	19.98	21.04	18.06	23.99							
	8	20	21.37	18.03	24.49	27.51	28.69	27.39	27.53	28.8	29.85	25.48
	9	20.23	21.64	18	24.51	27.63	29.09	27.47	27.46	29.28	29.72	25.63
	10	20.22	21.64	17.92	24.59	28.45	29.11	27.53	27.73	29.68	30.14	26
	11	20.52	21.65	18.41	24.66	28.32	29.77	27.75	27.62	30.06	30.52	26.53
	12	24.83	26.65	21.19	29.31	31.5	32.78	31.35	29.97	31.24	32.69	29.8
rhino x tubP- Gal4 корпу с	1	22.02	22.53	19.67	28.84	34.5	35.49	27.69	29.63	31.91	34.55	28.54
	2	21.6	21.14	18.59	29.73	38.35	37.45	25.8	28.55	28.7	33.45	27.38
	3	23.6	23.04	19.65	31.68	N/A	38.23	27.03	28.63	30.13	35.5	29.13
	4	21.92	21.8	18.65	30.51	36.38	37.69	27.15	29.61	30.57	33.29	28.46
	5	22.7	22.67	19.43	31.91	N/A	37.86	27.58	29.04	31.51	34.53	28.85
	6	22.05	22.67	18.9	27.22	32.45	35.06	27.71	29.06	30.51	35.03	28.47
	7	21.23	21.7	18.8		N/A	36.56	26.96	28.82	28.41	32.17	29.09
	1 (повт. ОТ*)	22.82	23.59	19.66								
	2 (повт. ОТ*)	22.65	22.41	19.42								
	3 (повт. ОТ*)	23.51	22.82	19.74								
	4 (повт. ОТ*)	22.1	22.12	18.66								
	5 (повт. ОТ*)	23.55	23.43	19.68								
	6 (повт. ОТ*)	21.98	22.77	18.82								
	7 (повт. ОТ*)	22.02	22.14	19.15	29.45							
8	21.24	21.64	18.49	30.81			25.72	27.89	27.86	30.78	26.47	
9	21.46	21.67	18.47	32.1			26.2	28.71	28.05	31.18	28.26	
10	21.97	22.04	18.95	30.64			26.65	28.48	29	31.69	27.6	
11	21.66	21.54	18.76	29.96			27.95	27.76	28.52	31.68	27.21	
12	23.78	24.1	20.37	32.92			27.89	29.82	30.74	32.94	29.61	
13	21.69	22.08	17.59	28.6			25.63	27.62	25.88	31.22	27.49	
14	23.3	22.34	19.5	31.64			27.52	29.54	28.05	35.78	28.83	
w[111 8] x tubP- Gal4 яични ки	1	18.76	19.89	17.36	21.51	28.59	29.75	30.41	27.47	29.25	29.74	24.99
	2	19.13	20	17.42	21.79	28.48	29.67	29.95	26.74	29.47	28.58	25.55
	3	19.46	19.95	17.46	21.88	27.73	29.67	29.52	27.58	29.47	29.72	24.64
	1 (повт. ОТ*)	19.57	20.67	17.8								
	2 (повт. ОТ*)	19.5	20.66	17.63								
3 (повт. ОТ*)	19.57	20.59	17.78									

	4	21.23	25.13	19.98	24.85	32.06	30.99	32.85	29.36	30.21	31.79	27.52	
	5	20.77	25.28	20.54	24.53	32.25	32.31	31.52	29.5	31	31.03	27.19	
	6	21.23	24.79	20.1	24.7	32.09	32.01	32.97	28.99	31.43	31.81	27.49	
	7	25.47	27.01	21.51	27.62	34.96	35.18	33.57	30.59	32.41	33.51	28.94	
w[1118] x tubP-Gal4 корпус	1	20.88	20.97	18.21	25.5	32.66	32.9	27.57	29.52	32.47	32.49	27.08	
	2	21.03	20.47	18.06	26.41	32.64	34.81	26.54	28.17	30.97	32.34	26.79	
	1 (повт. ОТ*)	21.3	21.77	18.62									
	2 (повт. ОТ*)	21.71	21.64	18.65									
	3	21.08	21.91	24.2		32.08	31.54	28.93	31.49	32.74	32.11	26.89	
	4	22.78	23.63	19.89		37.18	38.52	29.68	31.61	36.38	34.6	28.68	
	5	24.54	25.92	20.99		N/A	N/A	30.95	33.19	35.59	35.15	29.61	
	6	23.31	24.4	19.88		33	34.98	29.48	31.48	33.35	33.42	29.23	
	7	21.64	21.23	18.75	30.79			25.96	29.44	29.4	31.27	26.33	
	8	20.64	22.63	19.51	30.47			28.51	29.19	29.5	30.63	26.63	
	9	20.59	23.06	19.56	30.97			28.73	30.14	29.85	31.57	27.05	
10	20.7	23.05	19.54	29.46			28.46	29.52	29.73	31.66	27.22		
11	20.6	23.4	19.58	25.65			28.89	29.53	29.74	30.68	26.69		
		<i>αTub8</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>gypsy</i>	<i>Titant</i>	<i>roo</i>	<i>copia</i>	<i>blood</i>	<i>Het-A</i>	<i>TART-A</i>	<i>TART-B</i>	<i>TART-C</i>
rhino x tubP-Gal4 голова	1	20.92	21.41	17.78	26.56	31.85			21.48	25.37	26.48	26.31	24.76
	2	21.09	20.6	17.74	26.47	32.02			21.95	25.78	26.87	26.72	25.41
	3	20.3	20.4	17.58	25.31	29.46			20.71	24.45	25.7	25.53	23.82
	4	22.13	22.78	19.09	26.79	32.57	N/A	22.09					
	5	21.07	20.89	18.31	26.87	29.63	24.46	20.03	20.54	24.56	24.62	24.64	23.04
	6	21.57	22.09	18.85	26.98	30.81	25.54	20.27	21.7	25.1	26.66	26.14	24.88
	7	22.5	23.93	19.58	28.04	31.55	26.81	22.54	21.92	25.44	26.55	26.97	25.02
	1 (повт. ОТ*)	21.59	21.91	18.49			25.39	19.96					
	2 (повт. ОТ*)	22.86	23.22	19.22			28.26	22.81					
	3 (повт. ОТ*)	20.92	21.01	17.87			24.23	18.59					
4 (повт. ОТ*)	23	23.5	19.53								26.48		
w[1118] x tubP-Gal4 голова	1	22.16	22.52	19	30.03	34.77			23.93	28.05	27.98	30.97	28.8
	2	21.15	21.7	18.61	26.73	32.64			21.4	25.47	25.17	27.99	25.58
	1 (повт. ОТ*)	22.45	23.02	19.25			27.65	22.65					
	2 (повт. ОТ*)	21.46	22.42	18.75			24.76	20.57					
	3	20.55	21.5	18.4	26.06	30.46	23.97	20.07	20.58	24.66	24.53	26.51	24.71
	4	22.03	22.61	19.62	28.67	30.95	25.68	21.68	21.72	25.74	25.94	27.8	25.89
	5	24.32	25.57	20.73	31.33	32.99	27.79	24	23.92	28.63	27.77	29.6	28.66
	6	24.6	25.7	20.34	28.78	37.26	28.54	24.03	24.88	29.24	27.54	31.5	29.07
7	24.27	27.95	22.28	35.93	N/A			27.79	31.07	28.73	32.5		
8	25.55	28.61	23.11	31.64	N/A			30.98	35.57	29.92	32.79		

rhino x tubP- Gal4 яични ки	1	19.29	20.49	16.98	26.37	24.5			23.05	23.6	26.75	26.93	24.84
	2	19.64	20.4	17.71	26.6	24.42			23.65	23.58	27.19	27.46	25.48
	3	19.18	20.98	16.85	26.69	23.95			22.99	22.82	26.8	26.59	24.58
	4	19.4	20.62	17.17	26.45	25.04			23.39	23.43	26.83	27.4	24.91
	5	20.13	21.54	17.7	26.34	25.52			23.77	24.15	27.57	27.81	25.2
	6	19.55	20.7	17.55	28.75	24.53			24.72	28.11	26.68	29.94	25.55
	7	20.5	21.69	18.5	29.7	25.44	28.88	17.81					
	1 (повт. ОТ*)	20.24	21.62	17.78			27.4	17.62					
	2 (повт. ОТ*)	20.21	21.42	18.15			27.72	17.59					
	3 (повт. ОТ*)	20.39	21.83	17.97			27.13	16.79					
	4 (повт. ОТ*)	20.6	21.74	18.29			27.63	17.3					
	5 (повт. ОТ*)	20.16	21.66	17.57			26.97	16.85					
6 (повт. ОТ*)	19.85	20.92	17.35			29.14	17.06						
7 (повт. ОТ*)	19.98	21.04	18.06								28.03		
8	20	21.37	18.03	28.88	25.03	27.55	17.49	22.99	24.56	26.86	27.34	25.02	
9	20.23	21.64	18	29.02	25.32	27.59	17.46	23.62	24.6	26.8	26.99	24.77	
10	20.22	21.64	17.92	28.8	24.94	28.33	18.08	23.62	24.36	27.31	27.24	25.64	
11	20.52	21.65	18.41	31.87	25.95	28.59	17.73	24.44	25.38	27.53	27.71	25.91	
12	24.83	26.65	21.19	31.04	30.25	32.24	23.77	28.85	29.7	30.57	31.74	29.93	
rhino x tubP- Gal4 корпу с	1	22.02	22.53	19.67	28.9	31.34			24.61	28.93	29.52	29.36	28.49
	2	21.6	21.14	18.59	25.99	31.3			22.86	27.61	26.95	27.16	25.15
	3	23.6	23.04	19.65	27.6	32.76			24.41	29.17	28.73	29	27.17
	4	21.92	21.8	18.65	28.6	32.68			23.58	28.39	N/A	27.82	26.69
	5	22.7	22.67	19.43	28.57	34.58			24.08	30.66	29.56	28.86	26.88
	6	22.05	22.67	18.9	26.92	29.46			24.46	29.82	28.5	29.55	26.92
	7	21.23	21.7	18.8	26.06	31.25	25.04	19.59					
	1 (повт. ОТ*)	22.82	23.59	19.66			28.07	20.74					
	2 (повт. ОТ*)	22.65	22.41	19.42			26.36	19.28					
	3 (повт. ОТ*)	23.51	22.82	19.74			26.78	18.98					
	4 (повт. ОТ*)	22.1	22.12	18.66			25.71	18.72					
	5 (повт. ОТ*)	23.55	23.43	19.68			27.54	20.93					
6 (повт. ОТ*)	21.98	22.77	18.82			26.84	20.11						
7 (повт. ОТ*)	22.02	22.14	19.15								25.4		
8	21.24	21.64	18.49	27.95	29.87	25.11	18.98	21.78	25.88	25.66	26.17	24.2	

