

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ В СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЯХ *Drosophila melanogaster*

© 2024 г. П. А. Миляева^{a, b}, И. В. Кукушкина^a, А. Р. Лавренов^{a, c}, И. В. Кузьмин^a,
А. И. Ким^{a, b}, Л. Н. Нефедова^{a, *}

^a Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^b Faculty of Biology, Longgang District, Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen 518172 China

^c Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: nefedova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 03.08.2023 г.

После доработки 13.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

Регуляция активности ретротранспозонов в соматических тканях — сложный процесс, детали которого остаются неизученными. Основным механизмом подавления транспозиции за пределами гонад считается siРНК-интерференция, однако в последнее время появляется все больше сведений, подтверждающих участие системы piРНК-интерференции в контроле активности ретротранспозонов во время развития соматических тканей, в частности нервной системы. В настоящей работе на модельном объекте *Drosophila melanogaster* проведен комплексный анализ экспрессии основных генов, участвующих в piРНК-интерференции, в сочетании с изучением экспрессии отдельных ретротранспозонов и кластеров piРНК в генеративных и соматических тканях, включая нервные ткани. Показано, что повышение экспрессии ретротранспозонов при нарушении работы этой системы происходит тканеспецифично. Ведущим фактором в тканеспецифичной регуляции ретротранспозона является не его положение в геноме, а наличие в его последовательности сайтов связывания транскрипционных факторов.

Ключевые слова: ретротранспозоны, нанопоровое секвенирование, *Drosophila melanogaster*, фенотип flamenco

DOI: 10.31857/S0026898424010094, EDN: ODXKBV

ВВЕДЕНИЕ

Система piРНК-интерференции — сложный многофакторный процесс, главная функция которого состоит в регуляции активности ретроэлементов (ретротранспозонов с длинными концевыми повторами (ДКП) и без них). Эта система работает главным образом в клетках зародышевого пути, где исключительно важна защита от транспозиции. Наиболее детально молекулярные механизмы piРНК-интерференции изучены в соматических и генеративных тканях яичников *Drosophila melanogaster*. Белок PIWI, главный компонент системы piРНК-сайленсинга, в клетках зародышевого пути связывает piРНК, которые процессируются в околоядерной структуре, называемой “нюаж”, в ходе цикла “пинг-понг”; в соматических тканях яичников PIWI связывает piРНК из комплекса Yb-тельца, которое располагается на внешней мембране митохондрий [1, 2].

Считается, что piРНК от одноцепочечных кластеров, например *flamenco*, направляются

в Yb-тельца, важными компонентами которых являются белки Armitage (Armi), Vreteno (Vret), Yellow body (Yb), Zucchini (Zuc) и Brother of Yb (BoYb). Одноцепочечные кластеры имеют собственные промоторы и состоят из дефектных копий мобильных элементов, ориентированных в едином антисмысловом направлении. piРНК от двухцепочечных кластеров, например *42AB*, образуются в результате цикла “пинг-понг” при участии белков VASA, Spindle-E (Spn-E), Krimper (Krimp), Papi, Aub и Ago3. У двухцепочечных кластеров есть неканонические сайты инициации транскрипции, последовательности мобильных элементов в них расположены как в смысловом, так и антисмысловом, по отношению к направлению транскрипции, положению [1].

Транскрипты одноцепочечных кластеров претерпевают альтернативный сплайсинг, что необходимо для правильного процессинга piРНК, транскрипты двухцепочечных кластеров защищены от альтернативного сплайсин-

га комплексом белков RDC (Rhino, Deadlock, Cutoff), однако в норме в клетке присутствуют как сплайсированные, так и несплайсированные формы транскриптов кластеров обоих типов. Считается, что сплайсированные транскрипты используются для продукции siРНК [3]. При этом мутации, повышающие частоту сплайсинга, негативно влияют на процессинг транскриптов обоих типов кластеров [4, 5]. Стоит отметить, что комплекс RDC участвует и в транскрипции двухцепочечных кластеров. На этом этапе необходимо присутствие белка Moonshiner (Moon), который связывается с белком Del и активирует транскрипцию, привлекая TRF2 (TBF-related factor 2) [6].

Основная роль белка PIWI заключается в распознавании транскриптов мобильных элементов с помощью направляющих (гидовых) piРНК для последующей гетерохроматизации этих участков [1]. Гетерохроматизация происходит благодаря белкам Asterix, Panx, Str и работе комплекса SFINX, который способствует ассоциации рибозима piРНК-PIWI с целевым участком ДНК. Независимо от данных белков может работать белок Maelstrom (Mael) с собственным диапазоном регулируемых областей, который помимо гетерохроматизации может способствовать генерации piРНК из антисмысловых последовательностей [7–10] ретротранспозонов. Таким образом, инактивация различных мобильных элементов необязательно происходит с помощью одного и того же механизма.

Исследования последних лет показали, что белок PIWI контролирует не только активность мобильных элементов. Мутация в гене *piwi* может вызвать накопление фрагментов рРНК в яйчиках [11]. Более того, PIWI играет важную роль в формировании нервной ткани у нематоды и мыши [12]. Показано, что кластер *flamenco*, транскрипты которого процессируются в гидовые РНК для piРНК-интерференции, принимает участие в формировании нервной системы дрозофилы [5].

В то же время остается неизвестным, каким образом piРНК-интерференция работает при развитии органов, в частности центральной нервной системы (ЦНС) [12]. Считается, что в соматических клетках вне генеративных органов основное участие в регуляции мобильных элементов принимает система siРНК-интерференции, однако на дрозофиле и других модельных объектах показано, что отдельные компоненты piРНК-интерференции, в частности кластер *flamenco*, гены *piwi*, *caz*, *aub* и *armi*, необходимы не только для инактивации ретротранспозонов, но и правильного формирования нервной ткани [5, 13]. Так, мутации в генах *aub*, *AGO3* и *armi* приводят к повышению в го-

лове дрозофилы экспрессии *blood*, *gypsy* и *HeT-A*, при этом у взрослой мухи эти гены экспрессируются в отдельных нейронах головных ганглиев [14]. Продукты этих генов и белок PIWI, принимающий участие в инактивации ретротранспозонов на уровне транскрипции, обнаруживаются в небольшом количестве в отдельных районах мозга дрозофилы, более того, PIWI экспрессируется в слюнных железах и жировом теле [15, 16]. Однако точная функция этих белков в соматических тканях остается неизвестной. Кластер *flamenco* и ген *caz* отвечают за правильное формирование моторных функций, так как при нарушении сплайсинга транскриптов *flamenco* под влиянием нокдауна гена *caz* одновременно со сверхэкспрессией *aub* снижается подвижность личинок и мух. Показано, что мутация *piwi* приводит к усиленному росту поврежденных аксонов нематоды, а нкРНК млекопитающих, которая регулирует гены, ответственные за рост аксонов, имеет транспозонное происхождение [17]. Экспрессия ретротранспозонов играет важную роль в эмбриогенезе дрозофилы и других животных, так как они способны регулировать экспрессию различных генов хозяина [18–22].

В настоящей работе проведен комплексный анализ экспрессии основных генов, участвующих в piРНК-интерференции, в сочетании с экспрессией отдельных ретротранспозонов и кластеров piРНК в генеративных и соматических тканях, включая нервные ткани. Для анализа были использованы линия дикого типа Canton-S, линия SS7K с нарушением контроля транспозиции ретротранспозона *gypsy*, мутантная по локусу *flamenco*, линии *piwi*[2] и *piwi*[3], гетерозиготные по разным мутантным аллелям гена *piwi*, и их гибриды, содержащие обе мутации в компаунде. Помимо этого, проведен анализ результатов нанопорового секвенирования линий SS7K и Canton-S, чтобы оценить влияние геномного окружения и наличия сайтов связывания транскрипционных факторов на тканеспецифичную экспрессию ретротранспозонов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии *Drosophila melanogaster* и условия культивирования. В работе использовали следующие линии: SS7K, выделена из исходной линии SS как одно из независимо культивируемых отведений, имеет фенотип *flamenco* (нарушение контроля транспозиции ретротранспозона *gypsy*) [23]; Canton-S — линия дикого типа; *piwi*[2] (w^{1118} ; $\{ry11\}piwi^2/CyO$, w^{+}) и *piwi*[3] ($\{PZ\}piwi^{06843}cn^1/CyO$; ry^{506}). Все линии культивировали в термостате при температуре 25°C.

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. РНК выделяли

из тканей яичников, голов и корпусов (тканей, оставшихся после удаления голов и извлечения яичников) семидневных самок и ЦНС личинок с помощью реактива ExtractRNA (“Евроген”, Россия) после вскрытия мух или личинок в буфере PBS. ЦНС личинок извлекали по методу Hafer и Schedl, предложенном в 2006 году [24]. Перед постановкой реакции обратной транскрипции образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для обратной транскрипции использовали набор MMLV-RT Kit (“Евроген”, Россия). Обратную транскрипцию проводили со случайным праймером, так как экспрессия большинства кластеров в нашем опыте не превышает экспрессию малокопийных ретротранспозонов. ПЦР проводили в присутствии SYBR Green I (“Евроген”) в амплификаторе MiniOpticon Real-Time PCR System (“Bio-Rad Laboratories Inc.”, США). В опыте анализировали относительную экспрессию генов системы рiРНК-интерференции

maelstrom, *vreteno*, *nxf2*, *Nxf3*, *Hen1*, *moonshiner*, *vasa*, *cabeza*, *cutoff*, *armitage*, *zucchini*, *piwi*, *AGO3*, *aubergine*, *BoYb*, кластеров рiРНК *flamenco*, *42AB*, *38C*, *20A* ДКП-ретротранспозонов *copia*, *blood*, *gypsy*, *roo*, *Tirant*, теломерных LINE *HeT-A*, *TART-A*, *TART-B*, *TART-C*, нормированную на экспрессию генов *αTub84D*, *Rpl40* и *EloB* (табл. 1). Статистическую обработку результатов ПЦР проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Использовали по шесть образцов из каждой выборки. Праймеры для кластера *42AB* взяты из работы [4], праймеры для кластеров *38C* и *20A* – из [25], праймеры для кластера *flamenco* подобраны нами к сплайсированной форме транскрипта согласно нуклеотидной последовательности из базы данных NCBI (Gene ID: 26067356) [26]. Подобранные нами праймеры лежат в области начала транскрипции этого кластера, однако до последовательностей мобильных элементов, поэтому не отжигаются на кДНК мобильных элементов.

