

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА КИШЕЧНИКА У ИМАГО *Drosophila melanogaster* С НОКДАУНОМ ГЕНА *Gagr*, ДОМЕСТИЦИРОВАННОГО ГЕНА *gag* ЭРРАНТИВИРУСОВ

© 2024 г. М. Л. Никитина^а, П. А. Миляева^а, И. В. Кузьмин^а, Л. Н. Нефедова^{а, *}

^аБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

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

Поступила в редакцию 08.11.2023 г.

После доработки 01.12.2023 г.

Принята к публикации 07.12.2023 г.

В результате молекулярной доместикации гена *gag* эррантивировусов в геноме *Drosophila melanogaster* сформировался ген *Gagr*. Ранее самый высокий уровень транскрипции гена *Gagr* был выявлен в кишечнике, причем транскрипция наиболее эффективно индуцировалась у самок в ответ на добавление в корм персульфата аммония. В представленной работе изучен транскриптом кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* во всех тканях в стандартных условиях и в условиях стресса, вызванного персульфатом аммония. Показано, что в кишечнике самок с нокдауном гена *Gagr* активированы гены антимикробных пептидов, контролируемых сигнальными путями Toll и Imd. Индукция стрессового ответа персульфатом аммония выявила нарушение работы сигнальных путей JAK/STAT и Jnk/MAPK и практически полное отсутствие активации работы путей ответа на стресс эндоплазматического ретикулума и несвернутых белков у особей с нокдауном гена *Gagr*. Полученные данные подтверждают важную роль гена *Gagr* в поддержании гомеостаза и в иммунном ответе.

Ключевые слова: доместикация, ретроэлементы, *gag*, *Drosophila*, стрессовый ответ

DOI: 10.31857/S0026898424030076, EDN: JCKOKP

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярная доместикация последовательностей мобильных элементов может играть значительную роль в образовании новых генов. Случаи молекулярной доместикации ретроэлементов и их последовательностей у беспозвоночных изучены значительно слабее, чем у позвоночных. У *Drosophila melanogaster* на текущий момент известны лишь два доместицированных гена ретроэлементов — *Gagr* (гомолог гена *gag* ретроэлемента группы *gypsy*) и *Iris* (гомолог гена *env* ретроэлемента группы *Sushi-ichi*) [1, 2].

У белка *Gagr* обнаружены следующие белковые партнеры: продукты генов *14-3-Zepsilon*, *Pdi*, *eIF3j*, *CG6013*, *CG3687* [3], четыре из которых (*14-3-Zepsilon*, *Pdi*, *eIF3j*, *CG6013*) имеют высококонсервативные функции у эукариот. Белок *14-3-Zepsilon* является многофункциональным регуляторным белком семейства 14-3-3, представители которого обнаружены у всех эукариот. Этот белок, как правило, служит адаптером для белок-белковых взаимодействий, обеспечивающим тесный контакт между взаимодействующими молекулами или ингибитором, подавляющим активность связанного белка [4]. *Pdi* (дисульфидизомераза) — консервативный редокс-чувствительный шаперон,

имеющийся, по-видимому, у большинства эукариот, чаще всего локализуется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР). *Pdi* может быть задействован в стресс-зависимых каскадах, воспринимая изменение редокс-потенциала [5]. *eIF3j* является одной из субъединиц эукариотического фактора инициации трансляции 3, главная функция которого — обеспечение посадки малой субъединицы рибосомы на мРНК и привлечение других компонентов *eIF3* к малой субъединице рибосомы в нормальных условиях [6] и при IRES-зависимой трансляции (трансляция через сайт внутренней посадки рибосомы, Internal Ribosome Entry Site), которая происходит в условиях острого клеточного стресса [7]. Ген *CG6013* аннотирован в базах данных как ген с неизвестной функцией, имеющий гомологию с геном человека *CCDC124*. Таким образом, продукт гена *Gagr* в составе комплекса с его белковыми партнерами может быть вовлечен в стрессовый ответ [8].

Промотор *Gagr* у *D. melanogaster* содержит сайт связывания транскрипционного фактора кауак пути N-концевых киназ c-Jun, JNK, и два сайта связывания транскрипционного фактора STAT92E сигнального пути Janus-киназы (JAK) и транскрипционного фактора STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) пути JAK/STAT [9].

Экспрессия гена *Gagr* у *D. melanogaster* индуцируется у самок, но не у самцов, индуктором окислительного стресса — персульфатом аммония (APS). При этом также индуцируется экспрессия ряда других стресс-активируемых генов, в том числе *upd3* [9]. Ген *upd3* — один из трех генов цитокинов семейства Unpaired, запускающих путь JAK/STAT через рецептор Domeless [10]; экспрессия *upd3* у *D. melanogaster* индуцируется в ответ на стресс через каскад JNK [11, 12]. Таким образом, ген *Gagr*, по-видимому, интегрирован в регуляторную сеть стрессовых каскадов JAK/STAT и JNK.

С целью выявления сигнальных путей, в которых может быть задействован ген *Gagr*, в настоящей работе сравнили транскриптомы кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* во всех тканях и в контрольной линии в стандартных условиях и при воздействии APS.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии *Drosophila melanogaster* и условия культивирования. В работе использовали следующие линии *D. melanogaster*, полученные из Венского ресурсного центра (VDRС): контрольную линию w^{1118} , линию-драйвер Tub-GAL4 ($y[1]w[1118]; P\{w[+mC]=tubP-GAL4\}LL7 P\{ry[+t7.2]=neoFRT\}82B/TM6B, Tb[1]$), экспрессия *GAL4* у которого контролируется промотором гена тубулина; линию $v107457$, несущую конструкцию $P\{KK109908\}$ для экспрессии под контролем UAS дцРНК, интерферирующей мРНК гена *Gagr* (далее UAS-*Gagr*). Мух культивировали при температуре 25°C на стандартной питательной агаризованной среде. Для индукции интерференции самок линии UAS-*Gagr* скрещивали с самцами драйверной линии Tub-GAL4. Параллельно ставили контроль — самок линии w^{1118} скрещивали с самцами Tub-GAL4. Виргинных самок помещали в пробирки с самцами и оставляли при температуре 27°C на 3 дня. Отбор виргинных самок от скрещиваний Tub-GAL4×UAS-*Gagr* и Tub-GAL4× w^{1118} проводили в возрасте 1 день. Стресс индуцировали путем 24-часовой инкубации мух на среде с 0.1 М APS. В качестве контроля использовали самок, выращенных в стандартных условиях без добавления APS. РНК выделяли из кишечника, собранных после вскрытия самок в фосфатном буфере.

Секвенирование РНК и обработка данных. Выделение тотальной РНК проводили с помощью реактива ExtractRNA (“Евроген”, Россия). Все образцы получали в одном эксперименте в трех повторях; библиотеки готовили параллельно для каждого образца. Концентрацию и целостность РНК оценивали с помощью флуориметрического анализа на приборе Qubit 4 (“ThermoScientific”, США) и капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (“Agilent”, Германия) соответственно.