	9	21.46	21.67	18.47	28	30.32	25.62	18.84	21.95	26.59	26.5	26.7	24.7
	10	21.97	22.04	18.95	29.4	30.72	25.89	19.7	22.58	27.43	26.67	27.52	25.23
	11	21.66	21.54	18.76	28.54	30.52	25.78	20.3	21.88	26.47	26.41	26.56	24.52
	12	23.78	24.1	20.37	29.61	32.5	28.09	23.32	24.11	29.07	29.2	29.76	27.61
	13	21.69	22.08	17.59	26.88	30.5	26.27	17.76	22.19	25.42	25.09	27.11	25.02
	14	23.3	22.34	19.5	28.54	33.39	27.11	20.05	23.59	28.02	28	28.65	26.75
w[1118] x tubP-Gal4 яичники	1	18.76	19.89	17.36	30.42	24.08			23.77	26.69	26.72	29.53	26.65
	2	19.13	20	17.42	29.55	24.15			24.38	26.77	27.39	29.8	27.4
	3	19.46	19.95	17.46	29.51	23.4			23.36	24.78	25.83	28.5	26.41
	1 (повт. ОТ*)	19.57	20.67	17.8			28.53	20.82					
	2 (повт. ОТ*)	19.5	20.66	17.63			28.33	21.61					
	3 (повт. ОТ*)	19.57	20.59	17.78			28.16	17.62					
	4	21.23	25.13	19.98	30.64	27.78			26.7	29.7	28.97	31.99	
	5	20.77	25.28	20.54	35.12	27.23			26.41	28.39	28.86	32.46	
	6	21.23	24.79	20.1	32.11	27.17			26.44	28.46	29.99	32.1	
7	25.47	27.01	21.51	32.73	29.87	35.2	27.49	28.66	31.83	31.88	34.62	32.18	
w[1118] x tubP-Gal4 корпус	1	20.88	20.97	18.21	28.73	29.53			23.11	27.57	27.54	30.07	27.62
	2	21.03	20.47	18.06	27.56	29.19			22.54	25.92	25.76	28.92	26.45
	1 (повт. ОТ*)	21.3	21.77	18.62			24.17	19.85					
	2 (повт. ОТ*)	21.71	21.64	18.65			24.17	19.57					
	3	21.08	21.91	24.2	31.33	26.4	24.72	20.48	22.77		28.62		27.66
	4	22.78	23.63	19.89	31.79	31.09	26.02	21.58	23.73		29.14		28.86
	5	24.54	25.92	20.99	34.72	35.44	27.36	23.51	25.79		30.59		29.81
	6	23.31	24.4	19.88	31.04	29.98	25.74	21.25	24.62		30.95		28.98
	7	21.64	21.23	18.75	24.82	30.85	23.08	20.23	21.85	25.55	25.56	28.49	26.48
	8	20.64	22.63	19.51	27.73	30.15			22	24.98	25.57	28.44	
	9	20.59	23.06	19.56	30.51	30			22.05	25.47	25.93	29.25	
10	20.7	23.05	19.54	30.85	30.08			22.53	25.59	26.48	28.68		
11	20.6	23.4	19.58	31.08	26.8			22.63	25.99	26.97	29.6		

\*Повт.ОТ – повтор обратной транскрипции данного образца

К рисункам 21,22,23,24

		<i>aTub84 D</i>	<i>Elo B</i>	<i>RpL4 0</i>	<i>blood</i>	<i>copia</i>	<i>gypsy</i>	<i>roo</i>	<i>Het-A</i>	<i>TART-A</i>	<i>TART-B</i>	<i>TART-C</i>
piwi[2] яичники	1	20.44	21.45	17.80	21.07	22.93	24.49	31.30	24.13	25.68	N/A	N/A
	2	20.02	20.81	18.15	22.40	22.67	24.71	31.68	26.10	25.52	N/A	N/A
	3	20.76	21.69	18.15	22.46	23.51	24.87	32.27	26.13	25.07	N/A	N/A
	4	19.62	20.41	17.37	21.99	16.61	22.70	30.60	26.52	24.57	N/A	N/A
	5	19.77	20.7	17.58	18.92	18.83	24.52	30.95	24.8	25.64	N/A	N/A

			7						5			
	6	19.50	21.0 0	17.83	19.27	18.34	23.58	30.87	25.4 0	25.11	N/A	N/A
piwi[2] корпус	1	22.02	21.5 3	18.73	22.53	19.25	22.64	27.94	25.4 0	24.49	N/A	N/A
	2	22.20	21.1 4	18.64	24.39	18.97	22.55	28.39	25.9 1	24.69	N/A	N/A
	3	21.68	21.7 3	18.45	23.64	17.41	19.53	27.63	28.1 2	23.88	N/A	N/A
	4	23.47	20.5 9	18.46	24.45	19.36	23.57	28.25	25.8 5	25.14	N/A	N/A
	5	21.26	21.5 0	18.26	21.16	17.97	21.23	27.49	24.3 7	25.47	N/A	N/A
	6	22.18	21.6 7	18.57	21.87	18.54	21.75	28.07	23.6 7	25.79	N/A	N/A
piwi[2] голова	1	21.57	21.9 3	18.50	21.54	20.47	21.11	25.02	25.7 6	23.30	N/A	N/A
	2	23.57	23.7 1	19.54	23.23	22.61	22.60	28.39	27.2 8	25.56	N/A	N/A
	3	21.77	21.7 4	18.83	21.50	19.72	21.29	25.63	25.2 7	23.21	N/A	N/A
	4	21.78	21.7 4	18.46	21.21	20.13	21.82	26.13	25.3 4	23.95	N/A	N/A
	5	22.19	22.5 6	18.82	21.86	20.81	22.02	26.66	25.3 9	24.39	N/A	N/A
	6	21.78	21.5 2	18.58	20.95	19.48	21.07	24.56	24.6 4	22.44	N/A	N/A
	7	21.65	21.3 1	18.77	21.48	20.33	22.30	26.39	25.3 0	23.50	N/A	N/A
	8	23.09	22.5 0	19.06	21.73	20.26	21.71	26.70	25.8 0	24.95	N/A	N/A
piwi[2]Xpiwi[3] яичники	1	24.48	25.0 8	21.61	25.58	24.63	27.69	30.00	32.9 0	29.17	34.56	31.96
	2	23.61	24.8 0	20.51	24.99	22.89	26.64	30.10	31.9 9	28.48	30.76	29.95
	3	24.16	23.7 8	20.81	25.87	24.64	26.85	31.90	34.6 6	29.04	35.11	31.29
	4	22.89	24.5 9	20.61	24.60	23.32	24.99	29.09	32.6 4	28.29	30.74	26.67
	5	22.09	24.5 2	20.56	23.93	22.16	23.89	29.05	31.0 8	27.37	29.61	26.29
	6	25.24	24.0 9	19.76	23.55	22.25	23.86	28.19	31.7 7	27.49	30.4	29.14
	7	22.30	23.0 7	18.94	22.82	21.02	22.98	27.99	29.4	27.33	29.06	28.15
piwi[2]Xpiwi[3] корпус	1	22.89	22.8 5	18.89	22.37	21.41	22.00	28.02	26.9 8	27.04	30.28	29.16
	2	22.65	24.0 0	19.23	21.90	21.29	22.82	28.11	26.7 4	27.70	30.75	29.75
	3	21.50	21.7 3	18.39	20.89	19.75	20.78	25.44	26.9 5	26.48	29.07	27.91
	4	22.80	22.8 2	19.49	22.39	20.80	22.70	27.76	25.8 2	27.83	29.17	28.75
	5	23.26	23.3 8	19.63	22.80	21.84	23.18	28.75	24.4 2	29.76	31.02	30.07
	6	23.31	22.8 6	19.46	22.07	21.46	22.84	28.33	25.2 5	27.72	30.73	29.45
piwi[2]Xpiwi[3] голова	1	22.71	23.4 8	18.93	21.84	20.88	19.86	27.45	24.6 8	26.10	28.65	27.62
	2	21.82	22.3 9	18.64	20.90	20.64	19.79	26.80	24.5 0	26.49	28.28	27.05
	3	22.61	23.1 4	19.30	22.80	22.56	20.69	28.71	28.5 5	27.83	29.63	28.68
	4	21.84	22.3 7	18.59	20.98	20.66	19.14	25.99	26.0 1	25.78	28.49	26.44
	5	22.58	23.2 3	19.34	21.86	21.69	20.74	31.15	27.4 7	25.74	27.88	29.46
	6	21.57	22.5 6	18.79	21.61	21.50	19.28	30.90	25.9 0	25.60	27.88	28.66
	7	22.09	22.3	18.57	21.98	21.55	21.56	26.76	25.4 1	26.61	29.26	27.86
	8	21.56	21.3 5	18.02	21.4	20.8	20.77	25.71	24.6 2	25.32	28.55	26.72
piwi[3] яичники	1	21.45	22.7 3	18.84	19.85	23.29	23.28	31.79	26.4 6	26.55	28.69	27.02

