

**ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА**

УДК 575.85

**ВОВЛЕЧЕННОСТЬ ГЕНА *Gagr*, ДОМЕСТИЦИРОВАННОГО ГЕНА *gag*
РЕТРОВИРУСОВ, В ПУТИ СТРЕССОВОГО ОТВЕТА
У РАЗНЫХ ВИДОВ ДРОЗОФИЛЫ**

© 2023 г. А. Н. Гигин^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 21.11.2022 г.

После доработки 02.12.2022 г.

Принята к публикации 05.12.2022 г.

Ген *Gagr* — доместичированный ген *gag* ретроэлементов у *Drosophila melanogaster*, функция которого связана со стрессовым ответом. Ген *Gagr* и его гомологи у разных видов *Drosophila* имеют высоко консервативную структуру, однако демонстрируют определенную изменчивость промоторной области, связанную, по-видимому, с постепенным приобретением доместичированным геном новой функции и вовлечением в новые сигнальные пути. В настоящей работе изучено влияние окислительного стресса, вызванного персульфатом аммония, на жизнеспособность различных видов рода *Drosophila* (*D. melanogaster*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. yakuba*, *D. teissieri*, *D. pseudoobscura*), проведен анализ корреляции структуры промоторных областей и стресс-индуцированных изменений в экспрессии гена *Gagr* и его гомологов у разных видов дрозофил, а также сравнение стресс-индуцированных изменений в экспрессии генов-маркеров окислительного стресса: активатора сигнального пути Jak-STAT *upd3*, эффектора пути Jak-STAT *vir-1* и мишени сигнального пути IMD *Rel*. Обнаружено, что у *D. simulans* и *D. mauritiana* существенно повышена чувствительность к персульфату аммония, что коррелирует со сниженным уровнем транскрипции ортологов гена *vir-1*. Последнее обусловлено уменьшением числа сайтов связывания транскрипционного фактора STAT92E, компонента сигнального пути Jak-STAT, в промоторной области ортологов *vir-1* у *D. simulans* и *D. mauritiana*. Согласованные изменения экспрессии генов *Gagr*, *upd3*, *vir-1* наблюдаются у всех видов подгруппы *melanogaster*, кроме *D. pseudoobscura*, что свидетельствует о возрастании роли *Gagr* в регуляции путей стрессового ответа в ходе филогенеза рода *Drosophila*.

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

DOI: 10.31857/S0026898423030047, EDN: CHBVPQ

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярная доместикация последовательностей мобильных элементов может играть огромную роль в образовании новых семейств генов, несущих в себе значимые эволюционные новшества и во многом определяющие облик крупных таксонов эукариот. Роль доместичированных генов ретроэлементов у млекопитающих изучена достаточно подробно: обнаружено несколько семейств генов ретротранспозонного происхождения (*PNMA*, *MART*, синцитины и *Vex/Tcl*), члены которых играют определяющую роль в формировании плаценты и в эмбриогенезе [1–5], а также в функционировании центральной нервной системы [6, 7]. В защите от ретровирусов, попадающих в организм извне, могут участвовать и другие доместичированные гены. Так, у мышей есть четыре таких гена — *Fv1*, *Fv4*, *Rmcf1* и *Rmcf2* [8–10]. Доместичированные последовательности ретроэлементов найдены и у других по-

звоночных: ген *Arc*, необходимый для формирования и поддержания долговременной памяти в центральной нервной системе, консервативен у тетрапод [11], а последовательности, кодирующие SCAN-домен, характерны для многих транскрипционных факторов (ТФ) у амниот — самой разнообразной и успешной группы тетрапод [12]. Функции многих доместичированных последовательностей ретроэлементов изучены слабо; некоторые из них охарактеризованы недавно: например, роль последовательности выше гена *Pparg*, произошедшей от ретроэлементов *LINE*, как энхансера этого гена, необходимого для адипогенеза [13], или роль *PRLH1* — транскрипта, происходящего от эндогенного ретровируса ERV-9, в репарации двухцепочечных разрывов [14].