Библиотеки, специфичные для цепей, были приготовлены с помощью набора для подготовки библиотеки направленных РНК NEBNext Ultra II (“NEB”, США) и секвенированы (100 нуклеотидов, один конец) со средней глубиной 25 млн чтений на образец с помощью NovaSeq 6000 (“Illumina”, США). Считывания низкого качества и адаптер-ные последовательности удаляли (инструмент Trimmomatic, v0.36), затем считывания приводили в соответствие со сборкой первичного генома BDGP6. Подсчитывали уникально выровненные чтения известных экзонов каждого гена с использованием пакета R (среда R). Оценивали отклонение экспрессии каждого из референсных генов (*ppl*, *Tbp*, *Gapdh1*, *tub*, *RPL40*, *SdhA*) в образце, нормированной на значение экспрессии соответствующего гена в контрольной линии без воздействия APS. Отклонения для разных генов в среднем составили ± 0.3 . Анализ дифференциальной экспрессии выполнен с помощью пакета программ DESeq2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>). Дифференциально экспрессирующиеся гены, кодирующие белки, выявлены с порогом значимости $|\log_2 \text{Fold Change}|$ (далее LFC) не менее 0.6, $\text{Padj} < 0.05$. Тепловую карту и кластерный анализ транскриптомов проводили в сервисе SRPLOT (<https://www.bioinformatics.com.cn/srplot>). Сервис Metascape использовали для выявления категорий функционального обогащения дифференциально экспрессирующихся генов и построения кластеров функциональных категорий генов (<http://metascape.org>) [13]. Для анализа пересекающихся выборок генов строили диаграммы Венна (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Поиск обогащения по молекулярной функции, по внутриклеточной локализации и по биологическому процессу проводили с использованием GeneOntology Resource (<https://geneontology.org/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ транскриптомов кишечника самок с нокдауном гена Gagr и контрольных самок

По данным базы FlyBase (<https://flybase.org/>), ген *Gagr* транскрибируется на самом высоком уровне в тканях кишечника относительно других тканей (<https://flybase.org/reports/FBgn0036627#expression>), а по нашим данным, его транскрипция наиболее эффективно индуцируется в ответ на APS, но только у самок [9]. В наших экспериментах мы добавляли APS в корм, следовательно, пищеварительная система первая контактировала с APS и следовало ожидать ее наиболее сильный стрессовый ответ, поэтому для анализа транскриптома была выбрана ткань кишечника самок.

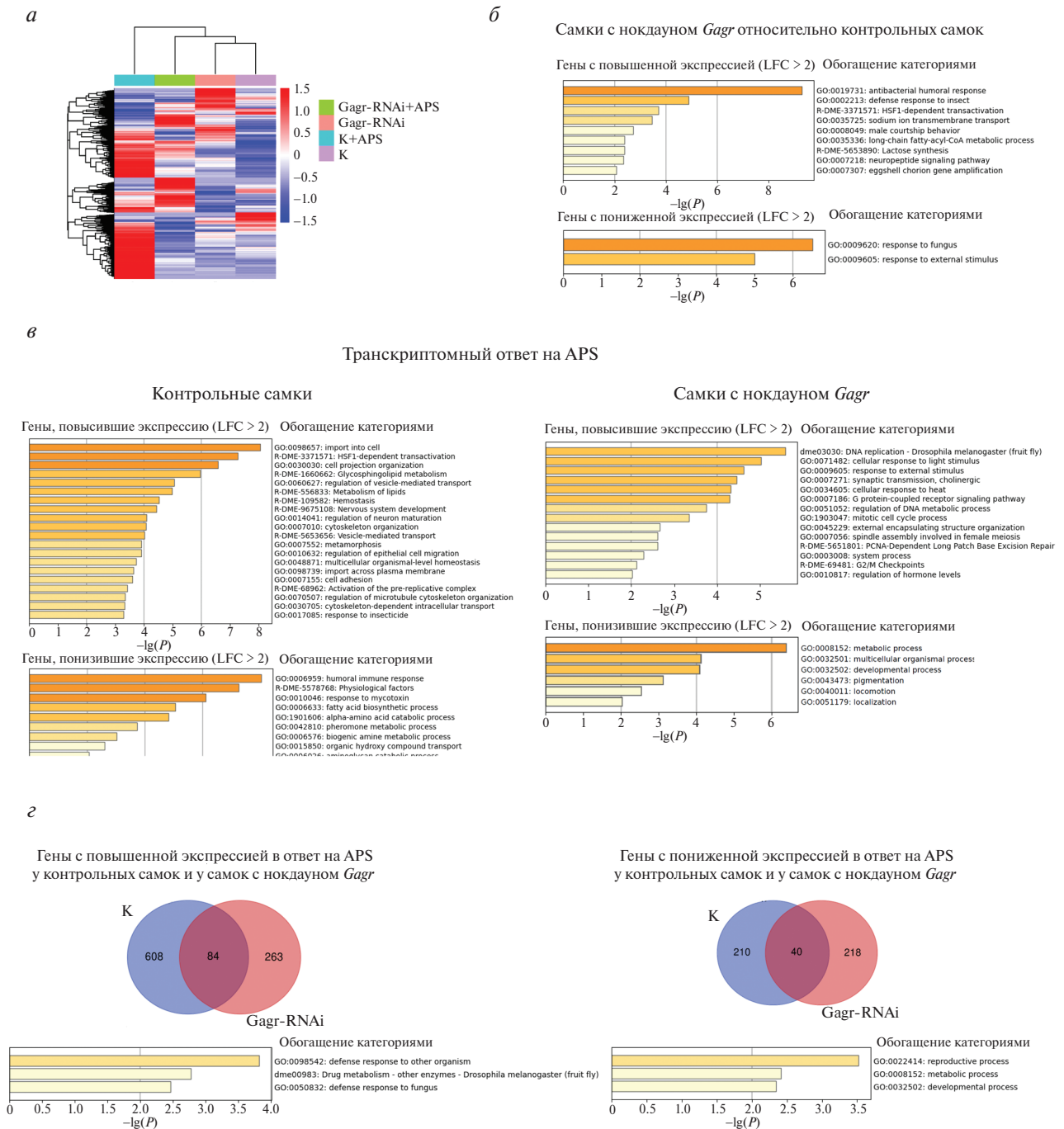


Рис. 1. Сравнительный анализ транскриптомов кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* и контрольных самок. **а** – Тепловая карта и кластерный анализ транскриптомов кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* и контрольных самок, культивированных в стандартных условиях и на среде с APS. **б** – Обогащение функциональными категориями генов с дифференциальной экспрессией ($|LFC| > 2$) в кишечнике самок с нокдауном гена *Gagr* относительно контрольной линии. На шкале абсцисс приведено отрицательное значение десятичного логарифма P -value для данной категории. **в** – Обогащение функциональными категориями генов с повышенной и пониженной транскрипцией при стрессовом ответе ($|LFC| > 2$) у контрольных самок и самок с нокдауном гена *Gagr*. **г** – Диаграммы Венна, показывающие количество общих генов, транскрипция которых изменилась при стрессовом ответе у контрольных самок (К) и самок с нокдауном *Gagr* (Gagr-RNAi), и их обогащение функциональными категориями.

На рис. 1а представлена тепловая карта и результаты кластерного анализа транскриптомов кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* и контрольных самок, культивируемых в стандартных условиях и на среде с APS, полученные с использованием сервиса SRPLOT. Кластерный анализ показал, что по характеру транскрипции генов самки с нокдауном *Gagr* и контрольные самки ближе к друг другу в стандартных условиях, чем в стрессовых.