	2	20.47	21.9 7	18.28	20.73	22.03	23.41	31.58	26.4 1	25.91	28.56	26.65
	3	21.17	21.1 5	17.88	23.52	20.64	22.63	30.68	24.3 7	25.11	27.74	26.15
	4	20.15	20.8 6	18.04	23.40	21.18	23.12	31.75	24.1 2	25.74	28.13	26.61
	5	21.53	23.1 3	19.30	24.64	23.17	25.59	32.98	29.3 1	28.63	31.03	28.92
	6	21.37	23.0 3	18.98	25.16	23.43	24.55	31.75	31.8 7	28.56	29.86	28.78
piwi[3] корпус	1	22.61	23.5 5	19.75	24.41	20.30	24.69	28.72	24.4 9	26.51	29.08	27.56
	2	22.91	22.7 3	19.60	25.18	19.64	24.56	26.14	25.7 9	25.86	29.76	28.14
	3	21.72	22.3 1	19.02	22.75	18.33	23.96	26.84	25.1 4	25.26	29.02	26.71
	4	21.53	22.4 5	18.37	23.51	17.87	23.46	25.78	25.5 7	24.66	28.49	26.42
	5	23.05	24.3 0	19.90	20.80	20.91	21.52	28.16	27.1 4	27.54	30.45	29.01
	6	22.01	22.8 0	18.91	18.94	19.15	22.11	26.29	25.9 8	26.12	28.76	27.11
piwi[3] голова	1	21.56	21.5 5	18.13	18.17	19.36	21.22	25.00	25.8 0	22.69	24.88	26.38
	2	21.67	21.1 4	18.27	17.84	18.93	20.82	24.91	25.7 0	22.57	25.27	26.14
	3	21.25	21.7 1	18.55	18.52	19.24	21.25	25.43	26.8 1	23.16	25.49	26.57
	4	22.76	24.0 1	18.94	19.48	19.52	22.60	26.92	28.7 1	24.53	26.08	27.44
	5	21.28	21.4 7	18.49	17.72	18.77	21.94	25.72	25.8 9	23.76	25.59	26.99
	6	21.08	22.3 8	18.56	18.50	19.53	21.52	26.37	24.7 9	24.64	27.14	25.40
	7	21.94	22.9 5	18.83	18.80	19.70	22.11	27.97	25.3 0	24.53	27.55	26.16
piwi[3]×piwi[2] яичники	1	23.04	24.2 7	20.10	23.52	22.55	25.08	30.09	31.7 2	27.59	29.69	28.66
	2	22.93	23.4 0	19.63	21.75	21.20	24.40	28.36	32.0 6	26.87	30.73	29.36
	3	25.21	24.6 3	20.84	25.50	24.21	27.81	31.43	33.3 0	29.72	34.89	31.24
	4	23.65	24.1 5	20.41	24.21	22.59	25.07	31.12	31.6 3	28.44	31.55	30.55
	5	21.83	23.5 8	20.01	22.70	21.15	23.08	31.16	30.4 7	26.68	28.7	27.54
	6	21.90	22.5	18.85	22.41	21.6	22.7	27.8	30.3 3	27.01	29.5	28.63
piwi[3]×piwi[2] корпус	1	22.87	22.8 4	19.18	22.62	21.18	22.93	27.75	26.5 5	27.34	30.27	29.00
	2	22.46	22.2 6	18.95	22.52	20.47	21.97	27.74	26.0 2	27.22	30.10	28.44
	3	23.22	23.3 2	19.73	23.22	21.94	24.28	28.42	26.0 0	28.73	31.78	29.95
	4	23.10	23.6 0	19.52	23.14	21.51	23.61	28.91	25.5 5	28.15	31.47	29.95
	5	22.43	22.3 2	18.76	21.78	20.45	21.56	27.46	26.0 4	27.02	30.16	28.58
	6	23.80	21.8 3	18.64	21.96	20.54	22.94	27.53	25.5 2	26.65	30.20	28.32
piwi[3]×piwi[2] голова	1	22.83	23.5 9	19.44	22.58	21.67	20.74	28.12	27.0 5	27.00	29.60	28.17
	2	22.27	22.7 4	18.96	21.54	21.27	20.75	26.63	26.4 5	25.95	28.83	27.48
	3	22.18	22.6 9	19.25	20.45	20.52	19.58	26.01	27.3 6	24.68	27.85	26.75
	4	22.62	22.7 8	18.62	21.33	21.67	20.70	27.70	27.9 6	26.20	29.05	27.81
	5	22.45	22.4 0	18.87	21.54	20.72	20.56	27.98	28.5 3	26.19	28.68	26.87
	6	23.42	24.5 1	19.94	22.90	23.26	22.50	30.18	28.7 4	27.53	29.43	27.26
	7	21.78	21.5 9	18.37	21.45	20.71	20.63	25.7	24.7 7	24.53	28.19	26.4
		<i>aTub84 D</i>	<i>Elo B</i>	<i>RpL4 O</i>	<i>flam_s p</i>	<i>flam_un sp</i>	<i>42AB_s p</i>	<i>42AB_un sp</i>	<i>38C I</i>	<i>38C 2</i>	<i>20A</i>	

pīwi[2] яичники	1	20.44	21.4 5	17.80	28.87	29.21	29.58	27.5	28.7 9	31.56	25.8
	2	20.02	20.8 1	18.15	29.59	30.61	30.66	28.11	29.0 2	31.82	25.84
	3	20.76	21.6 9	18.15	29.67	30.36	30	27.55	29.5 5	31.62	26.1
	4	19.62	20.4 1	17.37	28.52	29.1	27.62	27.52	28.4 9	31.05	24.94
	5	19.77	20.7 7	17.58	28.88	29.68	27.72	27.83	28.0 5	31.1	25.26
	6	19.50	21.0 0	17.83	28.58	29.19	27.58	27.89	29.0 6	29.1	24.78
pīwi[2] корпус	1	22.02	21.5 3	18.73	N/A	N/A	26.78	28.84	33.0 5	35.23	26.31
	2	22.20	21.1 4	18.64	N/A	N/A	26.43	28.72	32.3	32.39	26.56
	3	21.68	21.7 3	18.45	N/A	N/A	25.52	27.85	32.6 1	32.05	26.81
	4	23.47	20.5 9	18.46	N/A	N/A	27.19	29.68	36.0 2	32.72	27.36
	5	21.26	21.5 0	18.26	N/A	N/A	26.73	28.21	30.5 3	31.86	26.64
	6	22.18	21.6 7	18.57	N/A	N/A	26.75	29.08	31.9 4	32.89	27.42
pīwi[2] голова	1	21.57	21.9 3	18.50	N/A	N/A	26.68	28.38	30.6 8	31.66	26.45
	2	23.57	23.7 1	19.54	N/A	N/A	28.6	29.52	32.4 5	33.16	27.59
	3	21.77	21.7 4	18.83	N/A	N/A	26.72	28.49	30.5 6	31.55	26.75
	4	21.78	21.7 4	18.46	N/A	N/A	26.93	28.41	31.1 9	31.3	26.93
	5	22.19	22.5 6	18.82	N/A	N/A	27.45	28.81	31.0 2	31.87	27.24
	6	21.78	21.5 2	18.58	N/A	N/A	26.63	28.04	29.9 8	30.99	26.45
	7	21.65	21.3 1	18.77	N/A	N/A	27.14	28.89	30.5	30.94	26.66
	8	23.09	22.5 0	19.06	N/A	N/A	27.18	28.45	30.8 9	33.74	26.94
pīwi[2]×pīwi[3] яичники	1	24.48	25.0 8	21.61	39	36.19	29.46	30.77	37.9 1	37.76	30.22
	2	23.61	24.8 0	20.51	35.09	37.23	28.6	30.55	35.0 6	32.89	29.95
	3	24.16	23.7 8	20.81	39	37.45	29.47	31.69	35.8 3	37.62	30.37
	4	22.89	24.5 9	20.61	36.57	37.44	29.63	31.15	32.4 4	32.44	27.91
	5	22.09	24.5 2	20.56	34.7	35.68	29.27	30.58	31.5 3	30.66	27.72
	6	25.24	24.0 9	19.76	35.17	35.4	28.89	31.27	31.8 1	31.72	28.19
	7	22.30	23.0 7	18.94	34.92	34.55	27.64	29.54	32.5 5	32.06	27.56
pīwi[2]×pīwi[3] корпус	1	22.89	22.8 5	18.89	N/A	N/A	27.38	29.68	32.8	32.6	27.56
	2	22.65	24.0 0	19.23	N/A	N/A	27.96	29.79	32.5 7	34.7	27.85
	3	21.50	21.7 3	18.39	N/A	N/A	26.67	29.1	32.6	31.8	26.86
	4	22.80	22.8 2	19.49	N/A	N/A	27.69	29.62	31.9 4	32.88	27.78
	5	23.26	23.3 8	19.63	N/A	N/A	27.99	30.02	33.0 6	33.29	28.12
	6	23.31	22.8 6	19.46	N/A	N/A	27.49	29.72	32.9 8	32.4	27.51
pīwi[2]×pīwi[3] голова	1	22.71	23.4 8	18.93	N/A	N/A	27.02	28.82	30.6 5	31.2	26.75
	2	21.82	22.3 9	18.64	N/A	N/A	26.64	28.71	32.1 4	31.34	26.44
	3	22.61	23.1 4	19.30	N/A	N/A	27.67	29.9	33.1 6	32.83	27.5
	4	21.84	22.3 7	18.59	N/A	N/A	26.79	28.67	30.5 3	30.96	25.99
	5	22.58	23.2 3	19.34	N/A	N/A	27.73	30.62	30.5 2	31.89	26.15

	6	21.57	22.5 6	18.79	N/A	N/A	27.49	30.12	31.7 9	34.72	25.64
	7	22.09	22.3	18.57	N/A	N/A	27.76	29.91	33.2 3	31.89	26.66
	8	21.56	21.3 5	18.02	N/A	N/A	27.55	28.94	30.8	31.79	26.11
piwi[3] яичники	1	21.45	22.7 3	18.84	30.97	31.03	31.93	29.49	29.8 1	32.39	26.01
	2	20.47	21.9 7	18.28	29.99	29.74	30.78	28.7	29.5 2	31.91	25.54
	3	21.17	21.1 5	17.88	29.64	28.99	28.65	28.5	28.8 9	31.65	25.52
	4	20.15	20.8 6	18.04	29.51	29.15	29.71	28.51	29.5 9	29.28	25.63
	5	21.53	23.1 3	19.30	31.62	32.67	31.07	29.53	31.1 5	32.54	27.72
	6	21.37	23.0 3	18.98	31.1	32.66	31.45	29.39	31.3 9	32.23	27.62
piwi[3] корпус	1	22.61	23.5 5	19.75	N/A	N/A	30.57	30.65	32.0 9	33.2	26.84
	2	22.91	22.7 3	19.60	N/A	N/A	29.78	32.63	33.1 8	35.41	26.66
	3	21.72	22.3 1	19.02	N/A	N/A	28.56	31.98	32.5 7	32.96	25.66
	4	21.53	22.4 5	18.37	N/A	N/A	27.03	30.57	31.7 6	N/A	25.58
	5	23.05	24.3 0	19.90	N/A	N/A	29.86	31.17	33.1	37.49	27.7
	6	22.01	22.8 0	18.91	N/A	N/A	28.68	29.64	32.6	34.92	26.57
piwi[3] голова	1	21.56	21.5 5	18.13	N/A	N/A	28.66	30.62	30.7 1	32.15	25.57
	2	21.67	21.1 4	18.27	N/A	N/A	28.27	31.06	29.9 7	31.13	25.19
	3	21.25	21.7 1	18.55	N/A	N/A	28.59	30.5	30.9 4	31.53	25.67
	4	22.76	24.0 1	18.94	N/A	N/A	29.75	31	32.3 4	32.63	26.05
	5	21.28	21.4 7	18.49	N/A	N/A	28.5	30.68	30.6 9	31.9	25.32
	6	21.08	22.3 8	18.56	N/A	N/A	27.64	29.11	31.4 3	31.61	26.03
	7	21.94	22.9 5	18.83	N/A	N/A	28.51	30.21	31.8 6	33.65	26.63
piwi[3]×piwi[2] яичники	1	23.04	24.2 7	20.10	33.42	33.41	28.48	29.51	32.9	34.67	28.71
	2	22.93	23.4 0	19.63	32.8	32.84	28.88	30.4	32.6 9	35.09	28.11
	3	25.21	24.6 3	20.84	38.08	35	29.92	30.9	37.8 6	N/A	29.41
	4	23.65	24.1 5	20.41	37.04	37.67	28.85	30.53	36.1 3	35.23	29.5
	5	21.83	23.5 8	20.01	34.86	35.67	28.18	29.8	32.0 6	30.57	26.69
	6	21.90	22.5	18.85	31.69	32.52	27.61	29.46	31.6 4	31.59	27.04
piwi[3]×piwi[2] корпус	1	22.87	22.8 4	19.18	N/A	N/A	27.79	29.63	34.5 8	35.07	27.11
	2	22.46	22.2 6	18.95	N/A	N/A	27.19	29.66	32.8 9	33.32	27.52
	3	23.22	23.3 2	19.73	N/A	N/A	29.82	30.92	35.3 3	34.82	27.77
	4	23.10	23.6 0	19.52	N/A	N/A	28.45	31.2	34.8 5	35	27.39
	5	22.43	22.3 2	18.76	N/A	N/A	27.83	29.56	32.9	32.49	26.71
	6	23.80	21.8 3	18.64	N/A	N/A	27.11	29.93	32.6 5	32.4	27.37
piwi[3]×piwi[2] голова	1	22.83	23.5 9	19.44	N/A	N/A	28.45	29.72	31.2 9	32.7	27.23
	2	22.27	22.7 4	18.96	N/A	N/A	27.84	29.54	32.4 2	30.83	27.13
	3	22.18	22.6 9	19.25	N/A	N/A	27.79	29.44	31.4 3	31	26.74
	4	22.62	22.7 8	18.62	N/A	N/A	27.79	29.44	32.1 2	32.14	26.92