Случаи молекулярной доместикации ретроэлементов и их последовательностей у позвоночных изучены значительно слабее, чем у позвоночных. Большая часть исследований ретроэле-

ментов проведена на плодовых мухах (*Drosophila melanogaster*), для которых характерно высокое разнообразие ретроэлементов (включая самую представительную группу – *Gypsy*, очень близкую по свойствам к ретровирусам) [15]. На текущий момент у *D. melanogaster* известно лишь четыре доместицированных гена, произошедших от ретроэлементов, – *Gagr*, *dARC1*, *dARC2* (гомологи гена *gag* ретроэлементов группы *Gypsy*) и *Iris* (гомолог *env* ретроэлементов группы *Bel*) [11, 16, 17]. Ген *Gagr* и его белковый продукт проявляют определенную изменчивость среди видов рода *Drosophila*, связанную с постепенным приобретением новой функции и вовлечением в новые сигнальные пути [18]. Установление связи между изменчивостью последовательности гена *Gagr* в ряду видов дрозофил с видоизменением его функций позволит лучше понять ход процесса молекулярной доместикации в контексте эволюции.

Ранее было показано, что экспрессия гена *Gagr* у *D. melanogaster* индуцируется индуктором окислительного стресса – персульфатом аммония; при этом также индуцируется экспрессия ряда других стресс-активируемых генов, вероятно, имеющих общие пути регуляции с доместицированным геном: *vir-1*, *upd3* и *Rel* [18]. Ген *vir-1* – ген с неизвестными функциями, экспрессия которого находится под контролем каскада Jak-STAT [19]. У *D. melanogaster* экспрессия *vir-1* повышается в ответ на окислительный стресс [20], а также на вирусную инфекцию [19]. Ген *upd3* – один из трех генов семейства – цитокинов Unpaired, запускающих сигнальный путь Jak-STAT через рецептор Domeless [21], является мишенью ТФ Sd/Yki (из пути Hippo) и AP-1 [22, 23]. Экспрессия *upd3* у *D. melanogaster* индуцируется в ответ на окислительный стресс и через каскад JNK, активирующий как Yki, так и AP-1 [23, 24]. Ген *Rel* кодирует мишень сигнального пути IMD, ТФ, который активируется в ответ на присутствие патогенных микроорганизмов и некоторых окислителей [25, 26].

В задачи нашей работы входило изучение влияния окислительного стресса, вызванного персульфатом аммония, на жизнеспособность различных видов рода *Drosophila* (*D. melanogaster*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. yakuba*, *D. teissieri*, *D. pseudoobscura*), анализ корреляции структуры промоторных областей и стресс-индуцированных изменений экспрессии гена *Gagr* и его гомологов у разных видов дрозофил, а также сравнение стресс-индуцированных изменений экспрессии генов-маркеров окислительного стресса (*vir-1*, *Rel* и *upd3*) и их ортологов у разных видов дрозофил.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Виды рода *Drosophila* и условия культивирования.

В работе использовали лабораторную линию *D. melanogaster* дикого типа (Canton-S) и виды

подрода *Sophophora* (*D. simulans*, *D. mauritiana*, *D. yakuba*, *D. teissieri* и *D. pseudoobscura*) из коллекции кафедры генетики МГУ. Все использованные в работе виды культивировали на стандартной агаризованной среде при 21°C. В экспериментах использовали только самок на стадии имаго, сбор которых осуществляли спустя 6–8 дней после вылета. Для индукции окислительного стресса имаго помещали на агаризованную питательную среду, содержащую персульфат аммония (“Fermentas”, США). В экспериментах по изучению экспрессии использовали персульфат аммония в конечной концентрации 0.1 М. В качестве контроля использовали мух, помещенных на агаризованную питательную среду без добавления персульфата аммония. Для снижения дисперсии значений уровня экспрессии изучаемых генов в дальнейшем, учитывая индивидуальную реакцию на воздействие, и для повышения достоверности результатов эксперимент проводили параллельно на 10 группах мух (шесть тестируемых и четыре контрольные) по 10 самок в каждой, помещенных в отдельные пробирки, при температуре 21°C. Жизнеспособность при окислительном стрессе изучали, используя персульфат аммония в конечных концентрациях 0.01 и 0.05 М. Использование более низкой концентрации позволило несколько увеличить время выживания особей на среде с персульфатом и увидеть значимые различия между более и менее чувствительными к персульфату видами. В опытах использовали семь групп мух каждого вида (пять тестируемых и две контрольные), помещенных в отдельные пробирки и в сумме дававших не менее 50 самок на опыт и 20 на контроль. Количество выживших мух фиксировали спустя 18–30, 42–52 и 66–74 ч после посадки с промежутками 2 ч в каждом интервале.