Таблица 1. Праймеры, используемые для оценки экспрессии генов, кластеров рiРНК и ретротранспозонов

Название	Прямой праймер	Обратный праймер
Гены		
<i>αTub84D</i>	5'-GTGCATGTTGTCCAACACCAC-3'	5'-AGAACTCTCCCTCCTCCATA-3'
<i>EloB</i>	5'-GCACAAACATACACACTCACG-3'	5'-TTTCCTACTTCGCTTGACACC-3'
<i>Rpl40</i>	5'-CTGCGTGGTGGTATCATTG-3'	5'-CAGGTTGTTGGTGTGTCC-3'
<i>maelstrom</i>	5'-GGAATCCGATCCATCTACAG-3'	5'-TCAACAATGTTGCGGTACAG-3'
<i>vreteno</i>	5'-GCCAGTGAATCACAACAGAG-3'	5'-AAAGTGCAGAACGACCTGCG-3'
<i>nxf2</i>	5'-GAATGTGAGCACTGTCAAGC-3'	5'-CCGACAGTACGTAGGTTAAA-3'
<i>Nxf3</i>	5'-GTTCGTGCTGGACACTATGG-3'	5'-CTAGCGACTTTTGCATCTTC-3'
<i>Hen1</i>	5'-AGTCTTCAGCACACCAAATC-3'	5'-CGACTCGTATTCTTAGGCG-3'
<i>moonshiner</i>	5'-TGGTCAACAATCGCATCTAC-3'	5'-TGGCCTGCGACCACTTTG-3'
<i>vasa</i>	5'-CGAGGAAGTTTGCTTTTCGAG-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'-CGCGAAGGATCAAATGCTT-3'
<i>aubergine</i>	5'-ACTGGACCATCTACCAGTAC-3'	5'-CAGTTCCAAAACATAGGGGC-3'
<i>BoYb</i>	5'-CCCAAGTTTCTCATGGTTTC-3'	5'-ACGAACTGCTCCGAATATG-3'
Кластеры		
<i>flamenco-spliced</i>	5'-CATCAGCTCAGCAGCAGTGTA-3'	5'-AGTCCAATGCTCGCTTGAAA-3'
<i>flamenco-unspliced</i>		5'-GACTTAACACTTACCGCTTGAAA-3'
<i>42AB-spliced</i>	5'-GCAGTTGCCGTCTCTCCTT-3'	5'-TGGGTCAAAGTGCAGCAGTT-3'
<i>42AB-unspliced</i>		5'-TACGGGAATATAATCGCAGCAGTT-3'

Таблица 1. Окончание

Название	Прямой праймер	Обратный праймер
38C 1	5'-AATGGCTAGTTCGCTACCAGACAG-3'	5'-CGGGTCTTCTCTCAAACGCAATC-3'
38C 2	5'-CACAAAATGGCCGCTGGA-3'	5'-AGCCAAACCTGTGTTGTGA-3'
20A 1	5'-GCCTACGCAGAGGCCTAAGT-3'	5'-CAGATGTGGTCCAGTTGTGC-3'
20A 2	5'-CTGCTTTGTGCTTGGAGATG-3'	5'-TCTGCACAGATTCTGAAATTGAA-3'
Ретротранспозоны		
gypsy	5'-CTGCTGAAAGACGGCATTATC-3'	5'-AGAACTTTCCTTGCCCAGAT-3'
Tirant	5'-AACGCTATTTCATTCTGCAAC-3'	5'-AGGGTTCTCCTAACTACGTC-3'
copia	5'-CTTCAGTGATGGACAAC-3'	5'-CAGTGTAATCTCATGGTCAT-3'
roo	5'-ACAGATTCCCACCTTCTTTG-3'	5'-AGCCGAGGAGTAAATGAGTA-3'
blood	5'-ATGCGACAACGATACAGG-3'	5'-TTTGTGACAGATTATCGGCG-3'
HeT-A	5'-TCAGGATACAGGCAAAGGAC-3'	5'-CGACTATCCACGAGCATGG-3'
TART-A	5'-GCAGCAGTTTCCATTTGAC-3'	5'-AAGAACACACCATCGCTTG-3'
TART-B	5'-GGGCAGACCAAGTTTATCC-3'	5'-TCATGTGGGAAATGTGTAGC-3'
TART-C	5'-ATAGGGTATGGCACGAAGG-3'	5'-AAGTAGTGGTCCGAGATTGC-3'

Выделение ДНК и нанопоровое секвенирование. ДНК выделяли по ранее описанной методике [27]. Концентрацию ДНК в образце оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop (“Pqlab”, Германия). После этого проводили подготовку библиотеки (лигирование адапторов и очистка на магнитных частицах) согласно протоколу производителя “OxfordNanopore” (Великобритания). Затем концентрацию библиотеки оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop (“Pqlab”), проводили прайминг ячейки, загружали библиотеку и запускали секвенатор Oxford Nanopore MiniION. Данные секвенирования картировали на референсный геном *D. melanogaster* шестой сборки (dm6) в виртуальном ядре (WSL) Ubuntu для Windows 11 с помощью программы miniconda2 (“Anaconda Inc.”, США) с настройками для прочтений, полученных с помощью технологии секвенирования Nanopore. Результаты визуализировали с помощью программы IGV (Integrative Genomic Viewer) [28]. Для поиска уникальных (новых) инсерций исследуемых ретротранспозонов использовали программу TLDR (Transposons from long DNA reads) [29]. Библиотеку мобильных элементов создавали на основе последовательностей из BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) [30]. Результаты работы программы TLDR сортировали по длине участков новых инсерций, совпадающих с последовательностями ретротранспозонов. Также с помощью алгоритма Ugene проверяли, содержат ли найденные инсерции ретротранспозонов сайты посадки праймеров, используемых для ОТ-ПЦР [31]. Для

поиска неуникальных (консервативных) последовательностей ретротранспозонов использовали функцию blast в базе данных FlyBase [32], а затем проверяли наличие их инсерций в геномах используемых линий.

Поиск сайтов связывания с транскрипционными факторами в регуляторных последовательностях мобильных элементов проводили с помощью базы данных LASAGNA и модели сайтов связывания из баз данных JASPAR и TRANSFAC [33]. В анализ брали только те сайты связывания, которые были предсказаны с вероятностью $p < 0.001$. Функции и паттерны экспрессии транскрипционных факторов с предсказанными сайтами связывания смотрели в базе данных FlyBase [32]. Консервативность найденных сайтов связывания проверяли с помощью множественного выравнивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия генов системы РНК-интерференции в генеративных и соматических тканях

Экспрессия на уровне транскрипции 15 основных генов-участников рiРНК-интерференции в тканях яичников, головы и корпуса семидневных самок, а также в тканях ЦНС личинок 3-го возраста линии Canton-S была оценена с помощью количественной ПЦР (рис. 1). ЦНС выбрали в связи с тем, что участие кластера *flamenco* в формировании нервной системы было показано ранее [5].

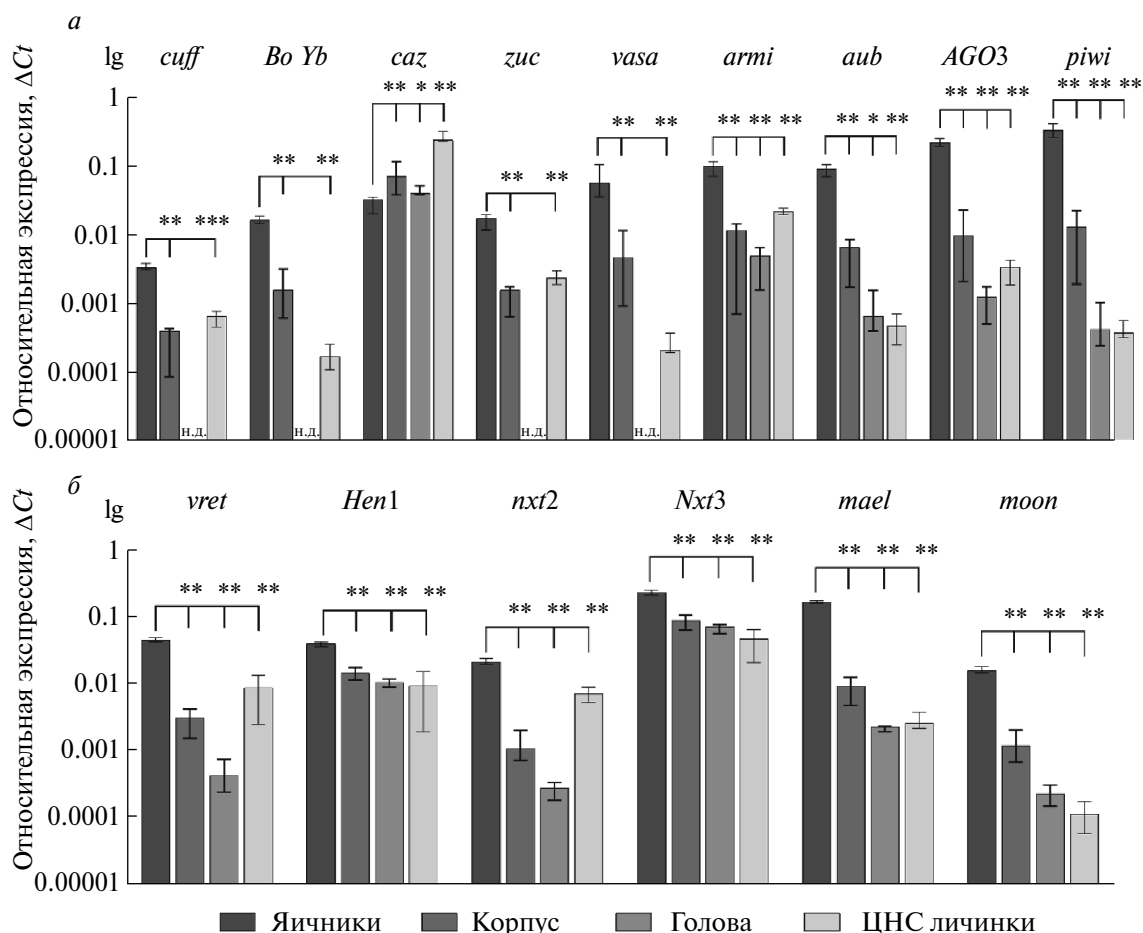


Рис. 1. Логарифм относительной экспрессии генов-участников piRNA-интерференции в тканях яичников, корпуса и головы самок, а также в тканях ЦНС личинок третьего возраста линии Canton-S. н.д. — не детектируется, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Как и следовало ожидать, экспрессия этих генов в яичниках значительно превышает экспрессию в любой из соматических тканей. Исключением является ген *caz*, который сильнее всего экспрессируется в ЦНС личинок. Это согласуется с данными, полученными ранее другими исследователями [5].

Транскрипция генов *cut*, *BoYb*, *zuc* и *vasa* обнаружена во всех тканях имаго, кроме тканей головы. При этом все исследуемые гены экспрессируются в ЦНС личинок. Экспрессия четырех ключевых генов системы piRNA-интерференции (*aub*, *AGO3*, *armi* и *piwi*) обнаружена и в головах самок, и в ЦНС личинок. Эти гены необходимы для осуществления цикла “пинг-понг” и запуска репрессии ретротранспозонов. Полученные результаты указывают на то, что в соматических тканях система piRNA-интерференции может быть активна и задействована в регуляции экспрессии отдельных ретротранспозонов.