Сравнительный анализ транскриптомов кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* и контрольных самок выявил более 6000 дифференциально экспрессирующихся генов, экспрессия которых различается более чем в 1.5 раза ($|\text{LFC}| > 0.6$, $\text{Padj} < 0.05$). Поэтому далее мы анализировали обогащение функциональными категориями только тех генов, чья экспрессия различается с порогом $|\text{LFC}| > 2$. В стандартных условиях таких генов оказалось 423; уровень экспрессии 309 из них в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* был как минимум в 4 раза выше, чем в кишечнике контрольных самок, а уровень экспрессии 114 из них в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* был как минимум в 4 раза ниже, чем в кишечнике контрольных самок.

Обогащение функциональными категориями анализировали с помощью сервиса Metascape, использующего для обогащения ресурс Gene Ontology (GO) и базу биологических путей Reactome (<https://reactome.org>) для дрозофилы (R-DME) (рис. 1б). Обогащение GO показало, что гены с повышенным уровнем экспрессии в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* относятся, в основном, к генам защитного ответа, но есть также категории генов метаболических процессов и сигнальных путей. Наиболее значимой, согласно значению *P*-value, является категория генов антибактериального гуморального ответа GO:0019731. К этой категории относятся 33 из 309 генов с повышенной экспрессией. Среди них обнаружены гены антимикробных пептидов *DptA*, *Dro*, *Drsl2*, *Drsl3*, *Drsl4*, *Listericin*, *CecC*, *Def*, *Mtk* (табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/3/supp_Nikitina_rus.zip). Анализ обогащения функциональными категориями генов в базе Reactome выявил две категории генов: R-DME-3371571 и R-DME65653890 – это гены, находящиеся под контролем транскрипционного фактора HSF1, отвечающего на тепловой шок (*Hsp23*, *Hsp68*, *Hsp70Ab*, *Hsp70Aa*, *Hsp70Bb*, *para*, *AttA*, *DptA*), и гены лизоцимов (*LysB*, *LysD*, *LysE*). Примечательно, что гены антимикробных пептидов находятся под контролем сигнальных путей Toll и Imd [14]. Это свидетельствует об активации путей Toll и Imd у мух с подавлением функции гена *Gagr*.

В число генов со сниженным уровнем экспрессии в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* входят гены ответа на внешние стимулы (*GNBP-like3*, *Tsf1*, *Npc2e*, *BomS6*), гены профенолоксидаз (*PPO1* и *PPO2*),

участвующих в процессе меланизации, а также гены семейства *Turandot* (*TotA* и *TotX*), чья экспрессия контролируется сигнальным путем JAK/STAT [15] (табл. S2, см. Дополнительные материалы).

Таким образом, нокдаун гена *Gagr* приводит к изменению характера экспрессии генов, связанных со стрессовым ответом и находящихся под контролем разных сигнальных путей, что свидетельствует о том, что функция гена *Gagr* влияет на функционирование сигнальных каскадов.

Далее мы проанализировали транскриптомный ответ тканей кишечника контрольных самок на стресс. С этой целью сравнили уровни транскрипции генов в кишечнике самок при стрессовом ответе и тех же генов вне стресса. Всего выявлено 946 генов, транскрипция которых изменилась в 4 раза и более. Экспрессия 696 из них повысилась. Эти гены обогащены функциональными категориями, связанными с импортом в клетку, с HSF1-зависимой трансактивацией, метаболизмом липидов, развитием нервной системы и др. (рис. 1в, табл. S3, см. Дополнительные материалы). При этом экспрессия 250 генов в кишечнике контрольных самок снизилась в условиях стресса. Среди основных категорий – гены иммунного ответа и метаболических процессов (табл. S4, см. Дополнительные материалы).

В кишечнике самок с нокдауном *Gagr* выявлено 605 генов, транскрипция которых в ответ на стресс изменилась в 4 раза и более. Из них повысилась экспрессия 347 генов, что примерно в 2 раза меньше, чем у контрольных самок. Примечательно, что эти гены обогащены некоторыми другими функциональными категориями, в том числе связанными с контролем клеточного цикла (рис. 1в, табл. S5, см. Дополнительные материалы). Выявлено снижение экспрессии 258 генов. Их функция связана, главным образом, с метаболическими процессами (табл. S6, см. Дополнительные материалы).

Среди генов с повышенной экспрессией в кишечнике контрольных самок и самок с нокдауном *Gagr* выявлено всего 84 общих гена; это по большей части гены защитного ответа и метаболизма (рис. 1з). Общие гены (40) с пониженной экспрессией, выявленные в кишечнике контрольных самок и самок с нокдауном *Gagr*, обогащены функциональными категориями, имеющими отношение к репродуктивным процессам, развитию и метаболическим процессам (рис. 1з).

Таким образом, и категории генов, и сами гены, дифференциально экспрессирующиеся при стрессовом ответе в кишечнике самок с нокдауном гена *Gagr* и в кишечнике самок контрольной линии, довольно сильно отличаются, свидетельствуя о том, что нарушение функции гена *Gagr* кардинально меняет транскриптомный ответ на стресс. В стандартных условиях выключение гена *Gagr* приводит к повышению экспрессии генов стрессового ответа.

Гены с повышенной экспрессией у контрольных самок,
но не у самок с нокдауном *Gagr*