Выделение суммарной РНК и ОТ-ПЦР. РНК выделяли с помощью реактива ExtractRNA (“Евроген”, Россия) по протоколу, рекомендованному фирмой-производителем. РНК выделяли не из отдельных мух, а из пулов (по пять самок), отобранных из каждой группы (экспериментальной и контрольной) спустя 24 ч после посадки. Таким образом, в каждом эксперименте получено шесть независимых проб РНК из мух, находившихся в стрессовых условиях, и четыре независимые контрольные пробы. Концентрацию РНК измеряли спектрофотометрически на приборе NanoDrop (“Peglab”). Перед постановкой реакции обратной транскрипции (ОТ) образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (“Fermentas”) согласно протоколу фирмы. Для приготовления реакционной смеси использовали набор реагентов “пятикратная реакционная смесь с горячим стартом на основе Taq-полимеразы с интеркалирующим красителем SYBR Green I” (“Евроген”) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Реакцию ставили в амплификаторе Mini Opticon Real-Time PCR

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген	Прямой праймер (5' → 3')	Обратный праймер (5' → 3')
<i>Gagr amst</i>	CCTCGATGGCAGTGATCCTG	ATTTGTGCGCGTGAAGACCG
<i>Gagr y</i>	CCTCGATGGCAGTGATCCTG	CGCTCGTTCTGTGCACTTAT
<i>Gagr p</i>	AACCTTCGATGGCAGCGATC	CCGATCAGTGCACCTTGTCT
<i>vir-1 amst</i>	GGCCGAATTCGATCAGGATC	GCCAAATCGTTGACGGCTAT
<i>vir-1 ty</i>	GGCCGAATTCGATCAGGATC	GCCACATCGTTGACGGCTAT
<i>vir-1 p</i>	AACACTGGACCAGGATCAGG	GCAAAATCGTTGACGGCGAT
<i>Rel amsty</i>	TCATACACACCGCCAAGAAG	AGTTCATGTCCTTGGCCTCA
<i>Rel p</i>	TCATACACACCGCCAAGAAG	TTTCCAGCTTCTGTACCTCC
<i>upd3 amst</i>	GACCAGGAACCCAGTGGAA	GGCAAACCTGGGACATGGC
<i>upd3 ty</i>	CAATGTGACCAACCTGCTCT	CGCGGCAGGATCTTGTAG
<i>upd3 p</i>	GCCAACACGCGTGAAAGA	ACTGCTGCAACTGGTACATG
<i>RpL32 amsty</i>	GCACCAAGCACTTCATCCG	GACGCACTCTGTTGTGATCA
<i>RpL32 p</i>	AGCACTTCATCCGTCACCA	GTAACCGATGTTGGGCATCA
<i>aTub84B</i>	TACGCCAAGCGTGCCTT	GTCCATGCCGACCTCCTC

Сокращения: *a* – *D. mauritiana*, *m* – *D. melanogaster*, *p* – *D. pseudoobscura*, *s* – *D. simulans*, *t* – *D. teissieri*, *y* – *D. yakuba*.

System (“Bio-Rad Laboratories”, США). Определяли относительную экспрессию генов *Gagr*, *vir-1*, *upd3* и *Rel*, нормированную на экспрессию двух референсных генов – α *Tub84B* и *RpL32*. Фрагменты кДНК амплифицировали с использованием праймеров, подобранных к последовательностям мРНК тестируемых генов, с помощью модулей Primer3 и MUSCLE пакета программ UGENE v.41 (табл. 1).