Экспрессия ретротранспозонов при нарушении контроля транспозиции

Далее была измерена экспрессия на уровне транскрипции ДКП-ретротранспозонов *roo* (группа BEL), *copia* (группа Copia), *gypsy*, *Tirant*, *blood* (группа Gypsy) и LINE-элементов *HeT-A*, *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* в тканях яичников, головы и корпуса семидневных самок линий Canton-S и SS7K, а также в тканях ЦНС личинок 3-го возраста этих же линий (рис. 2).

Наиболее высокая экспрессия ДКП-ретротранспозонов *roo* и *copia* выявлена в тканях корпуса мух обеих линий, более низкая в тканях головы и самая низкая в тканях яичников, причем в яичниках имаго и ЦНС личинок *roo* экспрессировался на самом низком уровне. Таким образом, обнаружены различия в экспрессии *roo* в нервной системе взрослых мух и личинок, в то время как высокий уровень экспрессии *copia* характерен для всех соматических тканей,

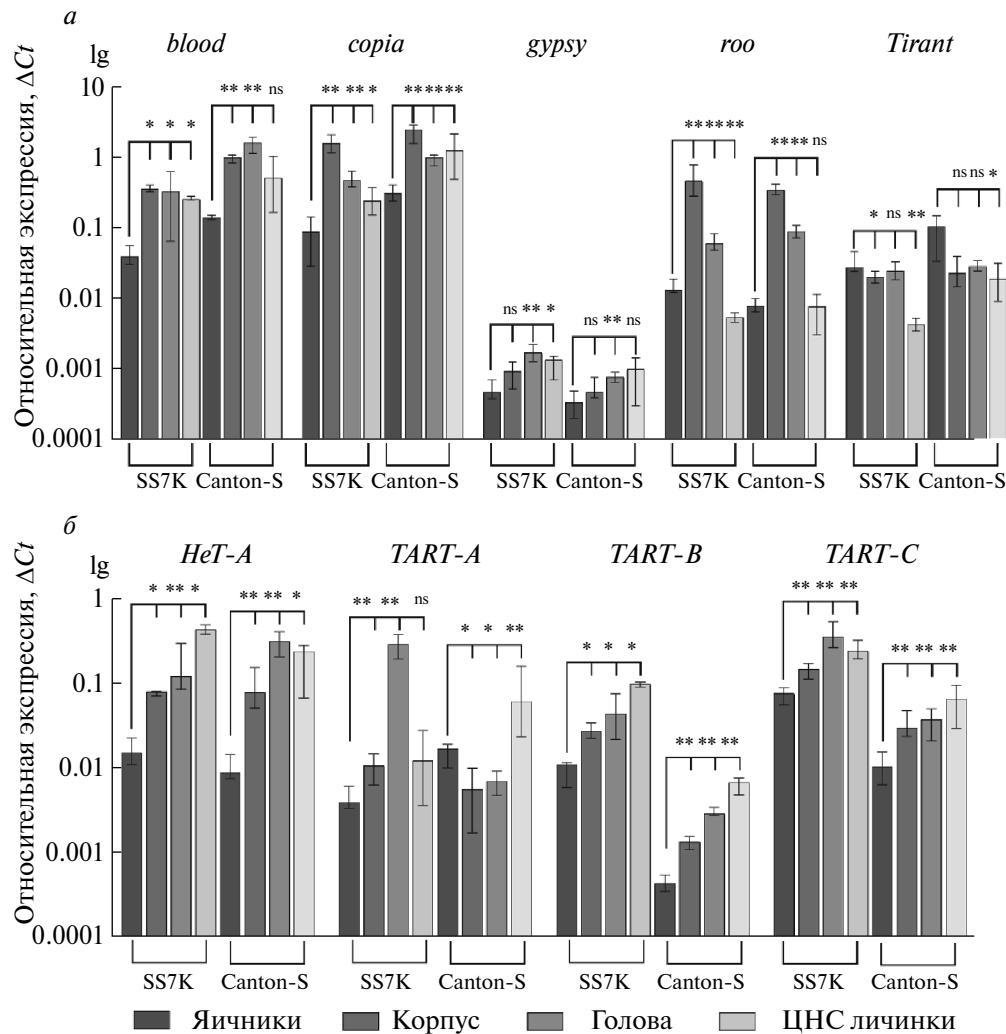


Рис. 2. Логарифм относительной экспрессии ДКП-ретротранспозонов *blood*, *copia*, *gypsy*, *roo* и *Tirant* и теломерных LINE-элементов *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и *HeT-A* в тканях яичников, корпусов, головы самок и ЦНС личинок SS7K и Canton-S. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns – статистически незначимое изменение.

независимо от стадии развития. Мы также обнаружили, что наиболее высокой экспрессия *gypsy* и *blood* была в соматических тканях. *Gypsy* характеризуется наибольшей экспрессией в голове и ЦНС личинок. В отличие от всех остальных ретроэлементов, *Tirant* наиболее высоко экспрессируется в тканях яичников, показывая, что его активность регулируется одинаково как в яичниках, так и соматических тканях. LINE-элементы *TART-A*, *TART-B*, *TART-C*, *HeT-A*, как и ДКП-ретротранспозоны *gypsy* и *blood*, наиболее высоко экспрессируются в нервной ткани обеих линий.

Таким образом, транскрипция большинства ДКП-ретротранспозонов наиболее активно подавляется в тканях яичников, что коррелирует с уровнем экспрессии генов системы piRNA-интерференции, однако в разных соматических тканях они экспрессируются по-разному, независимо от принадлежности к той

или иной группе. По-видимому, это объясняется существованием собственных механизмов регуляции в соматических тканях. Паттерны экспрессии ретроэлемента в линии SS7K с фенотипом flamenco не отличаются значимо от паттернов в линии дикого типа, за исключением *TART-A* и *TART-C* в нервной системе. Таким образом, наличие фенотипа flamenco у SS7K не критично для регуляции транскрипционной активности этих ретроэлемента.

Далее проанализировали экспрессию того же набора ретроэлемента у мутантов по гену *piwi*. Используемые в работе линии, гетерозиготные по мутации в гене *piwi*, несут инсерцию Р-элемента в кодирующей части гена (в линии *piwi*[2] инсерция в 4-м экзоне, что соответствует белковому домену IMD-PIWI; в линии *piwi*[3] инсерция в 1-м экзоне, которая соответствует домену N-PAZ и структурным доменам) и балансерную хромосому 2L с мутацией *SuO*. Го-

мозиготы по мутации в линии *piwi*[2] нежизнеспособны, а в линии *piwi*[3] редко развиваются до имаго и имеют редуцированные яичники.

Были проведены реципрокные скрещивания линий *piwi*[2] и *piwi*[3], измерена экспрессия ретротранспозонов в тканях корпуса и головы у самок гибридов F_1 , имеющих две разные мутации в компаунде, и самок родительских линий (рис. 3). В обоих направлениях скрещиваний мы наблюдали у гибридных мутантных самок редуцированные яичники, однако редуцированные семенники были только у мутантных самцов в направлении скрещивания $\text{♀} \textit{piwi}$ [2] $\times$ $\text{♂} \textit{piwi}$ [3], что согласуется с наблюдениями других исследователей и функции *PIWI* на первых стадиях дробления [34]. В связи с тем, что ткани яичников у гибридов редуцированные, мы сравнили экспрессию ретротранспозонов между родительскими линиями и гибридами только в соматических тканях.

Нами обнаружены общие тенденции изменения экспрессии нескольких исследуемых ДКП-ретротранспозонов у гибридов мух, независимо от направления скрещивания. Так, в разных тканях наблюдается одинаковая картина экспрессии ретротранспозонов *copia* и *gypsy*: экспрессия *copia* статистически значимо понижалась в тканях корпуса и головы гибридов, полученных в обоих направлениях скрещивания;

экспрессия *gypsy* наиболее сильно повышалась в голове. В отличие от *copia* и *gypsy*, ретротранспозоны *blood* и *roo* экспрессировались по-разному у гибридов, полученных в разных направлениях скрещиваний. При этом выявлены статистически значимые различия в уровне экспрессии этих ретротранспозонов в разных тканях родительских линий *piwi*[2] и *piwi*[3]. Так, по сравнению с линией *piwi*[2] в линии *piwi*[3] *blood* экспрессируется на более высоком уровне в тканях головы ($p < 0.001$), а *roo* — в корпусах ($p < 0.01$). У потомков от скрещивания $\text{♀} \textit{piwi}$ [2] $\times$ $\text{♂} \textit{piwi}$ [3] экспрессия *blood* была выше в тканях корпуса и такой же в тканях головы, если сравнивать с родительскими линиями (рис. 3а), а у потомков от обратного скрещивания экспрессия *blood* достоверно ниже в голове (рис. 3б). Однако в обоих направлениях скрещивания экспрессия *blood* у гибридов не различалась, поэтому эффект, наблюдаемый при сравнении самок линии *piwi*[3] с самками их потомства, вызван не репрессией *blood*, а его высокой экспрессией у самок линии *piwi*[3]. Для *roo* была характерна более высокая экспрессия в корпусе потомков от скрещивания $\text{♀} \textit{piwi}$ [2] $\times$ $\text{♂} \textit{piwi}$ [3], но и в корпусе, и в голове потомков от обратного скрещивания экспрессия *roo* была ниже, чем в материнской линии, однако, мы предполагаем, такой эффект, как и в случае с *blood*, получается из-за повышенной экспрессии данного ДКП-ретротранспозона у мух линии *piwi*[3].