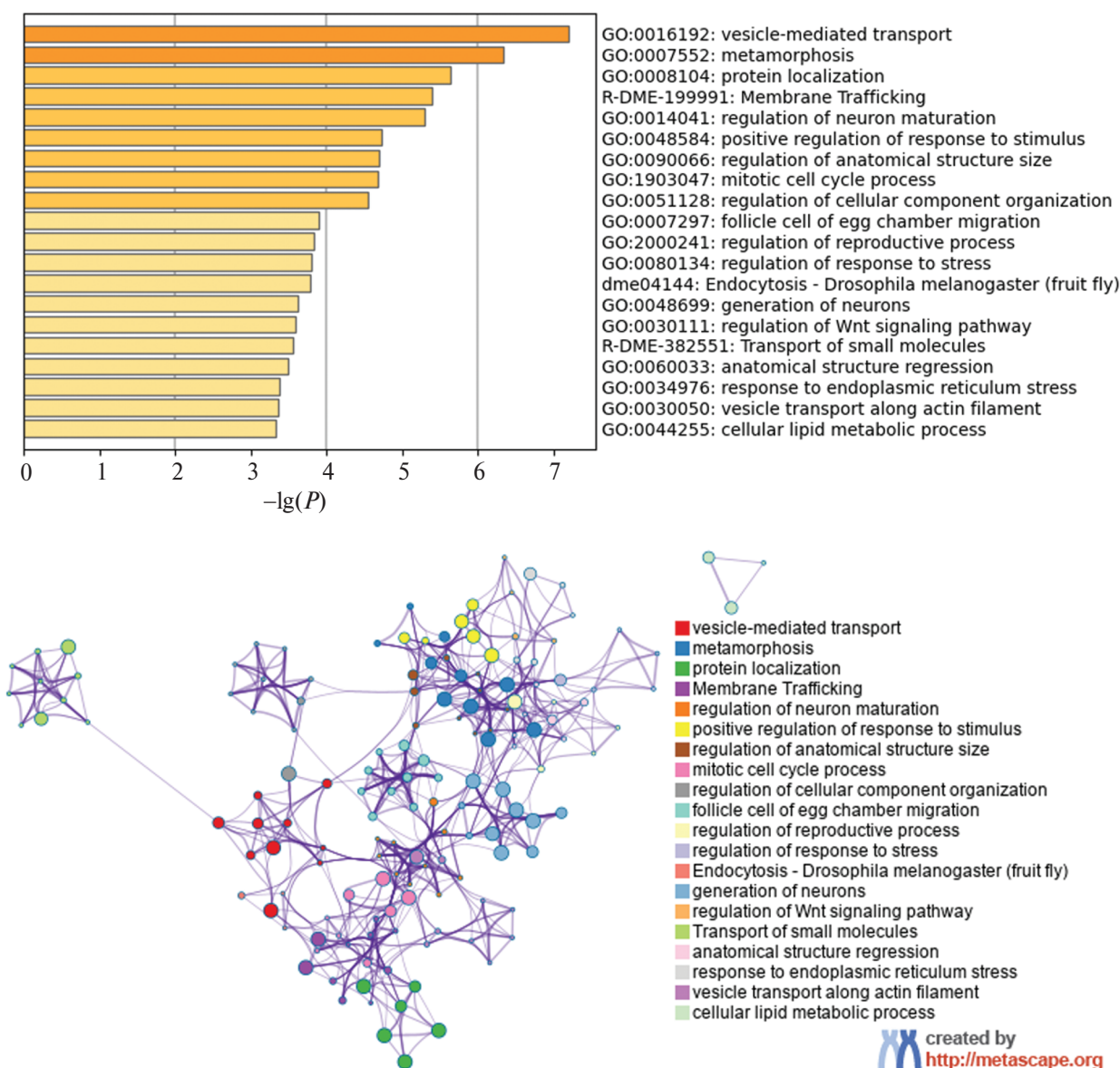


Рис. 2. Обогащение функциональными категориями генов с повышенной транскрипцией ($LFC > 2$) в кишечнике контрольных самок и не изменившими или понизившими транскрипцию в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* ($LFC < 0.5$). Под диаграммой показана кластерная сеть функциональных категорий генов, построенная в программе Metascape (пояснения в тексте).

Однако в стрессовых условиях активация генов происходит в гораздо меньшей степени в линии с нокдауном, чем в контрольной линии.

Далее мы решили выяснить, какие гены активируются при стрессовом ответе в кишечнике самок контрольной линии и не активируются в кишечнике самок с нокдауном *Gagr*. Для этого мы сначала определили число генов, транскрипция которых повысилась более чем в 4 раза в кишечнике контрольных самок, и генов, не отреагировавших индукцией транскрипции или снижением экспрессии

в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* ($LFC < 0.5$) (рис. 2a). Таких генов оказалось всего 208. Из них 41 ген относится к категории генов, чьи функции связаны с везикулярным транспортом, 43 гена — с метаморфозом, 45 генов — с локализацией белков, 21 ген — с регуляцией созревания нейронов, 27 генов — с мембранным транспортом, 30 генов — с позитивной регуляцией ответа на стимулы (рис. 2a, табл. S7, см. Дополнительные материалы).

Сервис Metascape предлагает визуализацию функционального обогащения генов, позволяющую

Таблица 1. Обогащение генов, транскрипция которых повысилась более чем в 2 раза ($LFC > 2$) в кишечнике контрольных самок и не изменилась или понизилась в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* ($LFC < 0.5$), биологическими процессами, молекулярными функциями и клеточной локализацией (согласно Gene Ontology)

Биологический процесс (категория GO)	Обогащение (FE)	P-значение	FDR
Везикулярный транспорт вдоль актиновых филаментов	20.33	7.78E-04	4.73E-02
Негативная регуляция полимеризации микротрубочек	19.36	1.13E-04	1.18E-02
Позитивная регуляция ремоделирования нейронов	19.36	1.13E-04	1.15E-02
Позитивная регуляция ответа на ранение	13.55	6.57E-05	8.45E-03
Позитивная регуляция эндоцитоза	8.95	2.50E-05	4.03E-03
Позитивная регуляция GTPазной активности	8.09	1.28E-05	2.62E-03
Морфогенез конечностей	5.89	7.69E-04	4.78E-02
Миграция пограничных клеток фолликула	5.77	1.19E-04	1.19E-02
Регуляция сигнального пути Wnt	5.59	1.46E-04	1.32E-02
Стрессовый ответ эндоплазматического ретикулула	5.52	4.09E-04	2.98E-02
Регуляция сигнальной трансдукции малыми GTPазами	5.45	4.36E-04	3.10E-02
Эндоцитоз	5.15	7.10E-06	1.68E-03
Регуляция репродуктивных процессов	5.12	1.05E-04	1.17E-02
Регуляция размера клеток	5.07	2.73E-04	2.11E-02
Регуляция развития нервно-мышечных контактов	4.56	5.33E-04	3.58E-02
Транспорт везикул аппарата Гольджи	4.18	4.40E-04	3.09E-02
Митотический цикл	3.85	1.43E-05	2.41E-03
Регуляция катаболических процессов	3.03	5.14E-04	3.48E-02
Липидные метаболические процессы	2.79	2.88E-04	2.19E-02
Позитивная регуляция сигнальной трансдукции	2.67	4.54E-04	3.13E-02
Транспорт белков	2.61	5.71E-04	3.80E-02
Развитие нейронов	2.59	8.73E-05	1.02E-02
Регуляция процессов в многоклеточном организме	2.34	5.95E-04	3.93E-02
Сигнальная трансдукция	2.11	1.05E-04	1.14E-02
Ответ на внешние стимулы	2.11	2.02E-04	1.70E-02
Молекулярная функция (категория GO)	Обогащение (FE)	P-значение	FDR
Двигательная активность цитоскелета	7.82	1.90E-04	2.09E-02
Связывание малых GTPаз	6.84	1.37E-06	8.15E-04
Активация GTPаз	5.65	3.58E-04	3.55E-02
Гидролиз АТР	4.21	4.62E-05	7.24E-03
Связывание липидов	3.37	5.92E-04	5.04E-02
Связывание АТР	2.98	3.80E-07	1.13E-03
Киназная активность	2.78	4.50E-04	4.33E-02
Клеточная локализация (категория GO)	Обогащение (FE)	P-значение	FDR
Аппарат Гольджи	8.47	1.27E-04	1.62E-02
Апикальная часть клетки	4.42	2.97E-05	5.43E-03
Цитоплазматические везикулы	2.61	3.85E-04	2.90E-02
Клеточные контакты	2.57	3.09E-04	2.63E-02
Цитозоль	2.21	2.78E-05	5.93E-03
Плазматическая мембрана	1.83	6.36E-04	4.28E-02

Примечание. GO – категория генов, согласно базе Gene Ontology. FE, Fold Enrichment – соотношение частоты категории генов в исследуемой выборке и в референсном наборе. FDR, False Discovery Rate – средняя доля ложных отклонений гипотез среди всех отклонений.

показать, что эти гены соответствуют кластерной сети категорий (рис. 2), каждая из которых представлена кругами одного цвета, а отдельный круг соответствует подкатегории. Размер круга пропорционален количеству генов, попадающих в эту подкатегорию. Круги соединяются связями, если гены, попадающие в круг, обнаруживаются не в одной, а в нескольких категориях или подкатегориях. На рис. 2 видно, что практически все категории (19 из 20) объединены между собой функционально.