ПЦР проводили, используя следующую программу: предварительный этап плавления ДНК – 10 мин, 95°C, затем 40 циклов: плавление – 15 с, 95°C; отжиг праймеров – 30 с, 55°C; синтез – 60 с, 72°C. После синтеза в каждом цикле измеряли уровень флуоресценции в пробах. Одновременно ставили отрицательные контроли для каждого образца: пробы, обработанные ДНКазой I и не прошедшие ОТ, а также пробы, содержащие реактивы для ПЦР (включая праймеры), инкубированные без внесения амплифицируемой ДНК. Для проверки специфичности реакции после завершения ПЦР определяли температуру плавления продуктов. Продукт ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Относительный уровень экспрессии рассчитывали методом Δ Сt с нормированием на два референсных гена. Статистическую значимость различий нормированной экспрессии генов оценивали с помощью теста Манна–Уитни ($p < 0.05$).

Множественное выравнивание и биоинформатический анализ биологических последовательностей. В работе использовали нуклеотидные и аминокислотные последовательности, загруженные из баз данных FlyBase (<https://flybase.org>) и NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Выравнивание по-

следовательностей ДНК и белков проводили на платформе Unipro Ugene v.41 с помощью инструмента MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/msa>). Поиск и визуализацию консервативных мотивов осуществляли с помощью Интернет-ресурса WebLogo 3 (weblogo.threeplusone.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние окислительного стресса, вызванного персульфатом аммония, на жизнеспособность видов рода Drosophila

В качестве индуктора окислительного стресса использовали персульфат аммония [27]. Окисляя биологические макромолекулы, персульфат-анион и продукты его распада вызывают обширные повреждения клеточных структур, способствуя быстрой активации стрессовых каскадов. Показана высокая эффективность персульфата аммония как индуктора экспрессии *Gagr* и маркеров окислительного стресса у *D. melanogaster* [18].

Для выявления общих закономерностей функционирования сигнальных путей ответа на окислительный стресс у разных видов дрозофил оценили жизнеспособность мух каждого вида на среде, содержащей персульфат аммония. Концентрация окислителя 0.1 М, использованная для определения экспрессии генов-маркеров окислительного стресса в работе [18], оказалась неподходящей для длительной экспозиции: гибель мух нарастала слишком быстро, не позволяя зафиксировать подробную динамику (у некоторых видов 100% мух погибли менее чем за сутки). Понижение концентрации в предварительных опытах до 0.05 М расширило возможный диапазон наблюдений до 3 сут.

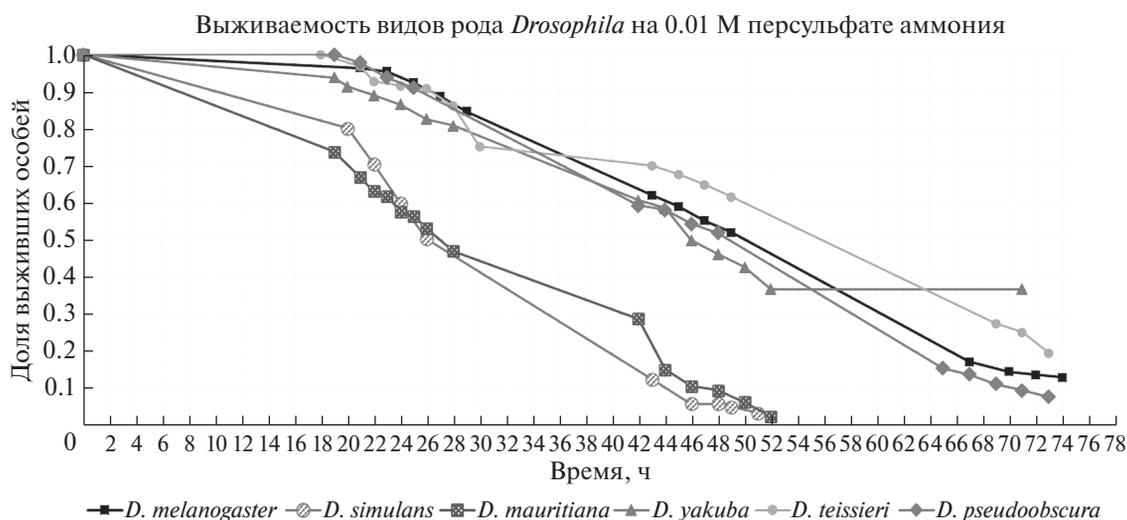


Рис. 1. Доля выживших мух в зависимости от времени экспозиции на 0.05 М персульфате аммония.