5	22.45	22.4 0	18.87	N/A	N/A	27.01	29.01	31.5 4	34.51	26.73
6	23.42	24.5 1	19.94	N/A	N/A	28.3	30.42	31.5 3	32.24	27.33
7	21.78	21.5 9	18.37	N/A	N/A	26.92	29	31.4 9	31.71	26.15

### К рисунку 27

		<i>αTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>Cyp9b2</i>	<i>Cyp9b1</i>
SS нормальный корм	1	19.21	20.96	17.57	22.85	25.67
	2	19.59	21.61	17.63	22.79	25.89
	3	19.59	21.76	18.01	23.15	26.1
	4	19.82	21.65	17.95	23.68	26.12
Д32 нормальный корм	1	19.55	20.72	17.75	23.82	25.1
	2	19.56	21.01	17.96	23.7	26.71
	3	19.71	21.29	18.02	24	25.79
	4	19.22	20.87	17.79	23.82	26.02
SSxД32 F1 нормальный корм	1	18.78	20.65	16.96	22.96	25.57
	2	18.93	20.84	17.05	23.01	25.58
	3	18.97	21.01	17.14	23.53	25.59
	4	19.11	21.16	17.34	23.54	25.75
	5	18.94	21.74	17	23.15	25.66
	6	18.86	20.8	16.81	22.98	25.74
Д32xSS F1 нормальный корм	1	18.97	21.2	17.53	23.66	25.99
	2	19.41	21.39	17.6	23.76	26.24
	3	18.8	21.09	17.1	23.63	25.64
	4	18.75	20.98	17.06	22.92	25.82
	5	18.84	21.12	17.24	23.31	25.74
	6	18.88	21.32	17.35	23.53	25.96
SSxД32 F2 нормальный корм	1	19.42	21.44	17.81	24.34	26.52
	2	18.84	21	17.51	23.59	25.78
	3	19.34	21.02	17.56	23.3	25.85
	4	19.27	21.13	17.61	23.97	26.13
Д32xSS F2 нормальный корм	1	19.79	25.87	17.78	23.87	26.52
	2	20.63	21.51	17.9	24.05	26.63
	3	20.51	22.7	18.59	24.89	27.87
	4	19.91	21.7	18.14	24.59	26.95
SS корм с борной кислотой	1	20.61	22.32	18.02	22.78	24.6
	2	20.31	22.18	18.06	22.59	24.8
	3	20.35	22.14	17.85	22.74	24.69
	4	20.44	22.35	17.92	22.31	24.75
	5	20.65	22.63	18.19	22.89	25.25
	6	20.01	21.79	17.77	21.98	24.03
	7	20.50	22.49	18.13	23.07	25.59
Д32 корм с борной кислотой	1	20.68	22.61	18.23	22.88	23.59
	2	20.33	21.92	17.99	22.70	22.77

	3	20.16	21.79	17.88	22.47	22.88
	4	20.10	21.71	17.79	22.14	22.62
	5	19.95	20.97	17.57	22.15	22.57
	6	20.67	21.84	18.36	22.97	23.23
	7	20.51	21.55	17.93	22.62	22.91
SSxД32 F1 корм с борной кислотой	1	19.24	21.6	17.46	21.05	24.08
	2	18.66	20.86	17.46	20.4	22.95
	3	18.57	20.76	17.03	20.6	23.51
	4	18.69	20.85	17.11	20.65	23.29
	5	19.27	21.51	17.46	21.06	24.11
	6	19.74	20.85	17.06	20.59	23.62
Д32xSS F1 корм с борной кислотой	1	18.92	20.88	17.12	20.32	23.5
	2	18.98	21.08	17.32	20.6	24.19
	3	18.86	20.91	17.01	19.92	23.31
	4	20.25	24.09	18.6	21.6	24.31
	5	18.86	20.68	17.16	20.6	23.16
	6	18.91	20.75	17.07	20.47	23.49
SSxД32 F2 корм с борной кислотой	1	19.93	21.18	17.65	21.04	23.68
	2	21.18	21.81	18.89	22.19	24.85
	3	20.56	21.87	18.32	21.70	24.57
	4	20.41	21.91	18.07	21.67	23.75
	5	20.74	21.73	18.56	22.29	23.87
	6	20.48	21.59	18.12	22.13	23.53
	7	22.49	23.85	19.80	24.11	26.63
Д32xSS F2 корм с борной кислотой	1	21.29	22.61	18.85	22.06	25.39
	2	21.25	21.89	18.65	21.73	24.56
	3	20.73	21.86	18.42	21.89	24.39
	4	21.52	22.47	18.72	21.80	24.85
	5	20.73	22.08	18.54	22.07	24.59
	6	21.29	22.07	18.58	21.84	24.61
	7	21.37	21.67	18.50	21.13	24.49

### К рисункам 28, 29

		<i>aTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>gypsy</i>	<i>Tirant</i>	<i>springer</i>	<i>copia</i>	<i>upd3</i>	<i>hsp22</i>	<i>Sid</i>
SS стандартный корм	1	22.32	24.94	19.56	32.49	27.48	28.09	22.51	30.53	29.75	32.64
	2	21.35	23.66	18.69	31.68	27.51	27.49	22.58	29.51	28.31	31.85
	3	21.78	24.55	19.83	32.73	28.34	27.93	22.67	31.26	29.01	34.72
	4	21.61	23.94	19.08	32.59	26.95	27.87	21.91	30.97	28.63	32.46
	5	22.37	25.26	19.73	32.52	28.51	28.29	22.85	31.3	29.69	35.19
	6	22.11	24.31	19.25	32.97	27.45	27.77	22.01	30.63	28.61	N/A
SS корм с 0.1M АПС	1	20.23	22.52	18.21	28.38	25.09	25.7	18.97	26.01	25.56	27.87
	2	20.61	22.9	18	28.92	24.93	25.78	19.63	25.42	25.55	27.67
	3	20.08	22.32	17.79	28.25	24.89	25.75	19.21	26.21	25.85	28.03

	4	20.2	22.48	17.88	28.47	25.47	25.77	19.35	25.6	25.78	27.68
	5	20.72	22.55	17.89	28.64	25.13	25.44	19.7	25.73	38.18	27.78
SS 24 ч на нормальном корме после стресса	1	20.99	22.54	18.64	28.2	25.55	25.48	20.14			
	2	20.59	21.93	18.45	28.61	24.46	26.04	20.53			
	3	21.02	22.63	18.55	28.61	25.67	26.83	20.59			
	4	20.58	22.13	18.47	28.05	24.63	26.76	25.1			
	5	20.61	22.11	18.56	27.97	24.94	26.58	20.04			
SS 48 ч на нормальном корме после стресса	1	20.97	22.63	17.93	29.03	25.78	26.61	20.63			
	2	20.96	22.53	18.17	28.96	26.13	27.1	20.81			
	3	20.9	22.66	18.28	29.44	25.52	26.13	19.9			
	4	21.19	23	18.75	31.68	26.06	26.81	21.4			
	5	21.35	23.27	18.77	31.61	26.78	26.78	20.51			
	6	21.12	22.95	18.68	31.59	25.59	27.15	20.31			
Canton-S стандартный корм	1	21.16	22.88	18.58	30.88	26.17	26.76	20.47	30.52	28.28	29.63
	2	21.08	22.8	18.13	31.36	26.17	26.55	19.69	28.84	27.85	30.87
	3	21.17	22.66	18.19	31.33	26.26	26.23	19.8	30.15	27.8	27.87
	4	21.75	23.44	18.84	31.46	25.78	26.87	20.09	28.36	28.6	29.8
	5	21.81	23.68	18.77	31.77	26.82	27.12	20.99	30.51	28.65	29.83
	6	21.32	22.99	18.38	31.23	26.46	26.68	20.34	29.76	28.42	28.82
CantonS корм с 0.1M АПС	1	19.58	22.57	18.48	30.68	24.5	24.91	17.97	22.55	23.52	23.33
	2	19.01	22.27	17.93	28.67	23.56	24.78	17.04	22.57	25.27	27.97
	3	19.79	22.49	18.07	28.31	24.17	24.57	18.08	23.01	24.05	23.84
	4	19.53	22.49	17.73	28.38	24.57	24.66	17.6	23.48	23.92	24.51
	5	20.09	22.47	18.34	28.35	24.68	25.32	17.63	24.22	25.93	24.73
	6	19.76	22.47	17.95	29.64	25.28	23.73	17.19	24.12	25.53	24.68
Canoton-S 24 ч на нормальном корме после стресса	1	20.72	22.48	19.03	28.61	25	26.49	20.22			
	2	20.69	22.32	18.91	28.5	24.91	26.6	20.43			
	3	21.22	24.76	19.4	29.55	25.28	26.48	19.69			
	4	20.64	22.19	18.87	27.97	25.07	25.78	19.06			
	5	21.37	22.56	17.62	28.44	25.01	25.75	19.18			
Canton-S 48 ч на нормальном корме после стресса	1	20.98	23.74	18.59	33.13	24.29	25.49	19.51			
	2	21.86	23.66	19.69	32.3	25.62	26.94	20.66			
	3	21.5	23.25	18.88	31.58	24.44	26.11	19.92			