Мы предположили, что гены, транскрипция которых в кишечнике контрольных самок повысилась более чем в 4 раза, гены, транскрипция которых не индуцировалась или снизилась в кишечнике самок с нокдауном *Gagr*, могут не только участвовать в определенных биологических процессах, но также иметь общие молекулярные функции и клеточную локализацию. Поэтому далее с помощью сервиса Gene Ontology мы провели обогащение этой группы генов (табл. 1). Полученные данные подтверждают, что функция гена *Gagr* связана с процессами, лежащими в основе регуляции основополагающих внутриклеточных гомеостатических процессов.

*Анализ транскрипционного ответа генов
сигнальных путей на стресс, вызванный
персульфатом аммония*

Далее мы сравнили транскрипцию генов, входящих в основные сигнальные каскады, активация которых сопряжена со стрессовым ответом. Прежде всего нас интересовали пути JNK/MAPK и JAK/STAT, так как в промоторе гена *Gagr* содержатся сайты связывания транскрипционных факторов *kaayk* и *STAT92E*, вовлеченных в эти пути, и *Gagr*, вероятно, является эффектором этих путей [9]. Кроме того, нас интересовали гены, активируемые при ЭПР-стрессе и сопровождающем его стрессе несвернутых белков — UPR-стрессе, поскольку среди партнеров белка *Gagr* есть белки, локализованные в ЭПР и, возможно, задействованные в стрессовом ответе [8].

Путь JNK представляет собой каскад киназ, активирующийся под влиянием самых различных стимулов (радиация, повреждения ДНК, высокие температуры, присутствие окислителей, бактериальных или вирусных макромолекул, некоторых цитокинов) [16, 17]. Элементы каскада представлены первичными, вторичными и третичными киназами. Первичные киназы (JNKKK) воспринимают специфические сигналы, вызванные ограниченным спектром факторов стресса, и локализуются в определенном компартменте клетки (ядро, митохондрии, цитозоль и др.), где подвергаются фосфорилированию. Активированные JNKKK, в свою очередь, фосфорилируют вторичные киназы (JNKK), являющиеся первым интегрирующим звеном пути JNK. Третичные киназы (JNK)

принимают сигнал от JNKK и фосфорилируют белки-мишени, в частности транскрипционные факторы. Таким образом, JNK-путь объединяет отдельные стресс-сигналы в единый поток, направленный на изменение транскрипционного профиля клетки, определяющий целостный ответ на стрессовую ситуацию. У *D. melanogaster* JNK-каскад включает относительно небольшое число компонентов (по сравнению с позвоночными): несколько первичных киназ (*Ask1*, *Tak1* и др.), пару вторичных (*Her* и *Mkk4*) и единственную третичную (*Bsk*). Основными мишенями *Bsk* являются транскрипционные факторы семейства AP-1 (*Jre* и *Kay*) [16].

Сигнальный путь митоген-активированной протеинкиназы p38 — еще один важный механизм генерализованного клеточного ответа на стресс. Как и JNK-каскад, путь MAPK составляют первичные, вторичные и третичные киназы, осуществляющие передачу стресс-сигналов разной природы из разных компартментов клетки или извне. Мишенями пути MAPK являются транскрипционные факторы, циклинзависимые киназы, факторы роста, а также белки, способствующие или противодействующие апоптозу [18]. У *D. melanogaster* путь MAPK (p38) представлен тремя киназами (p38a, p38b и p38c), он активируется в ответ на экзогенные (патогены, окислители) и эндогенные (метаболиты) стимулы. Функционирование киназ MAPK и JNK частично сопряжено (за счет регуляции одними и теми же фосфатазами), но спектр их мишеней различается.

Сигнальный каскад JAK/STAT играет важную роль в онтогенезе (регулирует рост, пролиферацию и морфогенез), а также активируется в ответ на бактериальные или вирусные инфекции [19, 20]. Предполагается, что в стрессовых реакциях путь JAK/STAT преимущественно способствует регенеративной пролиферации (в отличие от неоднозначных эффектов путей JNK и MAPK) [21]. У *D. melanogaster* путь JAK/STAT представлен рецептором (*Domeless*), активирующими его лигандами (цитокинами *Upd1–3*), Janus-киназой (*Hopscotch*) и транскрипционным фактором (*STAT92E*). Рецептор, связывая лиганд *Upd*, димеризуется и перифосфорилирует киназу, которая затем переносит фосфат на STAT. Фосфорилированный STAT также димеризуется и транспортируется в ядро, где регулирует транскрипцию генов-мишеней [20].

UPR-ответ — это реакция клетки на накопление чужеродных (например, вирусных) или неправильно уложенных собственных белков в ЭПР (ЭПР-стресс). У *D. melanogaster* и других животных известны три сенсора ЭПР-стресса (*Ire1*, *PERK* и *Atf6*) и три каскада, через которые реализуется UPR [22, 23]. *Ire1* представляет собой фермент, встроенный в мембрану ЭПР и обладающий двумя видами активности — киназной и эндонуклеазной. Благодаря последней *Ire1* может выступать в роли нестандартного фактора сплайсинга ряда мРНК,