Результаты эксперимента представлены на рис. 1. Время, за которое происходит гибель половины мух большинства изученных видов, составляет порядка 48 ч, но два близкородственных вида (*D. simulans* и *D. mauritiana*) из подгруппы *melanogaster* проявляют повышенную чувствительность к 0.05 М персульфату. У этих видов гибель половины особей наступает уже через 24 ч. Повышенная чувствительность к персульфату аммония может быть связана с изменениями экспрессии стресс-активируемых генов, специфичными для *D. simulans* и *D. mauritiana*, поскольку этот эффект отсутствует у *D. melanogaster*, а динамика жизнеспособности при окислительном стрессе принципиально схожа с динамикой у менее близкородственных видов (включая *D. pseudoobscura*).

Влияние окислительного стресса на экспрессию гена *Gagr* и стрессовых маркеров у видов рода *Drosophila*

Влияние окислительного стресса на экспрессию гена *Gagr* и генов-маркеров окислительного стресса изучали с использованием 0.1 М персульфата аммония. Оценивали экспрессию как самого гена *Gagr*, так и ряда других стресс-активируемых генов, вероятно, имеющих общие пути регуляции с доместифицированным геном *Gagr: vir-1, upd3* и *Rel*.

Согласно полученным данным, у разных видов экспрессия гена *Gagr* в стрессовых условиях может существенно различаться (рис. 2). Эффективную индукцию демонстрируют виды *D. melanogaster*, *D. mauritiana* и *D. yakuba*. У *D. simulans* и *D. teissieri* индукция не зафиксирована, но уровень экспрессии *Gagr* в контроле у этих видов сопоставим с уровнем у *D. yakuba* в стрессовых условиях. У *D. pseudoobscura* экспрессия *Gagr* также

повышена и не реагирует на присутствие окислителя.

Эффективность индукции *Gagr*, зарегистрированная у разных видов, согласуется с различиями в структуре промотора доместифицированного гена, исследованными в работе [18]. Промотор *Gagr* у *D. melanogaster* содержит сайт связывания ТФ пути JNK *kaυ* и два сайта связывания ТФ пути Jak-STAT STAT92E. У *D. mauritiana* и *D. simulans* промоторы гомологов *Gagr* содержат сайт связывания *kaυ* и два сайта связывания STAT92E. У *D. yakuba* и *D. teissieri* ортологичные гены содержат сайт связывания *kaυ* и только один сайт связывания STAT92E. У *D. pseudoobscura* есть только сайт связывания *kaυ*, но нет сайтов связывания STAT92E.

Повышение экспрессии *vir-1* в условиях окислительного стресса обнаружено у большинства исследованных видов. У *D. teissieri* и *D. pseudoobscura* эффективность индукции снижена (в 2.5 раза по сравнению с более чем десятикратным увеличением экспрессии у *D. melanogaster* и *D. yakuba*). У двух близкородственных видов (*D. simulans* и *D. mauritiana*) *vir-1* не индуцируется и экспрессируется на низком уровне. Эти же виды показали наименьшую жизнеспособность в условиях окислительного стресса. Таким образом, жизнеспособность этих видов в условиях окислительного стресса может коррелировать с уровнем экспрессии гена *vir-1*.

Мы провели поиск и сравнительный анализ сайтов связывания ТФ STAT92E в промоторных областях *vir-1* у разных видов, поскольку ген *vir-1*, как и *Gagr*, является мишенью ТФ STAT92E. В поиске мы опирались на данные, полученные в работе [19], в которой экспериментально обнаруже-