### К рисункам 30,32

		<i>αTub84</i> <i>D</i>	<i>Elo</i> <i>B</i>	<i>RpL4</i> <i>0</i>	<i>upd</i> <i>3</i>	<i>hsp2</i> <i>2</i>	<i>Sid</i>	<i>flam_un</i> <i>sp</i>	<i>42AB_</i> <i>sp</i>	<i>42AB_un</i> <i>sp</i>	<i>20A</i>	<i>38C</i> <i>1</i>	<i>38C</i> <i>2</i>
Canton-S стандартный корм	1	20	21.4 8	18.0 7	27.9 8	27.4 9	27.9 5	29.75	29.28	28.6	24.7 7	29.5 1	29.9 1
	2	19.48	21.0 7	17.5	27.8	26.5 3	26.9 1	29.69	29.64	29.34	24.7 6	28.8 4	30.1 9
	3	20.54	22.2 9	18.0 9	27.6 8	27.0 6	28.8	30.58	30.62	29.98	26.4 6	30.4 4	31.9 6
	4	19.9	21.5 9	17.8	27.8 3	26.6 6	28.1 7	30.47	29.83	28.8	25.0 9	29.4 6	30.6 7
	5	19.65	21.1 7	17.7 1	27.5 4	26.1 2	27.4 4	29.2	28.9	28.52	24.7	29.2 2	29.9 6
	6	19	20.4 7	16.9 6	25.7 3	25.0 8	26.6 5	26.15	27.21	27.68	23.9 3	28.0 2	30

	7	19.68	20.7 6	17.4 9	28.0 9	25.8 3	27.5 5	26.5	27.64	28.44	24.5 4	27.7 3	29.7 1
Canton-S корм с 0.1M АПС	1	19.56	20.9 8	18.1 6	23.1 3	24.7 6	24.5	28.12	27.87	28.62	25.1 4	29.7 1	30.3 8
	2	19.61	21	18.2 3	23.7 3	25.5 8	24.8	28.85	27.83	28.81	25.7 9	30.1 1	31.4 3
	3	20.28	21.6 9	18.6 8	24.7 8	25.4 6	25.5 5	29.05	28.57	28.91	26	30.7 4	31.7 6
	4	19.64	21.5 9	18.2 5	23.0 3	25.1 8	25.0 6	27.85	28.51	28.82	26.0 1	30.6 6	31.0 9
	5	19.53	21.3 4	18.8 3	24.0 5	24.5 6	25.5 6	27.71	27.55	28.52	26.1	30.5 4	31.7 5
	6	19.61	21.1 1	18.5	24.2 6	24.6 7	25.9 8	28	27.85	28.65	25.6 1	30.0 1	31.4 6
	7	21.2	22.7 3	18.7 7	23.7 4	26.8 3	26.9 4	30.35	29.65	29.55	26.2 5	33.0 2	30.7 7
Canton-S 48 часов на стандартном корме после стресса	1	20.05	21.3 6	18.0 9	26.8	25.1 1	26.2 3	27.18	27.9	27.76	24.4 5	31.0 1	30.4 8
	2	20.67	21.9 1	18.5 9	26.5 4	25.8 8	28.5 9	27.74	28.42	28.49	24.6 6	29.9 3	31.3
	3	20.25	21.5	17.9 2	25.8 8	25.0 2	26.6 2	27.48	27.56	27.89	24.5 4	29.5 1	30.6 5
	4	20.44	21.7 3	18.4 4	27.7 7	26.6 2	27.7 5	28.4	28.5	28.53	24.7 5	29.5 6	30.9 7
	5	19.79	21.3 1	17.6 7	26.6 5	26.2 9	27.6 6	28.7	28.75	28.6	24.9 6	29.4 9	30.4 5
	6	19.63	20.5 8	17.5 9	26.3 2	25.9 7	27.4 3	27.64	28.38	28.42	24.6 3	28.5 9	30.5 9
	7	20.66	22.0 9	18.2 4	28.1 1	30.0 1	28.8 9	29.02	28.7	28.71	25.7 7	32.1 4	31.0 4

### К рисунку 31

		<i>αTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>copia</i>	<i>gypsy</i>	<i>Tirant</i>	<i>springer</i>
SS 25°C	1	22.32	24.94	19.56	22.51	32.49	27.48	28.09
	2	21.35	23.66	18.69	22.58	31.68	27.51	27.49
	3	21.78	24.55	19.83	22.67	32.73	28.34	27.93
	4	21.61	23.94	19.08	21.91	32.59	26.95	27.87
	5	22.37	25.26	19.73	22.85	32.52	28.51	28.29
	6	22.11	24.31	19.25	22.01	32.97	27.45	27.77
SS 29°C	1	19.76	21.58	17.37	19.62	29.57	22.81	25.82
	2	19.51	20.91	17.31	19.3	29.7	21.96	25.68
	3	19.79	21.57	17.6	19.43	30.01	23.13	25.8
	4	19.5	21.39	17.11	19.34	29.82	23.09	25.61
	5	20.26	22.07	17.77	22.4	30.64	23.52	26.65
	6	19.67	21.37	17.06	19.67	29.32	22.55	25.5
SS 24 ч 25°C после 29°C	1	19.94	22.32	17.91	20.63	29.95	23.89	26.2
	2	20.15	22.11	17.67	20.44	29.65	23.88	26.13
	3	19.75	21.79	17.32	19.68	29.24	23.06	25.71
	4	20	21.86	17.61	19.91	29.52	23.42	25.56
	5	19.6	21.4	17.25	19.56	29.6	23.48	25.55
Canton-S 25°C	1	21.16	22.88	18.58	20.47	30.88	26.17	26.76
	2	21.08	22.8	18.13	19.69	31.36	26.17	26.55
	3	21.17	22.66	18.19	19.8	31.33	26.26	26.23
	4	21.75	23.44	18.84	20.09	31.46	25.78	26.87
	5	21.81	23.68	18.77	20.99	31.77	26.82	27.12
	6	21.32	22.99	18.38	20.34	31.23	26.46	26.68

Canton-S 29°C	1	19.46	21.04	17.19	18.13	29.41	22.04	25.57
	2	19.54	21.48	17.69	17.72	30.31	21.31	26.18
	3	19.56	21.66	17.4	19.24	30.28	22.2	25.77
	4	19.14	21.09	16.92	17.92	29.75	20.95	25.76
	5	19.43	21.24	17.29	17.78	28.57	22.43	25.88
	6	19.47	21.44	17.11	18.83	29.66	21.35	24.97
Canton-S 24 ч 25°C после 29°C	1	19.48	21.47	17.75	17.97	29.2	20.86	25.09
	2	19.66	21.46	17.68	18.88	29.92	21.21	25.89
	3	19.56	21.51	18.14	18.52	29.56	21.3	25.62
	4	19.41	21.05	17.01	16.88	29.07	21.3	25.58
	5	19.67	21.59	17.08	17.84	29.42	22.73	25.76
	6	19.65	21.55	17.42	18.08	28.61	20.84	25.6

### К рисунку 33

		<i>αTub84D</i>	<i>EloB</i>	<i>RpL40</i>	<i>Nuak</i>	<i>cactus</i>	<i>Tirant</i> в <i>NuaK</i>	<i>Tirant</i> в <i>cactus</i>	<i>Tirant</i> (общий)
SS 25°C	1	19.78	20.56	17.34	24.69	20.73	32.72	20.98	24.44
	2	19.71	20.21	17.53	24.74	20.58	32.49	20.91	23.14
	3	20	20.99	17.58	25.19	20.93	32.59	20.99	24.2
	4	19.94	20.65	17.32	25.5	20.87	33	20.95	25.05
	5	19.64	21.42	17.77	25.38	20.94	34.54	20.96	24.61
	6	19.75	20.84	17.74	25.44	20.88	32.56	20.89	23.84
SS 29°C	1	20.52	21.33	18.03	25.54	21.69	32.71	20.93	23.93
	2	20.2	21.28	17.61	25.08	21.68	31.65	20.97	22.38
	3	20.33	20.99	17.45	25.03	21.44	31.99	20.93	22.73
	4	20.94	22.21	17.67	25.67	21.85	32.96	20.93	23.82
	5	20.97	21.76	18.04	25.21	22.25	33.17	20.94	23.61
	6	20.79	21.72	17.79	25.5	21.61	32.9	20.86	23.02
	7	21.14	21.71	18.65	25.62	21.76	34.57	25.13	24.53
	8	20.89	21.36	17.62	25.99	21.91	32.61	25.31	24.33

**Приложение 2. Позиции инсерций ДКП-ретротранспозонов в референсном геноме и геномах линий SS, Canton-S и Д32, паттерн экспрессии генов, содержащих инсерции согласно базе данных FlyBase**

Положение ретротранспозона	Экспрессия	Линии
----------------------------	------------	-------

Положение в геноме (инсерция в интроне гена, если не указано иное)	Коллинеарно направлению транскрипции	Окислительный стресс	Тепловой шок	Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки	SS	Canton-S
<b>scp1a</b>									
<i>CG3726</i>	Нет	средняя		средняя				+	+
<i>toc</i>	Нет	выше среднего	средняя	средняя	средняя	средняя	средняя	+	+
<i>for</i>	Нет	выше среднего	выше среднего	высокая	выше среднего	средняя		+	+
<i>Ir40a</i>	Да							+	+
<i>CadN2</i>	Да							+	+
после <i>CG4462</i> 3 (500 н).	Нет								
<i>mbl</i>	Нет					средняя	средняя	+	+
<i>Nipped-A</i>	Нет			средняя			средняя	+	+
<i>sallimus</i>	Да			н.д.	н.д.	н.д.	н.д.		
<i>bbg</i>	Нет						средняя	+	+
<i>Snap25</i>	Нет	средняя			средняя	очень высокая	средняя	+	+
<i>Lasp, CG4395 4</i>	Нет	высокая, высокая	высокая, в ысокая	очень высокая, очень высокая	выше среднего, выше среднего	средняя , средняя	выше среднег о, выше среднег о	+	+
<i>Eip63E</i>	Да	средняя		средняя			средняя	+	+
<i>Myo81F</i>	Нет								
<i>beat-Vb</i>	Нет								
<i>CG3434 7</i>	Да						средняя	+	+
<i>Gprk2</i>	Нет	средняя	средняя	средняя		средняя	выше среднег о	+	+
<b>roo</b>									
<i>CenG1 A</i>	Нет	средняя		средняя		средняя	выше среднег о	+	+
<i>Acox3</i>	Нет	средняя	выше среднего						
<i>dpr2</i>	Нет								
<i>osp</i>	Да	средняя		средняя	средняя	средняя	средняя	+	+