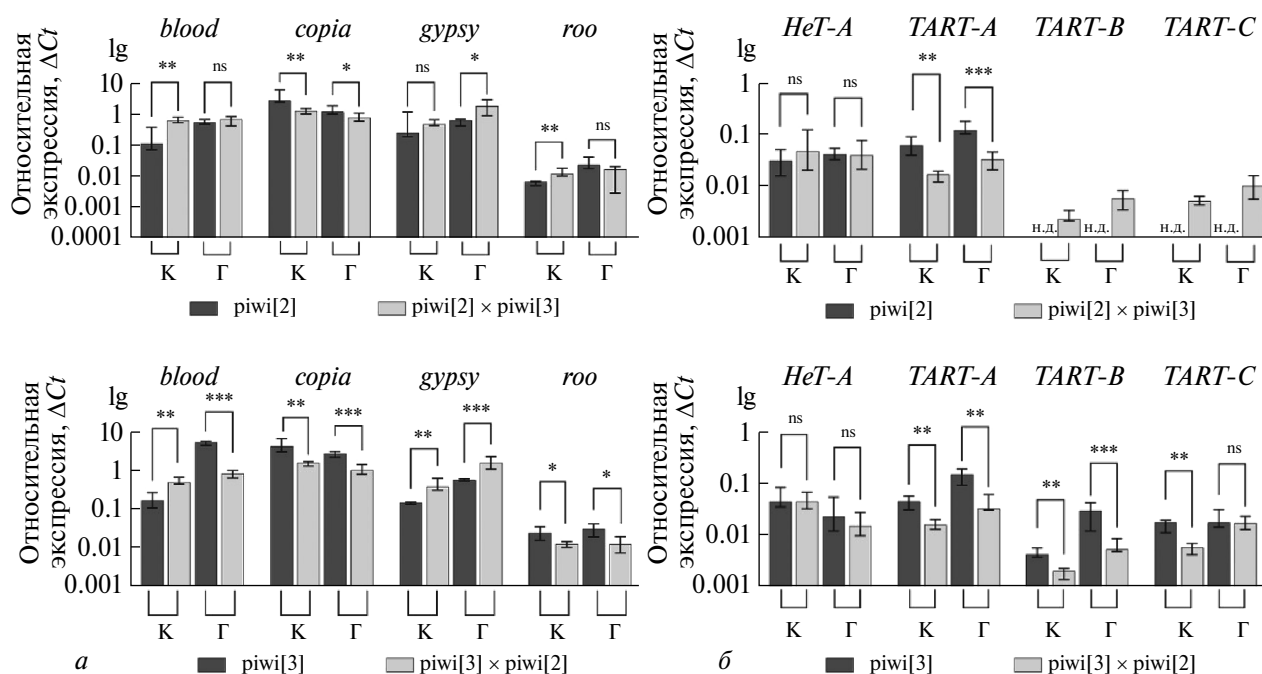


Рис. 3. Логарифм уровня относительной экспрессии ДКП-ретротранспозонов *blood*, *copia*, *gypsy*, *roo* и *Tirant* (а) и теломерных ретротранспозонов *HeT-A*, *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и *HeT-A* (б) в тканях корпуса и головы самок линий *piwi*[2] и *piwi*[3], а также самок F_1 . К — корпус, Г — голова, н.д. — не детектируется, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns — статистически незначимое изменение.

Таким образом, в обоих направлениях скрещиваний мы обнаружили схожие тенденции в экспрессии двух ДКП-ретротранспозонов (*coria* и *gypsy*) в соматических тканях в зависимости от функциональности *piwi*. Это говорит о том, что экспрессия этих двух ретротранспозонов, в отличие от *blood* и *roo*, зависит от *piwi*. Причем более низкая экспрессия *coria* у гибридов не является прецедентом среди других ретротранспозонов. Например, уже описана низкая экспрессия *blood* в голове дрозифилы при мутации *AGO3* [14]. Другие исследователи наблюдали низкую экспрессию ретроэлемента *Helena* в семенниках гибридов относительно родителей при межвидовом скрещивании дрозофил [35]. Однако причин такого поведения ретротранспозонов до сих пор не найдено.

Обнаружено, что экспрессия теломерного ретротранспозона *HeT-A* изменяется вне зависимости от направления скрещивания, а транспозонов *TART-A*, *TART-B* и *TART-C* в соматических тканях гибридов ниже, чем в родительских линиях. Однако в случае последних двух ретротранспозонов такое сравнение можно провести только у потомков от скрещивания ♀*piwi*[3] × ♂*piwi*[2], так как в линии *piwi*[2] экспрессия этих ретротранспозонов практически отсутствует. При этом мы не наблюдали более высокого уровня их экспрессии у гибридов ♀*piwi*[2] × ♂*piwi*[3] относительно ♀*piwi*[3]. Таким образом, почти полное отсутствие функции белка PIWI не приводит к ухудшению контроля данных ретротранспозонов. Тем не менее, в случае с *TART-A* мы наблюдаем статистически значимо более низкую экспрессию в соматических тканях гибридов относительно родителей в обоих направлениях скрещивания, а в случае с *TART-B* и *TART-C* только в направлении ♀*piwi*[3] × ♂*piwi*[2] по причинам, описанным ранее (рис. 3б). Для *HeT-A* результат оказался интересным, так как показано, что экспрессия этого ретротранспозона повышается при мутации *piwi* [36, 37]. Однако данные, приведенные в этих статьях, получены на яичниках. Согласно нашим данным, компануд мутаций *piwi3* и *piwi2* не влияет на экспрессию *HeT-A* в соматических тканях. Такой эффект вполне ожидаем, с учетом того что экспрессия далеко не всех изученных ретротранспозонов повышена в тканях головы при мутациях *AGO3* и *aub* [14].

Экспрессия кластеров при нарушении контроля транспозиции

Кластеры рННК представляют собой скопления дефектных копий ретротранспозонов. Их транскрипция происходит двумя разными путями: однонаправленно либо в двух направлениях в зависимости от типа регуляции класте-

ра. Транскрипты двух разных типов кластеров процессируются каждый по отдельному механизму, однако продукты кластеров обоих типов в конечном итоге используются PIWI для поиска и замалчивания ретротранспозонов в ядре. По современным представлениям, источником транскриптов для процессинга рННК могут быть не только кластеры, но и отдельные последовательности ретротранспозонов [39], однако, так как их анализ технически невозможен, мы использовали кластеры рННК в качестве индикатора изменений транскрипции источников рННК.

Далее был проведен сравнительный анализ экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм кластеров *42AB* (двухцепочечный) и *flamenco* (одноцепочечный) в тканях головы и корпуса (рис. 4). В отличие от направления скрещивания ♀*piwi*[2] × ♂*piwi*[3] (рис. 4а), в направлении скрещивания ♀*piwi*[3] × ♂*piwi*[2] (рис. 4б) мы наблюдали значимое различие в экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм кластера *42AB* у гибридов относительно материнской линии. Этот эффект, как и в случае ретроэлементов *roo* и *blood*, можно объяснить высокой экспрессией *42AB* у *piwi*[2]. Обе линии *piwi* содержат мутацию на балансерной хромосоме *SyO*, поэтому последовательность кластера *42AB* на этой хромосоме должна быть одинаковой и экспрессироваться с одинаковой силой. Следовательно, кластер *42AB* на хромосоме с мутацией в гене *piwi* в линии *piwi*[2] экспрессируется сильнее, чем на той же хромосоме у *piwi*[3]. У гибридов экспрессия *42AB* в обоих направлениях достигает уровня линии *piwi*[2], так как обе линии несут по одной хромосоме с нормальной копией этого кластера — по одной от каждого родителя.

У остальных двух кластеров изменения не так значительны: либо это более высокая экспрессия в одной из тканей у гибридов, как в случае с *20A* у гибридов ♀*piwi*[2] × ♂*piwi*[3] в голове, либо сниженная экспрессия в нескольких тканях (38C1 в корпусе гибридов ♀*piwi*[3] × ♂*piwi*[2]). Таким образом, самые значимые изменения касаются только кластера *42AB* в одном из направлений скрещивания. Если сопоставлять этот результат с экспрессией ретротранспозонов, то мы видим, что у *piwi*[3] изначально высокая экспрессия *blood* и *roo*, а экспрессия кластера *42AB* — низкая. У гибридов в обоих направлениях экспрессия этих двух транспозонов выше, чем у *piwi*[3], кластер *42AB* экспрессируется выше. Таким образом, мы видим корреляцию в изменении экспрессии кластера и транспозонов.

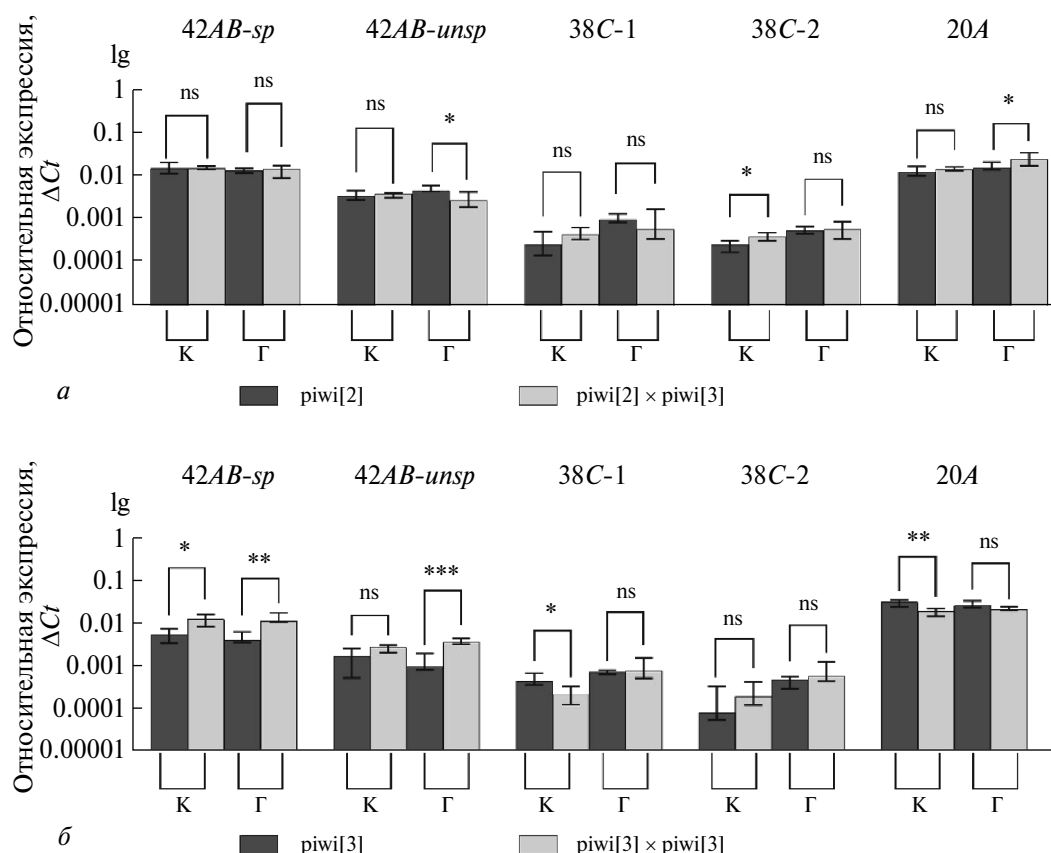


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии (lg) различных кластеров piRNA в тканях корпуса и головы самок линий piwi[2] и piwi[3], а также самок гибридов этих линий. sp — сплайсированные формы, unsp — несплайсированные формы. К — корпуса, Г — головы, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns — статистически незначимое изменение.