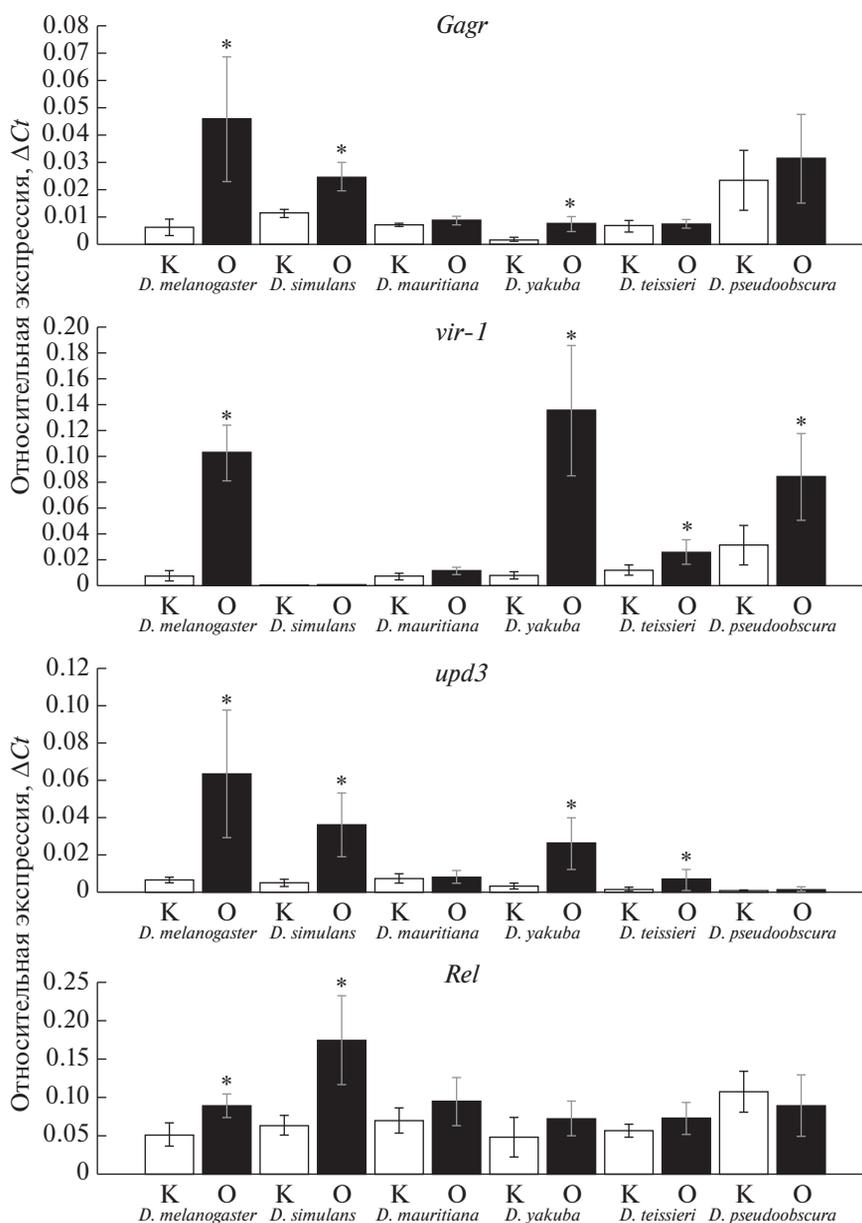


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов *Gagr*, *vir-1*, *upd3* и *Rel* у самок *D. melanogaster* и их гомологов у *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. yakuba*, *D. teissieri*, *D. pseudoobscura*. К – уровень экспрессии у контрольных особей (не подвергавшихся окислительному стрессу); О – уровень экспрессии у особей, подвергавшихся воздействию персульфата аммония. Уровень экспрессии нормирован на экспрессию двух референсных генов, α *Tub84B* и *RpL32*, для *D. melanogaster* и их гомологов для других видов. Данные представлены в виде среднего со стандартным отклонением. *Значимые различия (тест Манна–Уитни, $p < 0.05$, $N = 6$).

ны два сайта связывания ТФ STAT92E в промоторной области *vir-1* *D. melanogaster*.

Согласно полученным данным (рис. 3), промоторные области всех исследуемых видов, кроме *D. simulans* и *D. mauritiana*, содержат два сайта связывания ТФ STAT92E. Таким образом, слабый уровень экспрессии *vir-1* и индукции в условиях стресса у этих видов может объясняться более низким уровнем индукции экспрессии ТФ STAT92E.