<i>rdo</i>	Нет								
<i>CG2528</i>	Да								
<i>ds</i>	Да								
<i>Agpat2</i>	Нет	средняя	средняя	выше среднего				+	+
<i>Lar</i>	Да					средняя	средняя	+	+
<i>Acox3</i>	Нет	средняя	выше среднего					+	+
<i>Wnt6</i>	Да								
<i>Trissin R</i>	Нет								
<i>dpr3</i>	Да	средняя				выше среднего	средняя	+	+
<i>CG13954</i>	Да								
<i>KCNQ</i>	Да								
<i>CG42663</i>	Да						средняя	+	+
<i>sca</i>	Нет						средняя	+	+
<i>Prosap</i>	Да	средняя		выше среднего		средняя	средняя	+	+
<i>bs</i>	Да			средняя				+	+
<i>pk</i>	Нет						средняя	+	+
<i>GEFmeso</i>	Нет								
<i>MFS17</i>	Нет								
<i>luna</i>	Да								
<i>CG43867</i>	Нет				очень высокая	средняя	выше среднего	+	+
<i>CR44779</i>	Да								
<i>AstA-R1</i>	Да								
<i>rdgA</i>	Да	средняя			средняя	высокая	средняя	+	+
<i>pdgy</i>	Нет	высокая	средняя	выше среднего	выше среднего	средняя	средняя	+	+
<i>stnA</i>	Нет	средняя, средняя				выше среднего	выше среднего	+	+
<i>Scgδ</i>	Да								
<i>kirre</i>	Нет								
<i>Gas8</i>	Да								
<i>CR44833</i>	Нет								
<i>α-Man-Ia</i>	Да			средняя		средняя	средняя	+	+
<i>X11Lβ</i>	Нет					средняя	выше среднего	+	+

<i>CG43759</i>	Нет			средняя			средняя	+	+
<i>shakB</i>	Нет								
<i>dnc</i>	Нет				средняя	средняя	средняя	+	+
<i>typ</i>							средняя	+	+
<i>Pzl</i>	Да								
<i>CG45263</i>	Нет								
<i>CG31221</i>	Да					высокая	средняя	+	+
<i>SKIP</i>	Нет	средняя	средняя	выше среднего			выше среднего	+	+
<i>LpR2</i>	Да	высокая	очень высокая	очень высокая	очень высокая	высокая	выше среднего	+	+
<i>α4GT2</i>	Да								
<i>plum</i>	Нет						выше среднего	+	+
<i>heca</i>	Да			средняя			очень высокая	+	+
<i>Myo81F</i>	Да								
<i>5-HT2B</i>	Нет								
<i>Dop1R1</i>	Нет								
<i>CG34355</i>	Да						средняя	+	+
<i>Rya-R</i>	Да								
<i>CG31038</i>	Да	средняя				средняя		+	+
<i>pros</i>	Нет					средняя	очень высокая	+	+
<i>heph (</i>	Да	средняя	средняя	выше среднего		средняя	выше среднего	+	+
<i>syd</i>	Нет	средняя	средняя	средняя		средняя	средняя	+	+
<i>Rbp6</i>	Нет					высокая	очень высокая	+	+
<i>Eip75B</i>	Нет					средняя	высокая	+	+
<i>ftz-f1</i>	Да	средняя	средняя	выше среднего				+	+
<i>Papss</i>	Нет	средняя	средняя	средняя	средняя	средняя	средняя	+	+
<i>Svil</i>	Да	выше среднего	средняя	средняя	средняя	средняя	средняя	+	+
<i>CG42747</i>	Да								
<i>GluRIB</i>	Нет								
<i>bru3</i>	Нет					выше среднего	выше среднего	+	+
<i>Pka-C3</i>	Да	выше	средняя		выше	выше		+	+

		среднего			среднего	среднег о			
<i>Pc</i>	Нет			выше среднего			средняя	+	+
<i>Con</i>	Да					средняя	средняя	+	+
<i>CG431 63</i>	Да								
<i>Obp73a</i>	Да								
<i>bab2</i>	Нет						выше среднег о	+	+
<i>bma</i>	Да					средняя	средняя	+	+
<b><i>gypsy</i></b>									
<i>CG176 84</i>	Да					средняя		+	+
<i>Pzl</i>	Да								
<i>Pzl</i>	Нет								
<i>l(3)80F g</i>	Да				средняя	высокая	высокая	+	+
<i>lovit</i>	Да					выше среднег о		+	+
<b><i>Tirant</i></b>									
<i>CG425 34</i>	Нет								
<i>CG422 38</i>	Нет								
<i>Cipc</i>	Да					средняя		+	-
<i>SNF4Aγ</i>	Нет	выше среднего	средняя		выше среднего			+	+
<i>Raf</i>	Нет	средняя					средняя	+	-
<i>CG344 17</i>	Нет	выше среднего	средняя						
<i>CG324 86</i>	Нет	выше среднего	выше среднег о		выше среднего	выше среднег о	средняя	+	-
<i>skd</i>	Нет	средняя	средняя	выше среднего		средняя	выше среднег о	+	+
<i>Shab</i>	Нет	средняя				средняя		+	+
<i>psq</i>	Нет	выше среднего	выше среднег о	выше среднего	средняя	средняя	выше среднег о	+	-
<i>unc-5</i>	Да						средняя	+	-
<i>chn</i>	Да	средняя	выше среднег о	средняя		средняя	выше среднег о		
<i>CG113 60</i>	Нет					средняя	высокая	+	-
<i>raw</i>	Да				средняя	средняя		+	-
<i>Fs(2)Ket</i>	Нет			высокая	средняя	средняя	высокая	+	+

<i>blood</i>									
<i>dnt</i>	Нет								
<i>CG42329</i>	Да								
<i>chinmo</i>	Да						выше среднего	+	+
<i>CG44153</i>	Да								
<i>Tsp39D</i>	Да					средняя	выше среднего	+	+
после <i>lncRNA:CR45347</i>	Да								
<i>Plc21C</i>	Нет					средняя	средняя	+	+
<i>DIP-λ</i>	Нет								
<i>CG30116</i>	Нет					средняя		+	+
после <i>CG8517</i>	Да								
<i>CG43163</i>	Да								
<i>CG14459</i>	Да								
<i>Myo81F</i>	Да						средняя	+	+
<i>heph</i>	Нет			средняя		средняя	выше среднего	+	+
<i>flamepco</i>	Нет								

(Знак «+» либо «-» – наличие/отсутствие данной инсерции в соответствующей линии дрозофил. Для инсерций в генах, которые экспрессируются слабо, анализ наличия инсерций в линиях не проводился).

**Приложение 3. Позиции уникальных инсерций ДКП-ретротранспозонов в геноме линий SS и Canton-S; паттерн экспрессии генов, содержащих инсерции согласно базе данных FlyBase**

Ретроинслозон	Ген	Положение в гене	направление	Экспрессия

				Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки	Окислительный стресс	Тепловой шок
<b>SS</b>									
<i>blood</i>	<i>Esp</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
	<i>mtt</i>	Интрон	Да	-	-	-	-		
	<i>beat-llc</i>	Интрон	Нет	-	-	-	средняя		
	<i>CG2264 (magu)</i>	Интрон	Да	выше среднего	средняя	-	-		
	<i>ds</i>	3'НТО	Нет	-	-	-	-		
	<i>alpha-Est6</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
<i>coria</i>	<i>Ir42a</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
	<i>IRSp53</i>	Интрон	Нет						
	<i>bnl</i>	Интрон	Нет	-	средняя	средняя	-		
	<i>CG34353</i>	Интрон	Да	-	-	средняя	средняя		
	<i>Pde9</i>	Интрон	Нет	-	-	средняя	-	средняя	средняя
<i>roo</i>	<i>Ddr</i>	Интрон	Да	-	-	-	-		
	<i>CG11221 (meng-po)</i>	Интрон	Да	-	-	-	-		
	<i>PAPL A1</i>	5'НТО	Да	выше среднего	средняя	выше среднего	средняя		
	<i>CG42818</i>	После гена	Да	-	-	-	-		
	<i>CG6380</i>	Перед геном	Нет	-	-	-	-		
	<i>kel</i>	Интрон	Нет	средняя	-	-	средняя		
	<i>Gprk1</i>	Интрон	Нет	высокая;	средняя	выше среднего	высокая;		
	<i>Fmo-2</i>	Интрон	Нет	-	выше среднего	выше среднего	-		
	<i>CR44201</i>	После псевдо гена	Да	-	-	-	-		
	<i>CG90</i>	Интрон	Да	выше	средняя	выше	высокая;		

	<i>03</i>			среднег о		среднего			
	<i>rgn</i>	Интрон	Да	средняя	высокая;	высокая;	высокая;		
	<i>Nlg3</i>	Интрон	Да	-	-	средняя	-		
	<i>CG60 40</i>	После гена	Да	-	-	-	-		
	<i>CG42 331</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
	<i>CR31 084</i>	Интрон	Да	-	-	-	-		
	<i>Rya-R</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
	<i>CaMK</i>	5'НТО	Да	выше среднег о	-	-	средняя		
	<i>CG11 380</i>	Интрон	Да	-	-	-	-		
	<i>dnc</i>	Интрон	Нет	выше среднег о	средняя	средняя	выше среднего		
	<i>CG43 921 (hwt)</i>	Интрон	Нет	-	-	средняя	выше среднего		
	<i>goe</i>	Интрон	Да	средняя	средняя	выше среднего	выше среднего		
	<i>CG15 04</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
<i>Tirant</i>	<i>cactus</i>	3'НТО	Нет	очень высокая	выше среднего	выше среднего	выше среднего	высок ая	высок ая
	<i>Nuak</i>	Интрон	Нет	-	средняя	-	средняя		
<b>Canton-S</b>									
<i>blood</i>	<i>pepo</i>	Интрон	Нет	выше среднег о	средняя	-	средняя		
	<i>CG44 153</i>	Интрон	Да	-	-	-	-		
	<i>dpr2</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
	<i>Samue l</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
	<i>Pzl</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
	<i>Atg17</i>	Интрон	Нет	высокая	средняя	средняя	средняя		
	<i>hth</i>	Интрон	Нет	-	средняя	выше среднего	выше среднего		
	<i>CG66 78</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
	<i>CG32 521 (Mnr)</i>	Интрон	Да	средняя	очень высокая	очень высокая	высокая		