Возможно, причина такой корреляции заключается в том, что кластер *42AB* в линии piwi[2] содержит копию *blood* и поэтому участвует в подавлении активности этого ретротранспозона. Описанные эффекты никак не связаны с функциональностью белка PIWI. Таким образом, несмотря на то что метки H3MeK9, которые необходимы для посадки комплекса RDC и дальнейшего преобразования копии ретротранспозона в кластер, должны появляться на участках ДНК благодаря PIWI, дальнейшее поддержание метилирования кластеров от PIWI не зависит.

Далее был измерен уровень сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов кластеров *flamenco* и *42AB* в тканях яичников, головы и корпуса семидневных самок имаго линий Canton-S, SS7K, а также в тканях ЦНС личинок 3-го возраста этих же линий (рис. 5).

Для линии Canton-S характерно присутствие только несплайсированных форм кластера *flamenco* в тканях яичников имаго и ЦНС личинок. Линия с нарушением контроля транскрипции содержит сплайсированные транскрипты в яичниках и ЦНС личинок. Несплай-

сированная форма транскрипта кластера *42AB* присутствует во всех тканях, однако его сплайсированная форма представлена в основном в соматических тканях всех линий, причем самая высокая экспрессия наблюдается в нервной ткани имаго и личинок.

Измерив экспрессию кластеров *20A* и *38C*, мы обнаружили, что экспрессия кластера *20A* значительно выше в линии с нарушением контроля *flamenco*, чем в линии дикого типа. Наибольший уровень экспрессии кластера *38C* обнаружен в яичниках и ЦНС личинок.

Трудно вывести закономерность, которая связывает разницу в экспрессии ретротранспозонов в соматических тканях и экспрессию кластеров. Однако, принимая во внимание работу отдельных генов, участников piRNA-интерференции, можно предположить, что активность ретротранспозонов в этих тканях регулируются с участием отдельных компонентов системы piRNA-интерференции. Также мы не исключаем, что большая часть транскриптов кластеров может направляться в этих тканях на путь siRNA-интерференции, что показано для *42AB* и *flamenco* в голове дрозофилы [37].

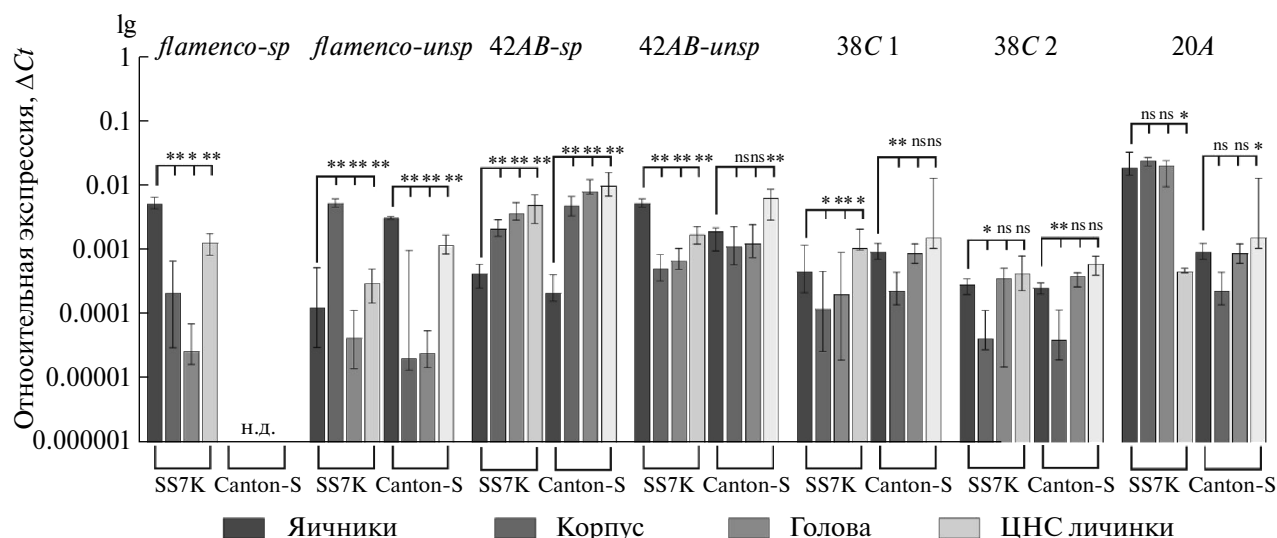


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии (lg) различных кластеров piRNA в тканях яичников, головы и корпуса самок SS7K и Canton-S. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; ns — статистически незначимое изменение, н.д. — не детектируется.

Позиции копий ретротранспозонов в геномах линий SS7K и Canton-S и наличие сайтов связывания транскрипционных факторов

С целью оценки влияния геномного окружения на тканеспецифичную транскрипцию исследуемых ДКП-ретротранспозонов мы проанализировали геномное окружение новых (уникальных для одного из геномов) инсерций ретротранспозонов в геномах линий SS7K и Canton-S, опираясь на данные нанопорового секвенирования и данные из базы FlyBase. Так как исследуемые копии являются новыми, они потенциально транскрипционно активны. Все найденные нами копии оказались в гетерозиготном состоянии, поэтому лабораторные линии по этим копиям гетерогенны.

Анализ геномного окружения показывает, что лишь некоторые копии как много-, так и малокопийных ретроэлементов, встроены в экспрессирующиеся гены: подавляющее большинство находится в генах с низкой экспрессией либо в межгенном пространстве. Так, 13 новых инсерций ретротранспозонов находятся вне генов в линии SS7K и 35 — вне генов в линии Canton-S (разница в количестве найденных новых инсерций обусловлена различием в покрытии геномов этих линий). Некоторые гены, содержащие, согласно данным FlyBase, инсерции мобильных элементов, экспрессируются на высоком уровне в соматических тканях. При этом не всегда направления транскрипции гена и ретроэлемента совпадают. Только часть найденных новых инсерций ретротранспозонов

находятся в генах, и их направление совпадает с направлением транскрипции сайта инсерции (табл. 2), поэтому механизм тканеспецифичной экспрессии отдельных ретроэлементов за счет коактивации с близлежащими генами — это, скорее, частный случай, нежели правило. Более того, на основании исследования положения новых инсерций ретроэлементов можно сделать вывод, что значительное количество ретроэлементов встраивается в гетерохроматиновые области генома. Подавляющее большинство копий локализовано либо в интронах, либо в межгенном пространстве. По всей видимости, инсерции в кодирующие части генов элиминируются отбором.

Нами также проведен анализ положений инсерций ретротранспозонов, присутствующих (по данным FlyBase) в референсном геноме. Для этого с помощью алгоритма blast был проведен поиск последовательностей исследуемых ретротранспозонов и выбрали те, которые содержали последовательности, анализируемые методом ОТ-ПЦР. Затем отобрали те последовательности, которые находятся в генах, экспрессирующихся в исследуемых тканях, и проверили наличие отобранных инсерций в нуклеотидных последовательностях линий Canton-S и SS7K (табл. 3). При этом наряду с уникальными обнаруживались и поликартированные прочтения, что связано с тем, что анализируемые последовательности не являются уникальными. Примечательно, что у линий SS7K и Canton-S практически все проанализированные инсерции были в гетерозиготном состоянии.

Таблица. 2. Позиции новых инсерций ДКП-ретротранспозонов в геноме линий SS7K и Canton-S и паттерн экспрессии генов, содержащих, согласно базе данных FlyBase, инсерции

Ре- тротранс- позон	Ген	Положение в гене	Коллинеарное направлению транскрипции гена	Экспрессия			
				Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки
SS7K							
blood	Esp	Интрон	Нет	—	—	—	—
	mtt	Интрон	Да	—	—	—	—
	beat-lllc	Интрон	Нет	—	—	—	Средняя
	CG2264 (magu)	Интрон	Да	Выше среднего	Средняя	—	—
	ds	3'НТО	Нет	—	—	—	—
	alpha-Est6	Интрон	Нет	—	—	—	—
copia	Ir42a	Интрон	Нет	—	—	—	—
	IRSp53	Интрон	Нет				
	bnl	Интрон	Нет	—	Средняя	Средняя	—
	CG34353	Интрон	Да	—	—	Средняя	Средняя
	Pde9	Интрон	Нет	—	—	Средняя	—
roo	Ddr	Интрон	Да	—	—	—	—
	CG11221 (meng-po)	Интрон	Да	—	—	—	—
	PAPLA1	5'НТО	Да	Выше среднего	Средняя	Выше среднего	Средняя
	CG42818	После гена	Да	—	—	—	—
	CG6380	Перед геном	Нет	—	—	—	—
	kel	Интрон	Нет	Средняя	—	—	Средняя
	Gprk1	Интрон	Нет	Высокая	Средняя	Выше среднего	Высокая
	Fmo-2	Интрон	Нет	—	Выше среднего	Выше среднего	—
	CR44201	После псевдогена	Да	—	—	—	—
	CG9003	Интрон	Да	Выше среднего	Средняя	Выше среднего	Высокая
	rgn	Интрон	Да	Средняя	Высокая	Высокая	Высокая
	Nlg3	Интрон	Да	—	—	Средняя	—
	CG6040	После гена	Да	—	—	—	—
	CG42331	Интрон	Нет	—	—	—	—
	CR31084	Интрон	Да	—	—	—	—
	Rya-R	Интрон	Нет	—	—	—	—
	CaMK	5'НТО	Да	Выше среднего	—	—	Средняя
	CG11380	Интрон	Да	—	—	—	—
	dnc	Интрон	Нет	Выше среднего	Средняя	Средняя	Выше среднего
	CG43921 (hwt)	Интрон	Нет	—	—	Средняя	Выше среднего
	goe	Интрон	Да	Средняя	Средняя	Выше среднего	Выше среднего
	CG1504	Интрон	Нет	—	—	—	—
Tirant	cactus	3'НТО	Нет	Очень высокая	Выше среднего	Выше среднего	Выше среднего
	Nuak	Интрон	Нет	—	Средняя	—	Средняя