а Контрольные самки

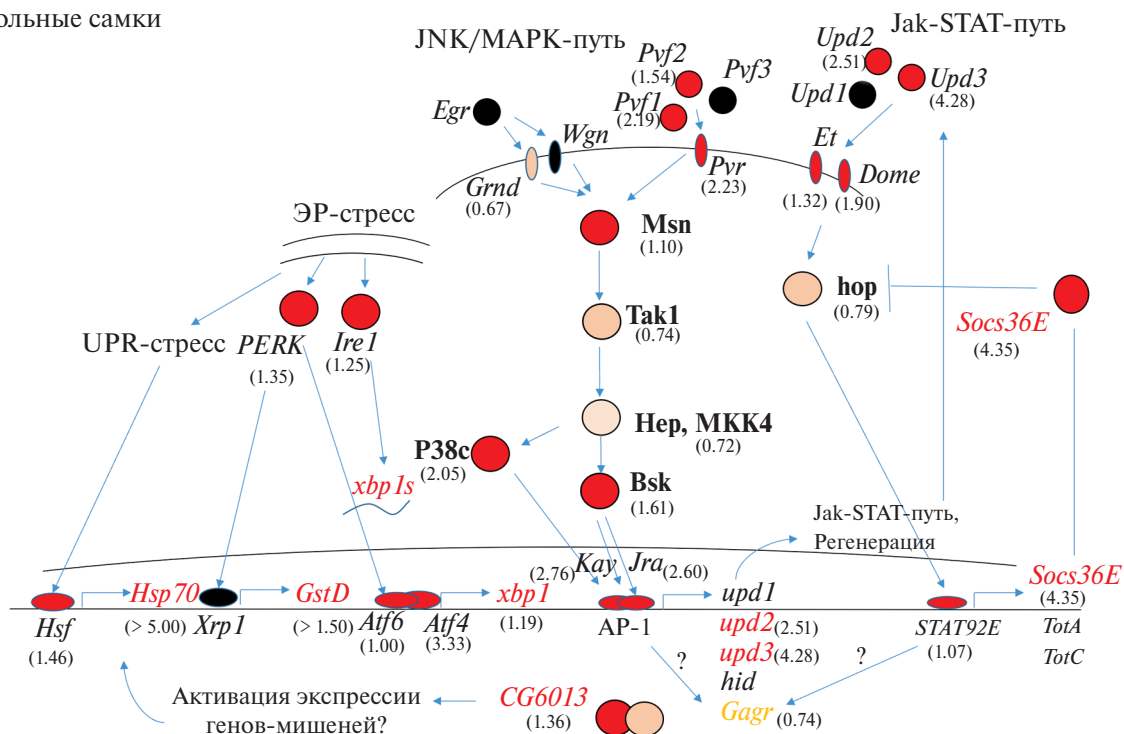
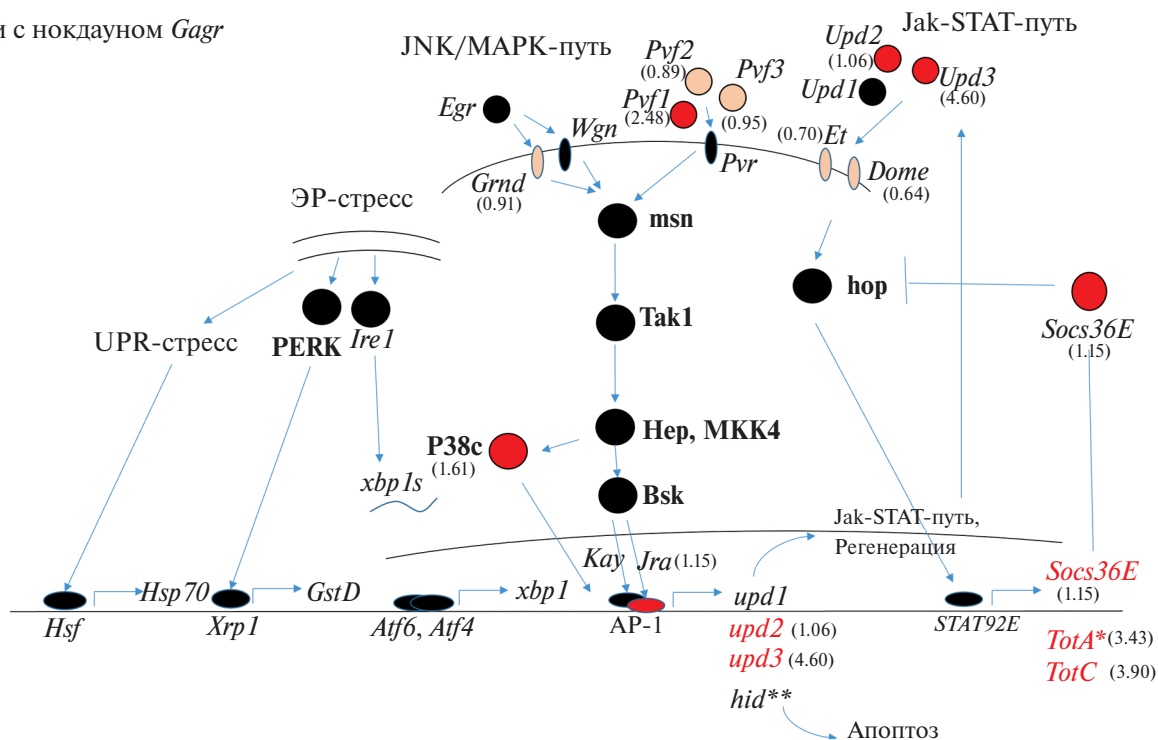
б Самки с нокдауном *Gagr*

Рис. 3. Транскрипционный ответ генов сигнальных путей JNK/MAPK, JAK/STAT и ЭПР-стресса в ответ на воздействие персульфата аммония в кишечнике контрольных самок (а) и самок с нокдауном *Gagr* (б). Для построения схем сигнальных путей использованы данные из работ [20] и [23]. Красным показаны гены, транскрипция которых повысилась более чем в 2 раза. Розовым выделены гены, чья экспрессия повысилась в 1.5–2 раза. В скобках около генов приведено значение LFC, жирным выделены киназы; *xbp1s* – сплайсированная форма *xbp1*. **TotA* – экспрессия этого гена у особей с нокдауном ниже, чем в контроле, но индуцируется при стрессовом ответе; ***hid* – экспрессия этого гена у особей с нокдауном *Gagr* выше, чем в контроле, и не индуцируется при стрессовом ответе.

в число которых входит транскрипт гена *xbp1*, не транслирующийся в функциональный белок. При ЭПР-стрессе Ire1 осуществляет сплайсинг этого транскрипта; процессированная таким образом мРНК транслируется в функциональный белок Xbp1, являющийся транскрипционным фактором, контролирующим транскрипцию стресс-специфических генов [24]. Сигнальный путь Ire1 не только важен при стрессовых состояниях, но и необходим для правильного развития и функционирования тканей, постоянно контактирующих с потенциальными факторами стресса (например, кишечник, жировое тело у личинок и фоторецепторы) [23]. Другая киназа, PERK, при ЭПР-стрессе фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2 α (доставляющий инициаторные тРНК к малой субъединице рибосомы), ингибируя его и тем самым подавляя трансляцию в целом. С другой стороны, это событие позволяет осуществить трансляцию ряда стресс-специфических регуляторов в отсутствие конкуренции [25]. Atf6 — это транскрипционный фактор, встроенный в мембрану ЭПР. При возникновении стрессовой ситуации Atf6 покидает ЭПР и транспортируется в аппарат Гольджи, где частично расщепляется. После этого “усеченный” Atf6 переносится в ядро, где активирует транскрипцию стресс-специфических генов.

Анализируя транскриптомный ответ на стресс, вызванный APS в кишечнике контрольных самок, мы обнаружили, что гены сигнальных путей, регулирующие активность продуктов которых осуществляется путем модификаций киназами, может также регулироваться при стрессовом ответе на уровне транскрипции (рис. 3а). Транскрипция очень многих генов проанализированных нами сигнальных путей активировалась при стрессовом ответе на APS. Среди активированных генов JNK/MAPK-пути были гены гуморальных факторов Pvf1 и Pvf2 и их мембранных рецепторов Grindewald (Grnd) и Pvr, киназ Msn, Tak1, MKK4, Bsk и MAP-киназы p38c; гены конечных мишеней JNK-сигналинга, транскрипционных факторов семейства AP-1 — jra и kau; генов мишеней JNK-каскада — цитокинов Upd2 и Upd3. Таким образом, JNK-каскад регулируется на уровне экспрессии его компонентов в ответ на APS.

Воздействие APS приводит также к активации экспрессии целого ряда генов компонентов сигнального каскада JAK/STAT в контрольной линии: гуморальных факторов Upd2 и Upd3 и их мембранного рецептора Dome; негативного регулятора рецептора Et (eye transformer); транскрипционного фактора пути JAK/STAT — STAT92E; мишеней JAK/STAT каскада — генов антимикробных пептидов TotA и TotC и негативного регулятора каскада Socs36E. Таким образом, JAK/STAT-каскад регулируется также на уровне транскрипции его отдельных компонентов в ответ на APS.