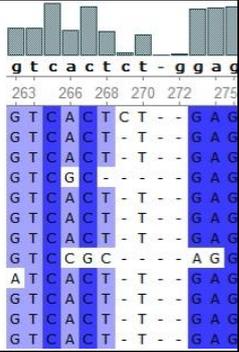
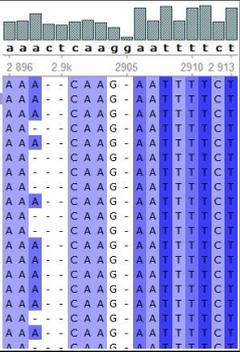
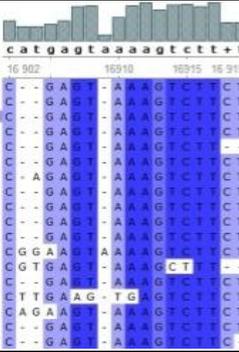
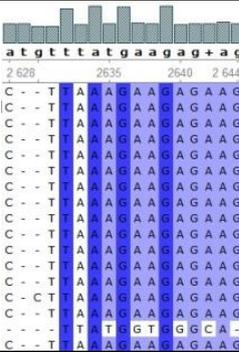
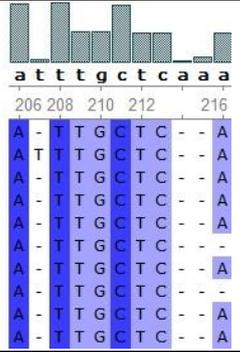
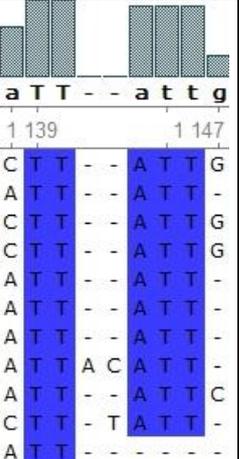
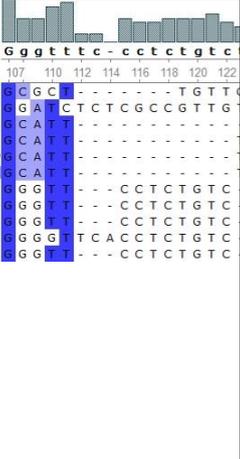
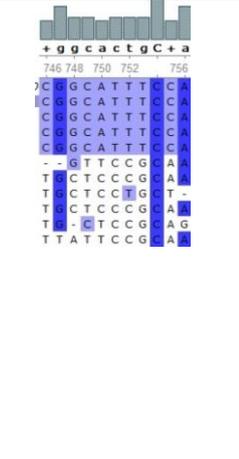
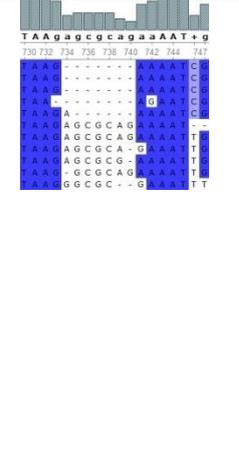
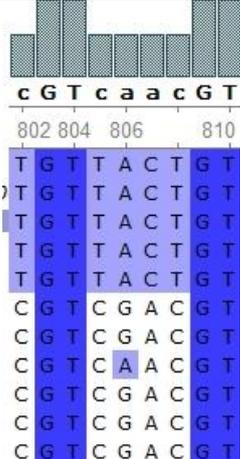
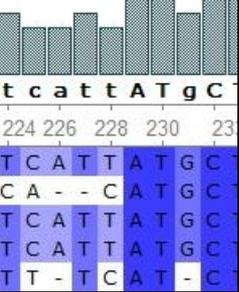
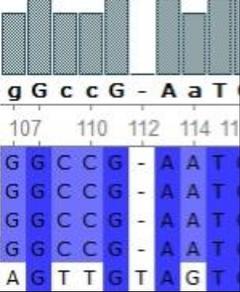
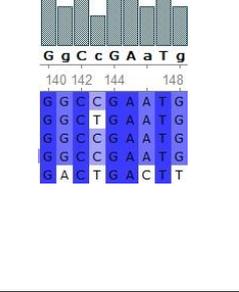
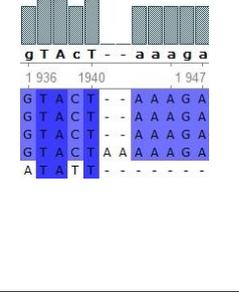
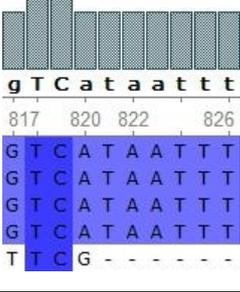
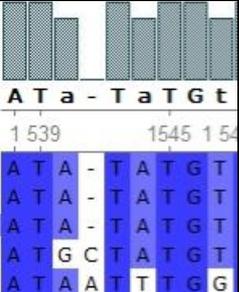
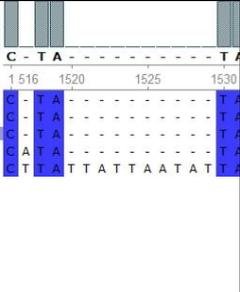
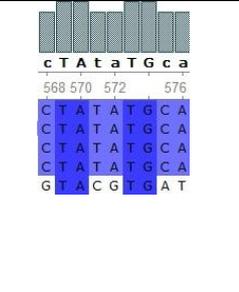
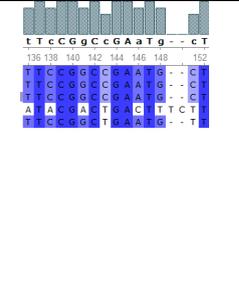
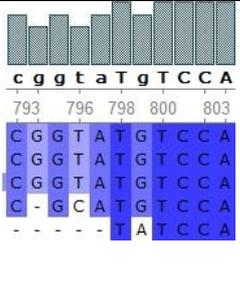
coria	<i>CG15431</i>	Инtron	Да	-	-	-	-		
	<i>CG17684</i>	Инtron	Да	-	-	-	-		
	<i>SLO2</i>	Инtron	Нет	-	-	-	-		
	<i>Pdk1</i>	Инторн	Нет	выше среднего	средняя	средняя	выше среднего	выше среднего	выше среднего
	<i>dpr6</i>	Инtron	Да	средняя	-	-	-		
	<i>CG45782 (lovit)</i>	Инtron	Нет	-	-	выше среднего	-		
gypsy	<i>CG42346</i>	Инtron	Нет	-	-	-	-		
roo	<i>Wdr62</i>	Инtron	Нет	средняя	средняя	средняя	средняя		
	<i>CG15631</i>	Экзон	Да	-	-	-	-		
	<i>smog</i>	Инtron	Нет	-	-	средняя	выше среднего		
	<i>Snoo</i>	Инtron	Да	-	-	-	средняя		
	<i>Shawl</i>	Инtron	Нет	-	-	-	средняя		
	<i>Trim9</i>	Инtron	Нет	-	-	-	средняя		
	<i>Pkn</i>	Инtron	Да	средняя	-	средняя	средняя		
	<i>SLO2</i>	Инtron	Нет	-	-	средняя	средняя		
	<i>CG33144</i>	Инtron	Нет	средняя	средняя	средняя	средняя		
	<i>CG30015</i>	Инtron	Да	-	средняя	средняя	средняя		
	<i>sprt</i>	Инtron	yes	-	средняя	средняя	средняя		
	<i>Oaz</i>	Инtron	Нет	-	-	-	-		
	<i>Kank</i>	Инtron	Нет	-	-	-	-		
	<i>bru3</i>	Инtron	Нет	-	-	выше среднего	высокая;		
	<i>bmm</i>	Инtron	Да	выше среднего	выше среднего	выше среднего	средняя		
	<i>CG45782 (lovit)</i>	Инtron	Нет	-	-	выше среднего	-		
<i>pb</i>	Инtron	Да	-	-	-	-			
<i>Ugt35b</i>	Второй экзон	Нет	-	-	средняя	-			
<i>CG14736</i>	5'НТО	Нет	-	-	-	-			

<i>CG32473</i>	Интрон	Нет	высокая ;	средняя	-	средняя		
<i>cv-c</i>	Интрон	Нет	-	-	-			
<i>CG18208</i>	Интрон	Нет	-	-	-			
<i>Dys</i>	Интрон	Нет	-	-	-	средняя		
<i>Ire1</i>	Интрон	Нет	средняя	-	-	средняя		
<i>CG3822 (KaiR1D)</i>	Интрон	Да	-	-	-	средняя		
<i>CG13606</i>	Интрон	Нет	-	-	средняя	средняя		
<i>Rya-R</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
<i>CG3777</i>	3'НТО	Да	-	-	-	средняя		
<i>CG43867</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
<i>CR44779</i>	внутри гена	Нет	-	-	-	выше среднего		
<i>futsch</i>	Интрон	Да	-	-	выше среднего	средняя		
<i>kirre</i>	Интрон	Нет	-	-	-	-		
<i>dnc</i>	Интрон	Да	-	средняя	средняя	средняя		
<i>CG15894</i>	Интрон	Да	-	-	-	-		
<i>cur</i>	5'НТО	Да	-	-	-	-		
<i>nAChR alpha 3</i>	Интрон	Нет	-	-	-	средняя		
<i>Ten-a</i>	Интрон	Да	-	-	средняя	выше среднего		

Приложение 4. Выравнивание последовательностей ретротранспозонов для поиска сайтов связывания транскрипционных факторов (фото сайтов связывания транскрипционных факторов в последовательностях ДКП-ретротранспозонов *blood* и *roo* обрезаны по количеству сиквенсов для экономии места).

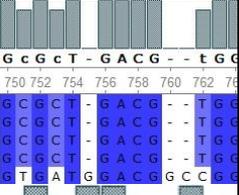
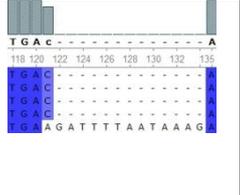
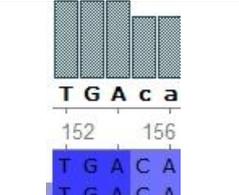
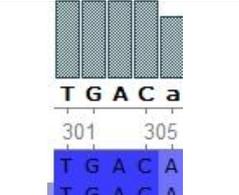
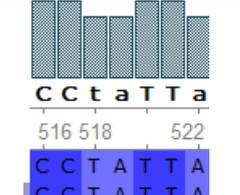
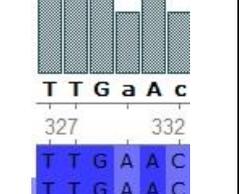
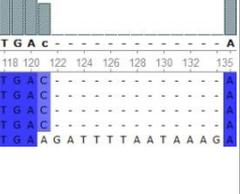
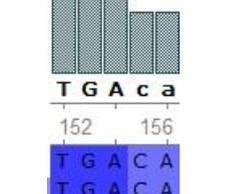
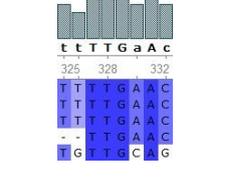
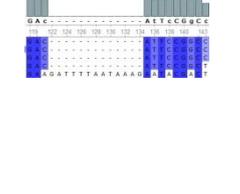
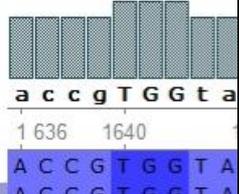
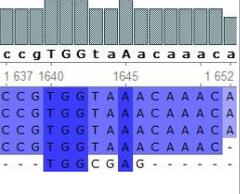
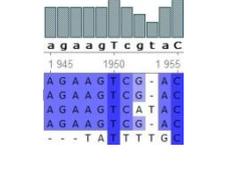
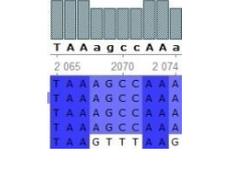
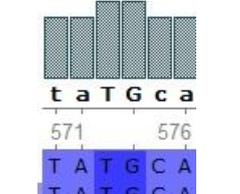
<b>Сайты связывания стресс-индуцируемых транскрипционных факторов</b>				
<i>blood</i> - Bcd	<i>blood</i> – Cf2	<i>blood</i> – Cf2	<i>blood</i> – D1	<i>blood</i> – HSF