Таблица 2. Продолжение

Ре- тротранс- позон	Ген	Положение в гене	Колинеарное направлению транскрипции гена	Экспрессия			
				Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки
Canton-S							
blood	<i>pelo</i>	Интрон	Нет	Выше среднего	Средняя	—	Средняя
	<i>CG44153</i>	Интрон	Да	—	—	—	—
	<i>dpr2</i>	Интрон	Нет	—	—	—	—
	<i>Samuel</i>	Интрон	Нет	—	—	—	—
	<i>PzI</i>	Интрон	Нет	—	—	—	—
	<i>Atg17</i>	Интрон	Нет	Высокая	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>hth</i>	Интрон	Нет	—	Средняя	Выше среднего	Выше среднего
	<i>CG6678</i>	Интрон	Нет	—	—	—	—
	<i>CG32521 (Mnr)</i>	Интрон	Да	Средняя	Очень высокая	Очень высокая	Высокая
copia	<i>CG15431</i>	Интрон	Да	—	—	—	—
	<i>CG17684</i>	Интрон	Да	—	—	—	—
	<i>SLO2</i>	Интрон	Нет	—	—	—	—
	<i>Pdk1</i>	Инторн	Нет	Выше среднего	Средняя	Средняя	Выше сред- него
	<i>dpr6</i>	Интрон	Да	Средняя	—	—	—
	<i>CG45782 (lovit)</i>	Интрон	Нет	—	—	Выше среднего	—
gypsy	<i>CG42346</i>	Интрон	Нет	—	—	—	—
roo	<i>Wdr62</i>	Интрон	Нет	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>CG15631</i>	Экзон	Да	—	—	—	—
	<i>smog</i>	Интрон	Нет	—	—	Средняя	Выше среднего
	<i>Snoo</i>	Интрон	Да	—	—	—	Средняя
	<i>Shawl</i>	Интрон	Нет	—	—	—	Средняя
	<i>Trim9</i>	Интрон	Нет	—	—	—	Средняя
	<i>Pkn</i>	Интрон	Да	Средняя	—	Средняя	Средняя
	<i>SLO2</i>	Интрон	Нет	—	—	Средняя	Средняя
	<i>CG33144</i>	Интрон	Нет	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>CG30015</i>	Интрон	Да	—	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>sprt</i>	Интрон	yes	—	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>Oaz</i>	Интрон	Нет	—	—	—	—
	<i>Kank</i>	Интрон	Нет	—	—	—	—
	<i>bru3</i>	Интрон	Нет	—	—	Выше среднего	Высокая
	<i>bmm</i>	Интрон	Да	Выше среднего	Выше среднего	Выше среднего	Средняя
	<i>CG45782 (lovit)</i>	Интрон	Нет	—	—	Выше среднего	—
	<i>pb</i>	Интрон	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	—	—	—	—

Таблица 2. Окончание

Ретротранс- позон	Ген	Положение в гене	Колинеарное направлению транскрипции гена	Экспрессия			
				Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки
	<i>Dys</i>	Инtron	Нет	—	—	—	Средняя
	<i>Ire1</i>	Инtron	Нет	Средняя	—	—	Средняя
	<i>CG3822 (KaiR1D)</i>	Инtron	Да	—	—	—	Средняя
	<i>CG13606</i>	Инtron	Нет	—	—	Средняя	Средняя
	<i>Rya-R</i>	Инtron	Нет	—	—	—	—
	<i>CG3777</i>	3'НТО	Да	—	—	—	Средняя
	<i>CG43867</i>	Инtron	Нет	—	—	—	—
	<i>CR44779</i>	внутри гена	Нет	—	—	—	Выше среднего
	<i>futsch</i>	Инtron	Да	—	—	Выше среднего	Средняя
	<i>kirre</i>	Инtron	Нет	—	—	—	—
	<i>dnc</i>	Инtron	Да	—	Средняя	Средняя	Средняя
	<i>CG15894</i>	Инtron	Да	—	—	—	—
	<i>cyr</i>	5'НТО	Да	—	—	—	—
	<i>nAChR alpha3</i>	Инtron	Нет	—	—	—	Средняя
	<i>Ten-a</i>	Инtron	Да	—	—	Средняя	Выше среднего

Примечание. НТО – нетранслируемая область гена. — отсутствие/низкая экспрессия гена.

Таблица 3. Сравнение референсного генома и геномов SS7K и Canton-S по наличию инсерций в генах, которые, согласно базе данных FlyBase, экспрессируются в исследуемых тканях

Положение ретротранспозона		Экспрессия				Линия	
Положение в геноме	Колинеарно направлению транскрипции	Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки	SS7K	Canton-S
<i>coria</i>							
<i>CG3726</i> (интрон)	Нет	Средняя				+	+
<i>tos</i> (интрон)	Нет	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя	+	+
<i>for</i> (интрон)	Нет	Высокая	Выше среднего	Средняя		+	+
<i>Ir40a</i> (интрон)	Да					+	+
<i>CadN2</i> (интрон)	Да					+	+
после <i>CG44623</i> (500 н).	Нет						
<i>mbl</i> (интрон)	Нет			Средняя	Средняя	+	+
<i>Nipped-A</i> (интрон)	Нет	Средняя			Средняя	+	+
<i>sallimus</i>	Да	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.		
<i>bbg</i> (интрон)	Нет				Средняя	+	+
<i>Snap25</i> (интрон)	Нет		Средняя	Очень высокая	Средняя	+	+
<i>Lasp</i> , <i>CG43954</i> (интрон)	Нет	Очень высокая, очень высокая	Выше среднего, выше среднего	Средняя, средняя	Выше среднего, Выше среднего	+	+
<i>Eip63E</i> (интрон)	Да	Средняя			Средняя	+	+
<i>Myo81F</i>	Нет						
<i>beat-Vb</i>	Нет						

Таблица 3. Продолжение

Положение ретротранспозона		Экспрессия				Линия	
Положение в геноме	Колинеарно направлению транскрипции	Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки	SS7K	Canton-S
<i>CG34347</i> (интрон)	Да				Средняя	+	+
<i>Gprk2</i> (интрон)	Нет	Средняя		Средняя	Выше среднего	+	+
<i>roo</i>							
<i>CenG1A</i> (интрон)	Нет	Средняя		Средняя	Выше среднего	+	+
<i>Acox3</i>	Нет						
<i>dpr2</i>	Нет						
<i>osp</i> (интрон)	Да	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя	+	+
<i>rdo</i>	Нет						
<i>CG2528</i>	Да						
<i>ds</i>	Да						
<i>Agpat2</i> (интрон)	Нет	Выше среднего				+	+
<i>Lar</i> (интрон)	Да			Средняя	Средняя	+	+
<i>Acox3</i> (интрон)	Нет					+	+
<i>Wnt6</i>	Да						
<i>TrissinR</i>	Нет						
<i>dpr3</i> (интрон)	Да			Выше среднего	Средняя	+	+
<i>CG13954</i>	Да						
<i>KCNQ</i>	Да						
<i>CG42663</i> (интрон)	Да				Средняя	+	+
<i>sca</i> (интрон)	Нет				Средняя	+	+
<i>Prosap</i> (интрон)	Да	Выше среднего		Средняя	Средняя	+	+
<i>bs</i> (интрон)	Да	Средняя				+	+
<i>pk</i> (интрон)	Нет				Средняя	+	+
<i>GEFmeso</i>	Нет						
<i>MFS17</i>	Нет						
<i>luna</i>	Да						
<i>CG43867</i> (интрон)	Нет		Очень высокая	Средняя	Выше среднего	+	+
<i>CR44779</i>	Да						
<i>AstA-R1</i>	Да						
<i>rdgA</i> (интрон)	Да		Средняя	Высокая	Средняя	+	+
<i>pdgy</i> (интрон)	Нет	Выше среднего	Выше среднего	Средняя	Средняя	+	+
<i>stnA</i> (интрон)	Нет			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> (интрон)	Да	Средняя		Средняя	Средняя	+	+
<i>X11Lβ</i> (интрон)	Нет			Средняя	Выше среднего	+	+
<i>CG43759</i> (интрон)	Нет	Средняя			Средняя	+	+

Таблица 3. Продолжение

Положение ретротранспозона		Экспрессия				Линия	
Положение в геноме	Колинеарно направлению транскрипции	Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки	SS7K	Canton-S
<i>shakB</i>	Нет						
<i>dnc</i> (интрон)	Нет		Средняя	Средняя	Средняя	+	+
<i>tup</i> (интрон)					Средняя	+	+
<i>PzI</i>	Да						
<i>CG45263</i>	Нет						
<i>CG31221</i> (интрон)	Да			Высокая	Средняя	+	+
<i>SKIP</i> (интрон)	Нет	Выше среднего			Выше среднего	+	+
<i>LpR2</i> (интрон)	Да	Очень высокая	Очень высокая	Высокая	Выше среднего	+	+
<i>α4GT2</i>	Да						
<i>plum</i> (интрон)	Нет				Выше среднего	+	+
<i>heca</i> (интрон)	Да	Средняя			Очень высокая	+	+
<i>Myo81F</i>	Да						
<i>5-HT2B</i>	Нет						
<i>Dop1R1</i>	Нет						
<i>CG34355</i> (интрон)	Да				Средняя	+	+
<i>Rya-R</i>	Да						
<i>CG31038</i> (интрон)	Да			Средняя		+	+
<i>pros</i> (интрон)	Нет			Средняя	Очень вы- сокая	+	+
<i>heph</i> (интрон)	Да	Выше среднего		Средняя	Выше сред- него	+	+
<i>syd</i> (интрон)	Нет	Средняя		Средняя	Средняя	+	+
<i>Rbp6</i> (интрон)	Нет			Высокая	Очень вы- сокая	+	+
<i>Eip75B</i> (интрон)	Нет			Средняя	Высокая	+	+
<i>ftz-f1</i> (интрон)	Да	Выше среднего				+	+
<i>Papss</i> (интрон)	Нет	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя	+	+
<i>Svil</i> (интрон)	Да	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя	+	+
<i>CG42747</i>	Да						
<i>GluRIB</i>	Нет						
<i>bru3</i> (интрон)	Нет			Выше среднего	Выше среднего	+	+
<i>Pka-C3</i> (интрон)	Да		Выше среднего	Выше среднего		+	+
<i>Pc</i> (интрон)	Нет	Выше среднего			Средняя	+	+
<i>Con</i> (интрон)	Да			Средняя	Средняя	+	+
<i>CG43163</i>	Да						
<i>Obp73a</i>	Да						
<i>bab2</i> (интрон)	Нет				Выше среднего	+	+
<i>bma</i> (интрон)	Да			Средняя	Средняя	+	+