Нами показано, что воздействие APS приводит к ЭПР- и UPR-стрессу у мух контрольной линии. При этом наблюдается активация транскрипции гена киназы PERK, гена *xbp1*, генов транскрипционных факторов Atf4 и Atf6, Hsf1. Мы не обнаружили изменения экспрессии гена транскрипционного фактора Xgr1, однако наблюдали активацию транскрипции мишеней путей ЭПР- и UPR-стресса: генов семейства *Hsp70* и семейства *GstD*. Следует отметить, что, как недавно показано, гены глутатион-S-трансфераз семейства *GstD* — одни из наиболее значительно индуцируемых генов-мишеней UPR-стресса у дрозофилы. Среди генов этой группы наиболее значительно повышается активность гена *GstD1*, и эта индукция зависит от PERK и Xgr1 [26].

Изучение стрессового ответа транскриптома у особей с нокдауном *Gagr* не выявило активации транскрипции генов, характерной для контрольной линии (рис. 3б). Отметим, что в отсутствие стресса у особей с нокдауном активирован иммунный ответ, опосредованный активацией сигнальных путей Toll и Imd (рис. 1). Однако в условиях реального стресса дальнейшей активации транскрипции большинства генов иммунного ответа не происходит.

Поскольку активация белков, участвующих в сигнальных путях, происходит в результате их фосфорилирования и чаще всего не связана с активацией транскрипции, об активности сигнальных путей лучше всего судить по уровню транскрипции генов-мишеней. Анализируя транскрипцию генов-мишеней, мы сделали вывод, что у особей с нокдауном *Gagr* активирован путь JAK/STAT и не работают пути ответа на ЭПР-стресс и UPR-стресс. Про путь JNK однозначного вывода сделать нельзя, так как у мух с нокдауном *Gagr* активирована транскрипция отдельных генов-мишеней (*upd2*, *upd3*).

Проанализировав уровни транскрипции генов белков-партнеров *Gagr* при стрессовом ответе, мы обратили внимание на повышение транскрипции только одного из генов белков-партнеров с неизвестной функцией, *CG6013*, в кишечнике контрольных самок, но не особей с нокдауном *Gagr*. Это означает, что активация этого гена может зависеть от уровня транскрипции гена *Gagr*.

Согласно данным базы Flybase, ген *CG6013* (гомолог гена человека *CCDC124*) предположительно является коактиватором транскрипции, активным в ядре. Белок CG6013 имеет все типичные особенности белка CCDC124 (N-концевой ДНК/РНК-связывающий домен, C-концевой HMG-бокс, потенциально функциональные NLS и NES). У дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* продукт ортоголичного *CG6013* гена, известный как Oxl1, действует как кофактор транскрипционного фактора Pap1 семейства bZIP в сигнальном пути

Pap1/Oxs1 [27]. Этот путь активируется в ответ на стресс дисульфидных связей. Функционально Oxs1 предположительно ведет себя как кофактор Pap1, усиливающий его активность и изменяющий его специфичность (позволяя активировать новые гены-мишени) [27, 28].

Белок CCDC124 обладает мРНК-связывающей активностью [29]. Более того, экспериментально показано связывание CCDC124 с комплексом белков ADARB1, PRKRA, EFTUD2 и U1 (ADARB1 — фермент, редактирующий мРНК, PRKRA — киназа, активируемая дцРНК, а EFTUD2 и U1 являются компонентами сплайсосомы) [30], а также взаимодействие этого белка с большой субъединицей рибосомы, экспортином-1 и рибосомоспецифической киназой (как у *S. cerevisiae*) [31]. Эти данные могут указывать на тесную связь CCDC124 с аппаратом трансляции. Учитывая гомологию с Oxs1, можно предположить, что функции CCDC124 связаны со стрессзависимой (ре)активацией аппарата трансляции. Известно, что CCDC124 локализован на элементах цитоскелета (актиновые филаменты), на центриолях и в цитоплазме [32, 33]. Изучение механизма, посредством которого белок CCDC124 участвует в восстановлении трансляции после стресса, показало, что CCDC124 соединяет сайты декодирования малой субъединицы с центром активации ГТРАЗЫ большой субъединицы [34]. Таким образом, CCDC124 способствует быстрой реактивации трансляции стабилизируя компетентное к рециркуляции состояние неактивных рибосом.

Учитывая сходство белка CG6013 *D. melanogaster* как с Oxs1 дрожжей, так и с CCDC124 человека, можно предположить, что CG6013 участвует в сигнальном пути, аналогичном Pap1/Oxs1. У *D. melanogaster* этот путь, вероятно, включает рибосомы и аппарат, ответственный за синтез белка в ЭПР. Можно предположить, что белок CG6013 является важной сигнальной молекулой, циркулирующей между аппаратом трансляции и ядром. В ядре его функциями могут быть активация или подавление экспрессии некоторых генов путем модуляции активности транскрипционных факторов (возможно, Irg или Kay), связывание транскриптов этих генов, их процессинг и экспорт. Возможные функции, связанные с трансляцией, включают направление транскриптов в ЭПР, инициацию (вместе с Gagr и eIF3j) неканонического IRES-зависимого пути трансляции и реактивацию покоящихся рибосом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе филогенеза рода *Drosophila* ген *Gagr*, возникший в результате доместикации гена *gag*, претерпел существенные изменения: регуляция промоторной области гена усложнилась, а его белковый продукт приобрел трансмембранный домен.

Итогом этих преобразований стало включение гена *Gagr* в сигнальные пути. По-видимому, белок Gagr *D. melanogaster* закорен в мембране ЭПР и может служить белком-адаптером, координирующим взаимодействие своих партнеров. Анализ транскриптома кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* выявил плеiotропность функции Gagr. Выключение гена *Gagr* приводит к значительному изменению архитектуры транскриптома. В стрессовых условиях в отсутствие этого гена не происходит активация путей ЭПР- и UPR-стресса, а также снижается эффективность работы сигнальных путей JNK/MAPK и JAK/STAT. Белок Gagr может относиться к белкам домашнего хозяйства, модулирующим активность коактиваторов транскрипции, таких как CG6013 с неизвестной функцией, гомолог CCDC124 человека. По-видимому, Gagr играет важную роль в процессах индивидуального развития, в том числе нервной системы, регулируя процессы пролиферации. В условиях стресса он может опосредовать IRES-зависимую трансляцию и способствовать активации процессов регенерации. Эти гипотезы требуют дальнейшей экспериментальной проверки.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 22-24-00305).