 <p>g t c a c t c t - g g a g</p> <p>263 266 268 270 272 275</p> <p>G T C A C T C T - - G A G</p> <p>G T C A C T - T - - G A G</p> <p>G T C A C T - - - - G A G</p> <p>G T C G C - - - - G A G</p> <p>G T C A C T - T - - G A G</p> <p>G T C A C T - - - - G A G</p> <p>G T C C G C - - - - G A G</p> <p>A T C A C T - T - - G A G</p> <p>G T C A C T - T - - G A G</p> <p>G T C A C T - - - - G A G</p> <p>G T C A C T - T - - G A G</p>	 <p>a a a c t c a a g g a a t t t t c t</p> <p>2 896 2 9k 2905 2910 2 913</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p> <p>A A A - - C A A G - A A T T T T C</p>	 <p>c a t g a g t a a a g t c t t +</p> <p>16 902 16910 16915 16 91</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p> <p>C - - G A G T - A A A G T C T T C</p>	 <p>a t g t t t a t g a a g a g + a g</p> <p>2 628 2635 2640 2 644</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p> <p>C - - T A A A G A A G A G A A G</p>	 <p>a t t t g c t c a a a</p> <p>206 208 210 212 216</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A T T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p> <p>A - T T G C T C - - A</p>
Springer – Cad	Tirant – Cad	Springer – DI	Springer – DI	Springer – Ovo
 <p>a T T - - a t t g</p> <p>1 139 1 147</p> <p>C T T - - A T T G</p> <p>A T T - - A T T -</p> <p>C T T - - A T T G</p> <p>C T T - - A T T G</p> <p>A T T - - A T T -</p> <p>A T T - - A T T -</p> <p>A T T A C A T T -</p> <p>A T T - - A T T C</p> <p>C T T - T A T T -</p> <p>A T T - - - - -</p>	 <p>G g g t t t c - c c t c t g t c</p> <p>107 110 112 114 116 118 120 122</p> <p>G G C T - - - - - T G T T C</p> <p>G G A T C T C T C G C G T T G</p> <p>G C A T T - - - - - - - - -</p> <p>G C A T T - - - - - - - - -</p> <p>G C A T T - - - - - - - - -</p> <p>G C A T T - - - - - - - - -</p> <p>G G T T - - - C C T C T G T C</p> <p>G G T T - - - C C T C T G T C</p> <p>G G T T - - - C C T C T G T C</p> <p>G G G T T C A C C T C T G T C</p> <p>G G T T - - - C C T C T G T C</p>	 <p>+ g g c a c t g C + a</p> <p>746 748 750 752 756</p> <p>C G C C A T T T C C A</p> <p>C G C C A T T T C C A</p> <p>C G C C A T T T C C A</p> <p>C G C C A T T T C C A</p> <p>- - - G T T C C G C A</p> <p>T - - C T C C C G C A</p> <p>T - - C T C C C G C A</p> <p>T - - C T C C C G C A</p> <p>T - - C T C C C G C A</p> <p>T T A T T C C G C A</p>	 <p>T A A g a g c g c a g a a A A T + g</p> <p>730 732 734 736 738 740 742 744 747</p> <p>A A G - - - - - A A A A C</p> <p>A A G - - - - - A A A A C</p> <p>A A G - - - - - A A A A C</p> <p>A A G - - - - - A A A A C</p> <p>A A G A G C C A G A A A A T</p> <p>A A G A G C C A G A A A A T</p> <p>A A G A G C C A G A A A A T</p> <p>A A G A G C C A G A A A A T</p> <p>A A G A G C C A G A A A A T</p> <p>A A G A G C C A G A A A A T</p> <p>A A G A G C C A G A A A A T</p> <p>A A G A G C C A G A A A A T</p> <p>A A G A G C C A G A A A A T</p> <p>A A G A G C C A G A A A A T</p>	 <p>c G T c a a c G T</p> <p>802 804 806 810</p> <p>T G T T A C T G T</p> <p>T G T T A C T G T</p> <p>T G T T A C T G T</p> <p>T G T T A C T G T</p> <p>C G T C G A C G T</p> <p>C G T C G A C G T</p> <p>C G T C A A C G T</p> <p>C G T C G A C G T</p> <p>C G T C G A C G T</p> <p>C G T C G A C G T</p> <p>C G T C G A C G T</p> <p>C G T C G A C G T</p> <p>C G T C G A C G T</p>
Tirant – Cad	Tirant – Cad	Tirant – Cad	Tirant – Cad	Tirant – Cad
 <p>t c a t t A T g C</p> <p>224 226 228 230 23</p> <p>T C A T T A T G C</p> <p>C A - - C A T G C</p> <p>T C A T T A T G C</p> <p>T C A T T A T G C</p> <p>T T - T C A T - C</p>	 <p>g G c c g - A a T</p> <p>107 110 112 114 11</p> <p>G G C C G - A A T</p> <p>G G C C G - A A T</p> <p>G G C C G - A A T</p> <p>G G C C G - A A T</p> <p>A G T T G T A G T</p>	 <p>G g C c G A a T g</p> <p>140 142 144 148</p> <p>G G C C G A A T G</p> <p>G G C C G A A T G</p> <p>G G C C G A A T G</p> <p>G A C T G A C T</p>	 <p>g T A c T - - a a a g a</p> <p>1 936 1940 1 947</p> <p>G T A C T - - A A A G A</p> <p>G T A C T - - A A A G A</p> <p>G T A C T - - A A A G A</p> <p>G T A C T A A A A G A</p> <p>A T A T T - - - - -</p>	 <p>g T C a t a a t t t</p> <p>817 820 822 826</p> <p>G T C A T A A T T T</p> <p>G T C A T A A T T T</p> <p>G T C A T A A T T T</p> <p>T T C G - - - - -</p>
Tirant – Cf2	Tirant – Cf2	Tirant – Cf2	Tirant – Deaf1	Tirant – DI
 <p>A T a - T a T G t</p> <p>1 539 1545 154</p> <p>A T A - T A T G T</p> <p>A T A - T A T G T</p> <p>A T A - T A T G T</p> <p>A T G C T A T G T</p> <p>A T A A T T T G G</p>	 <p>C - T A - - - - - T A</p> <p>1 516 1520 1525 1530</p> <p>C - T A - - - - - T A</p> <p>C - T A - - - - - T A</p> <p>C - T A - - - - - T A</p> <p>C A T A - - - - - T A</p> <p>C T A T T A T T A A T A T T</p>	 <p>c T A t a T G c a</p> <p>568 570 572 576</p> <p>C T A T A T G C A</p> <p>C T A T A T G C A</p> <p>C T A T A T G C A</p> <p>C T A T A T G C A</p> <p>G T A C G T G A T</p>	 <p>t T c G g c c G a a T g - - c t</p> <p>136 138 140 142 144 146 148 152</p> <p>T T C C G G C C G A A T G - - C T</p> <p>T T C C G G C C G A A T G - - C T</p> <p>T T C C G G C C G A A T G - - C T</p> <p>A T A C G A T G A C T T C T T</p> <p>T T C C G G C C G A A T G - - C T</p>	 <p>c g g t a t g T C C A</p> <p>793 796 798 800 803</p> <p>C G G T A T G T C C A</p> <p>C G G T A T G T C C A</p> <p>C G G T A T G T C C A</p> <p>C - G C A T G T C C A</p> <p>- - - - T A T C C A</p>
Tirant – H				





				CG4328
 <p>G c G c T - G A C G - - t G G</p> <p>750 752 754 756 758 760 762 764</p> <p>G C G C T - G A C G - - T G G G C G C T - G A C G - - T G G G C G C T - G A C G - - T G G G C G C T - G A C G - - T G G G T G A T G G A C G G C C G</p>  <p>c T a g T a a A -</p> <p>2 116 2120 21</p> <p>C T A G T A A A - C T A G T A A A - C T A G T A A A - C T A G T A A A - T T T G T T G A G</p>	 <p>T G A c - - - - - A</p> <p>115 120 122 124 126 128 130 132 135</p> <p>T G A C - - - - - A T G A C - - - - - A T G A C - - - - - A T G A C - - - - - A T G A G A T T T T A A T A A A G</p>	 <p>T G A c a</p> <p>152 156</p> <p>T G A C A T G A C A T G A C A T G A C A T G A A G</p>	 <p>T G A C a</p> <p>301 305</p> <p>T G A C A T G A C A T G A C A T G A C A T G A C T</p>	 <p>C C t a T T a</p> <p>516 518 522</p> <p>C C T A T T A C C A G T T C</p>
<i>Tirant – Ct</i>	<i>Tirant – Mirr</i>	<i>Tirant – Mirr</i>	<i>Tirant – Pan</i>	<i>Tirant – Sd</i>
 <p>T T G a A c</p> <p>327 332</p> <p>T T G A A C T T G A A C T T G A A C T T G C A G</p>	 <p>T G A c - - - - - A</p> <p>118 120 122 124 126 128 130 132 135</p> <p>T G A C - - - - - A T G A C - - - - - A T G A C - - - - - A T G A C - - - - - A T G A G A T T T T A A T A A A G</p>	 <p>T G A c a</p> <p>152 156</p> <p>T G A C A T G A C A T G A C A T G A A G</p>	 <p>t t T T G a A c</p> <p>325 328 332</p> <p>T T T T G A A C T G T T G C A G</p>	 <p>G A C - - - - - A T T C G G C C</p> <p>115 117 119 121 123 125 127 129 131 133 135 137 139</p> <p>T G A C - - - - - A T G A C - - - - - A T G A C - - - - - A T G A C - - - - - A T G A G A T T T T A A T A A A G</p>
<i>Tirant – Su(H)</i>	<i>Tirant – Su(H)</i>	<i>Tirant – Tll</i>	<i>Tirant – Tll</i>	<i>Tirant – Vvl</i>
 <p>a c c g T G G t a</p> <p>1 636 1640</p> <p>A C C G T G G T A A C C G T G G T A A C C G T G G T A A C C G T G G T A - - - - T G G C G</p>	 <p>c c g T G G t a A a c a a a c a</p> <p>1 637 1640 1645 1 652</p> <p>C C G T G G T A A A C A A A C A C C G T G G T A A A C A A A C A C C G T G G T A A A C A A A C A C C G T G G T A A A C A A A C A - - - - T G G C G A G - - - - -</p>	 <p>a g a a g T c g t a c</p> <p>1 945 1950 1 955</p> <p>A G A A G T C G - A C A G A A G T C A T A C A G A A G T C G - A C - - - T A T T T G</p>	 <p>T A A a g c c A A a</p> <p>2 065 2070 2 074</p> <p>T A A A G C C A A A T A A A G C C A A A T A A A G C C A A A T A A A G C C A A A T A A G T T T A A G</p>	 <p>t a T G c a</p> <p>571 576</p> <p>T A T G C A T A T G C A T A T G C A T A T G C A C G T G A T</p>