Таблица 3. Окончание

Положение ретротранспозона		Экспрессия				Линия	
Положение в геноме	Колинеарно направлению транскрипции	Яичники	Корпус	Голова	ЦНС личинки	SS7K	Canton-S
<i>gypsy</i>							
<i>CG17684</i> (интрон)	Да			Средняя		+	+
<i>Pzl</i>	Да						
<i>Pzl</i>	Нет						
<i>l(3)80Fg</i> (интрон)	Да		Средняя	Высокая	Высокая	+	+
<i>lovit</i> (интрон)	Да			Выше среднего		+	+
<i>Tirant</i>							
<i>CG42534</i>	Нет						
<i>CG42238</i>	Нет						
<i>Cipc</i> (интрон)	Да			Средняя		+	—
<i>SNF4Aγ</i> (интрон)	Нет		Выше среднего			+	+
<i>Raf</i> (интрон)	Нет				Средняя	+	—
<i>CG34417</i> (интрон)	Нет						
<i>CG32486</i> (интрон)	Нет		Выше среднего	Выше среднего	Средняя	+	—
<i>skd</i> (интрон)	Нет	Выше среднего		Средняя	Выше среднего	+	+
<i>Shab</i> (интрон)	Нет			Средняя		+	+
<i>psq</i> (интрон)	Нет	Выше среднего	Средняя	Средняя	Выше среднего	+	—
<i>unc-5</i> (интрон)	Да				Средняя	+	—
<i>chn</i> (интрон)	Да	Средняя		Средняя	Выше среднего		
<i>CG11360</i> (интрон)	Нет			Средняя	Высокая	+	—
<i>raw</i> (интрон)	Да		Средняя	Средняя		+	—
<i>Fs(2)Ket</i> (интрон)	Нет	Высокая	Средняя	Средняя	Высокая	+	+
<i>blood</i>							
<i>dnt</i>	Нет						
<i>CG42329</i> (интрон)	Да						
<i>chinmo</i>	Да				Выше среднего	+	+
<i>CG44153</i> (интрон)	Да						
<i>Tsp39D</i>	Да			Средняя	Выше среднего	+	+
после <i>lncRNA:CR45347</i>	Да						
<i>Plc21C</i> (интрон)	Нет			Средняя	Средняя	+	+
<i>\DIP-λ</i>	Нет						
<i>CG30116</i> (интрон)	Нет			Средняя		+	+
после <i>CG8517</i>	Да						
<i>CG43163</i>	Да						
<i>CG14459</i>	Да						
<i>Myo81F</i> (интрон)	Да				Средняя	+	+
<i>heph</i> (интрон)	Нет	Средняя		Средняя	Выше среднего	+	+
<i>flamenco</i>	Нет						

Как и в случае новых инсерций, мы обнаружили, что ретротранспозоны находятся в межгенном пространстве (85 инсерций исследуемых ретротранспозонов) или интронах, причем направления транскрипции гена и ретротранспозона далеко не всегда совпадают. Мы проверили присутствие в геномах SS7K и Canton-S только тех инсерций, которые находятся в генах, экспрессирующихся в исследуемых тканях, однако ни у одного из исследуемых ретротранспозонов не нашли корреляции положения инсерций с профилем их экспрессии в соматических тканях. Таким образом, экспрессия ретротранспозонов не зависит от их положения в геноме. Однако мы не исключаем, что возможны редкие случаи зависимости экспрессии ретротранспозонов от их положения, но это не является основным механизмом регуляции их активности.

Анализ регуляторных областей уникальных инсерций ретротранспозонов

С помощью базы данных LASAGNA (табл. 4) нами был проведен поиск сайтов связывания транскрипционных факторов (ТФ) в регулятор-

ных последовательностях исследуемых ДКП-ретротранспозонов (ДКП и 3'НТО). После этого мы использовали новые инсерции ретротранспозонов в линиях SS7K и Canton-S для построения выравнивания и проверки консервативности найденных сайтов связывания ТФ. Мы обнаружили, что все ТФ, которые экспрессируются в яичниках, также играют важную роль и в других тканях и участвуют в делении, дифференцировке клеток, эмбриональном развитии и ответе на стресс. Однако, как показано в предыдущих разделах, некоторые ретроэлементы наиболее активно экспрессируются в соматических тканях. Исключением стал ретротранспозон *Tirant*, который экспрессируется только в яичниках. Также нами во всех ДКП-ретроэлементах проведен поиск возможных дополнительных сайтов связывания ТФ, активных в соматических тканях. Мы обнаружили, что такие сайты имеются у всех ретроэлементов. Однако стоит принять во внимание, что консервативность найденных сайтов связывания ТФ у *gypsy* и *Tirant* не удастся проверить с должной точностью, так как эти ретротранспозоны являются малокопийными, поэтому их новых инсерций в анализируемых геномах представлено крайне мало.

Таблица 4. Сайты связывания транскрипционных факторов в исследуемых последовательностях ретротранспозонов

Последовательность	Ретротранспозон	ТФ (номер в базе данных LASAGNA)	Сайт связывания
ТФ, которые отвечают на стресс и экспрессируются во всех тканях			
ДКП	blood	Cf2_II(MA0015.1)	ATATATGCAC ATATATATAT
		dl_1(MA0022.1)	TGGTTTATTACA
		ovo(MA0126.1)	AGAAACGGT
		HSF(M00028)	CGCAT
		HSF(M00163)	CGAAGAGATAAGAAG
		HSF(M00166)	CTACTCGAAGAGATA
	copia	HSF(M00028)	AGAAT
		HSF(M00164)	AGAGTGGTATTCTCT
	gypsy	HSF(M00166)	CCTCGAGCAATGCAT
		Bcd(T00063)	ACCTAATCTCCA
		Lag1(MA0193.1)	CTACTGG
	roo	dl_1(MA0022.1)	TGGGATTTTACA
		h(MA0449.1)	GTCAC TTGAG
		slbo(MA0244.1)	ATTGCTCA
		z(MA0255.1)	ATGAGTCAGT
		C/EBP(T00106)	TTTTTACAAAAACT
		HSF(M00028)	AGAAT
		HSF(M00164)	CGAGTAAAGTCTTCT
	Tirant	Cad(T00079)	AGCATAATGA
		Cad(T00079)	AGCATAATG
		Cad(T00079)	GGCCGAATG
		Deaf1(MA0185.1)	AGCATTCGGCCGGAA
		h(MA0449.1)	GCCACATGCC
		slbo(MA0244.1)	ATTACACA
		HSF(M00028)	CGAAT

Таблица 4. Продолжение

Последовательность	Ретротранспозон	ТФ (номер в базе данных LASAGNA)	Сайт связывания
5'НТО	<i>blood</i>	bcd(MA0212.1)	TAAGCC
	<i>copia</i>	HSF(M00028)	AGAAT
		HSF(M00028)	AGAAT
		HSF(M00028)	AGAAT
		Zeste(M00283)	GAATTTGAGTGAAAA
	<i>roo</i>	Cf2_II(MA0015.1)	ATACACGTAC
		Cf2_II(MA0015.1)	ATATATATAT
		Cf2_II(MA0015.1)	GTGTATATGC
		Cf2_II(MA0015.1)	GTGTATATGC
		HSF(M00164)	AAACAAGAATTTTCT
		HSF(M00166)	CTTAAAGAAGAGAAG
		Tll(T00789)	AGGAAGTCAAATTC
	<i>Tirant</i>	Cad(T00079)	GTCATAATTT
		dl(M00043)	CGGTATGTCCA
		HSF(M00028)	AGAAT
		CF2-II(M00012)	CTATATACA
		CF2-II(M00012)	ATATATGTG
		slbo(MA0244.1)	ATTGCACA
		slbo(MA0244.1)	ATTGCAGA
		Cad(T00079)	GTAATAAAGA
		tll(MA0459.1)	TAAAGCCAAA
		tll(MA0459.1)	AGAAGTCGAC
		CF2-II(M00012)	CTATATGCA
		Dll(MA0187.1)	TAATTAC
ТФ, которые экспрессируются только в соматических тканях			
ДКП	<i>blood</i>	slp1(MA0458.1)	GTGTTTTCTT
		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
5'НТО	<i>blood</i>	run::Bgb(MA0242.1)	AAGCCGCAA
		Optix(MA0199.1)	TGATA
		mirr(MA0233.1)	TGACA
		caup(MA0217.1)	TGACA
	<i>copia</i>	Sd(T02030)	TTGTGAAATAGCTT
		br_Z1(MA0010.1)	CTAATAAACAATTA
		br_Z4(MA0013.1)	TAATAAACAAT
		br_Z4(MA0013.1)	TTGTGAATTAA
	<i>roo</i>	caup(MA0217.1)	TAACA
		CG4328(MA0182.1)	CTTATGG
		Hmx(MA0192.1)	TTAATCG
		NK7.1(MA0196.1)	CTAATAG
		NK7.1(MA0196.1)	CTAATAG
		pan(MA0237.1)	CTTTGGTA
slp1(MA0458.1)	CTGTTTATCCA		

Таблица 4. Окончание

Последовательность	Ретротранспозон	ТФ (номер в базе данных LASAGNA)	Сайт связывания
	<i>Tirant</i>	Adf-1(M00171)	GCGCTGACGTGGAATC
		vvl(MA0254.1)	TATGCA
		CG4328(MA0182.1)	CCTATTA
		br_Z1(MA0010.1)	CTAGTAAACAAGAA
		Su(H)(M00234)	ACCGTGGTAAACA
		Su(H)(MA0085.1)	CCGTGGTAAACAAACA

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проведен анализ экспрессии основных генов-участников *piRNA*-интерференции в генеративных и соматических тканях дрозофилы и показано, что из соматических тканей система *piRNA*-интерференции наиболее активно работает в ЦНС личинок. При этом в голове взрослых мух мы наблюдали низкую экспрессию этих генов, что соответствует данными транскриптомного анализа, приведенным в базе FlyBase. Однако согласно данным анализа экспрессии этих генов в отдельных клетках головы дрозофилы, гены-участники *piRNA*-интерференции экспрессируются не в цельных тканях головы, а в отдельных нейронах [14].

Считается, что в соматических тканях основную роль в подавлении активности ретротранспозонов играет *siRNA*-интерференция [40]. Однако мы наблюдали повышенную экспрессию отдельных ретротранспозонов в соматических тканях взрослых мутантных мух с нарушением работы генов системы *piRNA*-интерференции. Следовательно, можно предполагать, что паттерны экспрессии ретротранспозонов регулируются в том числе и системой *piRNA*-интерференции и закладываются во время эмбриогенеза. Если система *piRNA*-интерференции нарушается, то система *siRNA*-интерференции, вероятно, не может компенсировать ее отсутствие.

Экспрессия теломерных ретроэлементов LINE в соматических тканях осталась неизменной у гибридов в обоих направлениях скрещивания относительно материнских линий в случае *HeT-A* и снизилась в случае элементов *TART*. Примечательно, что регуляция теломерных ретротранспозонов зависит от комплекса RDC (комплекс, осуществляющий инициацию транскрипции двухцепочечных кластеров), *aub* и *armi*. Два последних белка связаны не только с циклом “пинг-понг”, но и процессом передачи *piRNA* из цикла PIWI для последующей инактивации ретротранспозонов на уровне транскрипции [41]. Однако наши результаты свидетельствуют о том, что снижение транскрипции отдельных теломерных LINE в соматических

тканях, вероятно, не связано с нарушением работы PIWI, и можно сделать предположение об активации альтернативных путей контроля экспрессии ретротранспозонов.