В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malik H.S., Henikoff S. (2005) Positive selection of *Iris*, a retroviral *envelope*-derived host gene in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* **1**(4), e44.
2. 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.
3. Guruharsha K.G., Rual J.-F., Zhai B., Mintseris J., Vaidya P., Vaidya N., Beekman C., Wong C., Rhee D.Y., Cenaj O., McKillip E., Shah S., Stapleton M., Wan K.H., Yu C., Parsa B., Carlson J.W., Chen X., Kapadia B., VijayRaghavan K., Gygi S.P., Celniker S.E., Obar R.A., Artavanis-Tsakonas S. (2011) A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell*. **147**, 690–703.
4. Parua P.K., Young E.T. (2014) Binding and transcriptional regulation by 14-3-3 (Bmh) proteins requires residues outside of the canonical motif. *Eukaryot. Cell*. **13**, 21–30.
5. Moretti A.I.S., Laurindo F.R.M. (2017) Protein disulfide isomerases: redox connections in and out of the endoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 106–119.
6. Fraser C.S., Lee J.Y., Mayeur G.L., Bushell M., Doudna J.A., Hershey J.W. (2004) The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding

- of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **279**, 8946–8956.
7. Majzoub K., Hafirassou M.L., Meignin C., Goto A., Marzi S., Fedorova A., Verdier Y., Vinh J., Hoffmann J.A., Martin F., Baumert T.F., Schuster C., Imler J.L. (2014) RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell.* **159**, 1086–1095.
 8. Nefedova L., Gigin A., Kim A. (2022) Domesticated LTR-retrotransposon *gag*-related gene (*Gagr*) as a member of the stress response network in *Drosophila*. *Life.* **12**, 364.
 9. 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.
 10. Bunker B.D., Nellimoto T.T., Boileau R.M., Classen A.K., Bilder D. (2015) The transcriptional response to tumorigenic polarity loss in *Drosophila*. *Elife.* **4**, e03189.
 11. Dostert C., Jouanguy E., Irving P., Troxler L., Galiana-Arnoux D., Hetru C., Homann J.A., Imler J.L. (2005) The JAK/STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat. Immunol.* **6**, 946–953.
 12. Paradkar P.N., Trinidad L., Voysey R., Duchemin J.-B., Walker P.J. (2012) Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the JAK/STAT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 18915–18920.
 13. Zhou Y., Zhou B., Pache L., Chang M., Khodabakhshi A.H., Tanaseichuk O., Benner C., Chanda S.K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* **10**(1), 1523.
 14. Lee J.H., Cho K.S., Lee J., Yoo J., Lee J., Chung J. (2001) Dipterin-like protein: an immune response gene regulated by the anti-bacterial gene induction pathway in *Drosophila*. *Gene.* **271**(2), 233–238.
 15. Agaisse H., Petersen U.M., Boutros M., Mathey-Prevot B., Perrimon N. (2003) Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev. Cell.* **5**(3), 441–450.
 16. Biteau B., Karpac J., Hwangbo D., Jasper H. (2011) Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling. *Exp. Gerontol.* **46**(5), 349.
 17. Johnson G.L., Nakamura K. (2007) The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1773**(8), 1341.
 18. Belozero V.E., Lin Z.-Y., Gingras A.-C., McDermott J.C., Michael Siu K.W. (2012) High resolution protein interaction map of the *Drosophila melanogaster* p38 mitogen-activated protein kinases reveals limited functional redundancy. *Mol. Cell. Biol.* **32**(18), 3695.
 19. Amoyel M., Anderson A.M., Bach E.A. (2014) JAK/STAT pathway dysregulation in tumors: a *Drosophila* perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.* **28**, 96.
 20. Kingsolver M.B., Huang Z., Hardy R.W. (2013) Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *J. Mol. Biol.* **425**(24), 4921.
 21. La Fortezza M., Schenk M., Cosolo A., Kolybaba A., Grass I., Classen A.-K. (2016) JAK/STAT signalling mediates cell survival in response to tissue stress. *Development.* **143**(16), 2907.
 22. Ryoo H.D., Domingos P.M., Kang M.-J., Steller H. (2007) Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J.* **26**(1), 242.
 23. Ryoo H.D. (2015) *Drosophila* as a model for unfolded protein response research. *BMB Rep.* **48**(8), 445.
 24. Hollien J., Weissman J.S. (2006) Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science.* **313**(5783), 104.
 25. Hewes R.S., Schaefer A.M., Taghert P.H. (2000) The cryptochrome gene (ATF4) encodes multiple basic-leucine zipper proteins controlling molting and metamorphosis in *Drosophila*. *Genetics.* **155**(4), 1711.
 26. Brown B., Finnegan S.M., Roach D., Vasudevan D., Ryoo H.D. (2021) The transcription factor Xrp1 is required for PERK-mediated antioxidant gene induction in *Drosophila*. *eLife.* **10**, e74047.
 27. He Y., Chen Y., Song W., Zhu L., Dong Z., Ow D.W. (2017) A Pap1–Oxsl signaling pathway for disulfide stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucl. Acids Res.* **45**, 106–114.
 28. Kudo N., Taoka H., Toda T., Horinouchi S. (1999) A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *J. Biol. Chem.* **274**, 15151–15158.
 29. Li S., Wang L., Fu B., Berman M.A., Diallo A., Dorf M.E. (2014) TRIM65 regulates microRNA activity by ubiquitination of TNRC6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 6970–6975.
 30. Malinová A., Cvačková Z., Matějů D., Hořejší Z., Abéza C., Vandermoere F., Bertrand E., Staněk D., Verheggen C. (2017) Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones. *J. Cell Biol.* **216**, 1579–1596.
 31. Kırılı K., Karaca S., Dehne H.J., Samwer M., Pan K.T., Lenz C., Urlaub H., Görlich D. (2015) A deep proteomics perspective on CRM1-mediated nuclear export and nucleocytoplasmic partitioning. *Elife.* **4**, e11466.
 32. Telkoparan P., Erkek S., Yaman E., Alotaibi H., Bayık D., Tazebay U.H. (2013) Coiled-coil domain containing protein 124 is a novel centrosome and midbody protein that interacts with the Ras-guanine nucleotide exchange factor 1B and is involved in cytokinesis. *PLoS One.* **8**, e69289.
 33. Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., Beckmann B.M., Strein C., Davey N.E., Humphreys D.T., Preiss T., Steinmetz L.M., Krijgsvelde J., Hentze M.W. (2012) Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell.* **149**, 1393–1406.
 34. Wells J.N., Buschauer R., Mackens-Kiani T., Best K., Kratzat H., Berninghausen O., Becker T., Gilbert W., Cheng J., Beckmann R. (2020) Structure and function of yeast Lso2 and human CCDC124 bound to hibernating ribosomes. *PLoS Biol.* **18**(7), e3000780.

STUDY OF THE GUT TRANSCRIPTOMIC RESPONSE IN *Drosophila melanogaster* WITH KNOCKDOWN OF THE *Gagr*, DOMESTICATED *gag* GENE OF ERRANTIVIRUSES

M. L. Nikitina¹, P. A. Milyaeva¹, I. V. Kuzmin¹, L. N. Nefedova^{1, *}

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

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

As a result of molecular domestication of the *gag* gene of errantiviruses, the *Gagr* gene was formed in the genome of *Drosophila melanogaster*. It has previously been shown that the *Gagr* gene is transcribed at the highest level in gut tissues relative to other tissues, and its transcription is most effectively induced in females in response to ammonium persulfate added to the diet. In the present work, the gut transcriptome of females with knockdown of the *Gagr* gene was studied in all tissues under standard conditions and under stress conditions caused by ammonium persulfate. It was revealed that in females with knockdown of the *Gagr* gene, the genes of antimicrobial peptides controlled by the Toll and Imd signaling pathways are activated in the gut. Induction of a stress response by ammonium persulfate revealed disruption of the JAK/STAT and JNK/MAPK signaling pathways and an almost complete absence of activation of the ER-stress and UPR-stress pathways in the *Gagr* gene mutant. The data obtained confirm the important role of the *Gagr* gene in maintaining the homeostasis and the immune response.

Keywords: domestication, retroelements, *gag*, *Drosophila*, stress response