Также мы показали, что у мутантов по гену *piwi* наблюдается изменение уровня экспрессии ДКП-ретротранспозонов в соматических тканях. Это мы наблюдали для *gypsy* и *copia* при почти полном отсутствии функции гена *piwi* (в гибридах от скрещивания линий с мутацией в гене *piwi*). Таким образом, ген *piwi* определяет экспрессию отдельных ретроэлементов в соматических тканях. Несмотря на то что PIWI является белком, необходимым для гетерохроматинизации участков генома, содержащих последовательности мобильных элементов, и формирования кластеров *piRNA*, при нарушении функции PIWI экспрессия любых типов кластеров, двухцепочечных и одноцепочечных, остается практически неизменной. На линиях Canton-S и SS7K мы показали, что экспрессия кластера *flamenco* происходит в основном в яичниках и ЦНС личинок. В соматических тканях имаго, кроме корпусов линии SS7K, экспрессия этого кластера значительно ниже, чем в яичниках, поэтому можно сделать вывод, что *flamenco* экспрессируется только тканях с активным делением клеток. Высокая экспрессия в ЦНС также характерна и для других кластеров, что согласуется с данными о роли отдельных компонентов системы *piRNA*-интерференции, полученными другими исследователями [5].

Одной из причин, по которой ретроэлементы способны поддерживать высокий уровень экспрессии в соматических тканях, может быть наличие сайтов связывания различных ТФ. При этом эффекты, связанные с положением копии ретроэлемента в геноме, оказываются минимальными и коэкспрессия с близлежащими генами — это лишь частный случай, так как копий, расположенных в генах координатно направлению транскрипции этих генов, гораздо меньше, чем других вариантов положений новых копий в геноме исследуемых линий. Известно, что ДКП различных ретроэлементов способны с разной силой активировать ген-ре-

портер за счет промоторных последовательностей, и последовательность ДКП *coria* является слабой [42]. В нашей работе обнаружено, что сайтов связывания ТФ у этого ретроэлемента гораздо меньше, чем у остальных.

Система piРНК-интерференции не просто сдерживает транспозиционную активность ретроэлементов в клетках зародышевой линии, но и задает паттерн экспрессии ретроэлементов в соматических тканях, не позволяя ретроэлементам чрезмерно влиять на работу генов в эмбриогенезе и активироваться с помощью собственных сайтов связывания ТФ. Эта система является важнейшим механизмом в формировании органов и тканей, однако ее роль требует дальнейших исследований и детализации.

Работа поддержана грантом 13-1-21 “Молекулярно-генетические механизмы нестабильности генома и мутагенеза у животных и человека”. Номер ЦИТИС: 121032500085-3.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Théron E., Dennis C., Brasset E., Vauray 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.
- Qi H., Watanabe T., Ku H.-Y., Liu N., Zhong M., Lin H. (2011) The Yb Body, a major site for Piwi-associated RNA biogenesis and a gateway for Piwi expression and transport to the nucleus in somatic cells. *Biol. Chem.* **286**, 3789–3797. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.193888>
- Dumesic P.A., Natarajan P., Chen C., Drinnenberg I.A., Schiller B.J., Thompson J., Moresco J.J., Yates J.R., Bartel D.P., Madhani H.D. (2013) Stalled spliceosomes are a signal for RNAi-mediated genome defense. *Cell*. **152**, 957–968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.046>
- 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>
- Wakisaka K.T., Tanaka R., Hirashima T., Murao Y., Azuma Y., Yoshida H., Ichianagi K., Ohno S., Itoh M., Yamaguchi M. (2019) Novel roles of *Drosophila* FUS and Aub responsible for piRNA biogenesis in neuronal disorders. **1708**, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.028>
- 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>
- 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>
- Chang Y.-H., Dubnau J. (2019) The gypsy endogenous retrovirus drives non-cell-autonomous propagation in a *Drosophila* tdp-43 model of neurodegeneration. *Curr. Biol.* **29**, 3135–3152.e4. doi: 10.1016/j.cub.2019.07.071
- Onishi R., Sato K., Murano K., Negishi L., Siomi H., Siomi M.C. (2020) Piwi suppresses transposition of Brahma-dependent transposons via Maelstrom in ovarian somatic cells. *Sci. Adv.* **6**(50), eaaz 7420. doi: 10.1126/sciadv.aaz7420
- Muerdter F., Guzzardo P.M., Gillis J., Luo Y., Yu Y., Chen C., Fekete R., Hannon G.J. (2013) A genome-wide RNAi screen draws a genetic framework for transposon control and primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Mol. Cell*. **50**, 736–748. doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.006
- Stolyarenko A.D. (2020) Nuclear argonaute *Piwi* gene mutation affects rRNA by inducing rRNA fragment accumulation, antisense expression, and defective processing in *Drosophila* ovaries. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1119. <https://doi.org/10.3390/ijms21031119>
- Kim K.W. (2019) PIWI proteins and piRNAs in the nervous system. *Mol. Cells*. **42**, 12, 828–835. doi: 10.14348/molcells.2019.0241
- Kim K.W., Tang N.H., Andrusiak M.G., Wu Z., Chisholm A.D., Jin Y. (2018) A neuronal piRNA pathway inhibits axon regeneration in *C. elegans*. *Neuron*. **97**, 511–519.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.014>
- 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>
- Ross R.J., Weiner M.M., Lin H. (2014) PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*. **505**, 353–359. <https://doi.org/10.1038/nature12987>
- Zuo L., Wang Z., Tan Y., Chen X., Luo X. (2016) piRNAs and their functions in the brain. *Int. J. Hum. Genet.* **16**(1-2), 53–60. doi:10.1080/09723757.2016.11886278
- Nampoothiri S.S., Rajanikant G.K. (2017) Decoding the ubiquitous role of microRNAs in neurogenesis. *Mol. Neurobiol.* **54**, 2003–2011. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9797-2>
- Trizzino M., Kapusta A., Brown C.D. (2018) Transposable elements generate regulatory novelty in a tissue-specific fashion. *BMC Genomics*. **19**, 468. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4850-3>

19. 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* (Basel). **9**, 25. <https://doi.org/10.3390/biology9020025>
20. Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э. К. (2020) Участие мобильных элементов в нейрогенезе. *Вавиловский журн. генетики и селекции*. **24**, 2, 209–218.
21. Villanueva-Cañás J.L., Horvath V., Aguilera L., González J. (2019) Diverse families of transposable elements affect the transcriptional regulation of stress-response genes in *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Acids Res.* **47**(13), 6842–6857. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz490>
22. Senft A.D., Macfarlan T.S. (2021) Transposable elements shape the evolution of mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **22**(11), 691–711. doi: 10.1038/s41576-021-00385-1
23. 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*. *Генетика*. **25**(10), 1747–1756.
24. Hafer N., Schedl P. (2006) Dissection of larval CNS in *Drosophila melanogaster*. *J. Vis. Exp.* **1**, 85. doi: 10.3791/85
25. 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>
26. Sayers E.W., Bolton E.E., Brister J.R., Canese K., Chan J., Comeau D.C., Connor R., Funk K., Kelly C., Kim S., Madej T., Marchler-Bauer A., Lanczycki C., Lathrop S., Lu Z., Thibaud-Nissen F., Murphy T., Phan L., Skripchenko Y., Tse T., Wang J., Williams R., Trawick B.W., Pruitt K.D., Sherry S.T. (2022) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucl. Acids Res.* **50**(D1), D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
27. Нефедова Л.Н., Урусов Ф.А., Романова Н.И., Шмелькова А.О., Ким А.И. (2012) Исследование транскрипционной и транспозиционной активности ретротранспозона *Tirant* в линиях *Drosophila melanogaster*, мутантных по локусу flamenco. *Генетика*. **48**(11), 1271–1271. <https://doi.org/10.1134/S1022795412110063>
28. Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**(1), 24–26. doi: 10.1038/nbt.1754
29. 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. *Mol. Cell.* **80**, 915–928.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.024>
30. 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., Celnik S.E. (2002) The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biol.* **3**(12), RESEARCH0084. doi: 10.1186/gb-2002-3-12-research0084
31. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Unipro (2012) UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. **28**, 1166–1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091
32. Gramates L.S., Agapite J., Attrill H., Calvi B.R., Crosby M.A., Dos Santos G., Goodman J.L., Goutte-Gattat D., Jenkins V.K., Kaufman T., Larkin A., Matthews B.B., Millburn G., Strelets V.B.; the FlyBase Consortium. (2022) FlyBase: a guided tour of highlighted features. *Genetics*. **220**(4), iyac035. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac035>
33. 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>
34. Mani S.R., Megosh H., Lin H. (2014) PIWI proteins are essential for early *Drosophila* embryogenesis. *Develop. Biol.* **385**, 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.017>
35. Romero-Soriano V., Guerreiro M.P.G. (2016) Expression of the retrotransposon helena reveals a complex pattern of TE deregulation in *Drosophila* hybrids. *PLoS One*. **11**, e0147903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147903>
36. Wang S.H., Elgin S.C. (2011) *Drosophila* Piwi functions downstream of piRNA production mediating a chromatin-based transposon silencing mechanism in female germ line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**(52), 21164–21169. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107892109>
37. 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. USA*. **108**(46), 18760–18765. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106676108>
38. 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. *Mol. Cell.* **81**(19), 3965–3978.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2021.07.011
39. Chung W.-J., Okamura K., Martin R., Lai E.C. (2008) Endogenous RNA interference provides a somatic defense against drosophila transposons. *Curr. Biol.* **18**, 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.05.006>
40. Carthew R.W., Sontheimer E.J. (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. **136**, 642–655. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035
41. Cacchione S., Cenci G., Raffa G.D. (2020) Silence at the end: how drosophila regulates expression and transposition of telomeric retroelements. *J. Mol. Biol.* **432**, 4305–4321. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.06.004>

42. Palazzo A., Lorusso P., Miskey C., Walisko O., Gerbino A., Marobbio C.M.T., Ivics Z., Marsano R.M. (2019) Transcriptionally promiscuous “Blurry” promoters in Tc1/mariner transposons allow transcription in distantly related genomes. *Mobile DNA*. **10**, 13. <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0155-6>

Regulation of Retrotransposons in *Drosophila melanogaster* Somatic Tissues

P. A. Milyaeva^{1, 2}, I. V. Kukushkina¹, A. R. Lavrenov^{1, 3}, I. V. Kuzmin¹, A. I. Kim^{1, 2},
and L. N. Nefedova^{1, *}

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

² Faculty of Biology, Longgang District, Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen 518172 China

³ Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: nefedova@mail.bio.msu.ru

Regulation of retrotransposon activity in somatic tissues is a complex mechanism that is still not studied in details. It is strongly believed that siRNA interference is main mechanism of retrotransposon activity regulation outside the gonads, but recently was demonstrated that piRNA interference participates in retrotransposon repression during somatic tissue development. In this work, using RT-PCR, we demonstrated that during ontogenesis piRNA interference determinates retrotransposon expression level on imago stage and retrotransposons demonstrate tissue-specific expression. The major factor of retrotransposon tissue-specific expression is presence of transcription factor binding sites in their regulatory regions.

Keywords: retrotransposons, nanopore sequencing, *Drosophila melanogaster*, flamenco phenotype