От экспрессии гена *upd3* в стрессовых условиях во многом зависит эффективность активации пути Jak-STAT, а значит, индукция экспрессии генов *vir-1* и *Gagr* (при наличии хотя бы одного сайта связывания STAT92E в промоторе). У *D. melanogaster*, *D. mauritiana*, *D. yakuba* и *D. teissieri* экспрессия *upd3* значительно повышается в присутствии персульфата аммония, обеспечивая эффективную передачу сигнала по пути Jak-STAT.

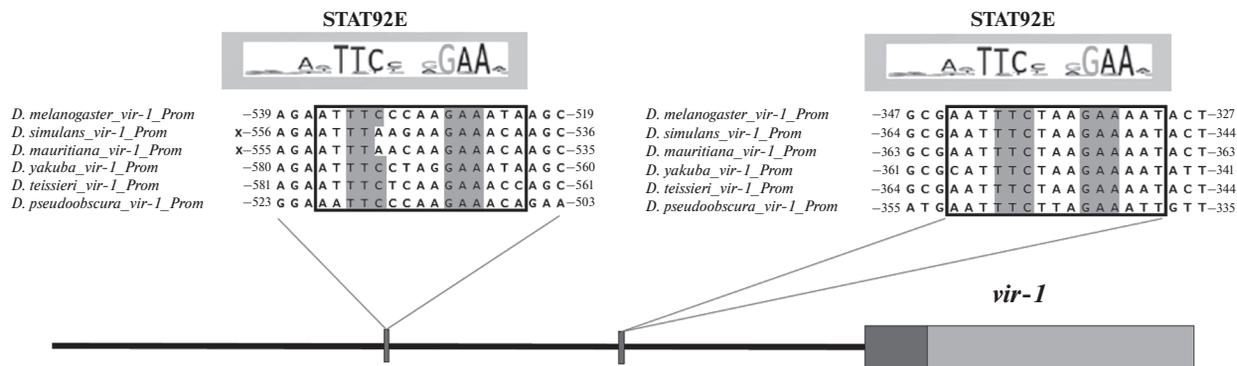


Рис. 3. Промоторные области гена *vir-1* и его ортологов у видов *Drosophila*. В рамках показано множественное выравнивание ортологических последовательностей промоторных областей *vir-1* у разных видов, соответствующих консенсусной последовательности сайта связывания ТФ STAT92E.

У *D. simulans* и *D. pseudoobscura* наблюдается иная ситуация. *D. simulans* не демонстрирует индукции *upd3*, что может существенно ограничивать STAT-зависимую активацию *vir-1* и *Gagr* и приводить к наблюдаемой низкой жизнеспособности в условиях стресса. У *D. pseudoobscura* экспрессия *upd3* в опыте остается на низком уровне, что может свидетельствовать о пониженной роли пути Jak-STAT в реакциях ответа на индуцированный персульфатом стресс у этого вида и об альтернативном пути активации гена *vir-1*.

Экспрессия гена *Rel* у большинства изученных видов значимо не повышалась в ответ на стресс, вызванный персульфатом аммония. Это может быть связано с особенностями функционирования сигнального пути IMD, необходимого для передачи сигнала на каскады JNK и MAPK, но в то же время ограничивающего биологические эффекты этих путей (как напрямую, так и вследствие развития иммунологических реакций). Экспрессия *Rel* в опыте значительно (в 3 раза) повышена только у *D. mauritiana* и вместе со слабой индукцией *vir-1* может обуславливать низкую жизнеспособность этого вида.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Важнейшую роль в обеспечении ответа дрозофилы на окислительный стресс играют пути IMD [26], JNK [24], MAPK (p38) [28, 29] и Jak-STAT [23]. Ген *Gagr* приобретен предком дрозофил в результате молекулярной доместикации ретроэлемента, в ходе дальнейшего филогенеза он был вовлечен в сложную систему ответа на окислительный стресс, став частью JNK-, а затем и STAT-регулируемой группы стресс-индуцируемых генов [17, 18]. Ген *Gagr* и его белковый продукт предположительно участвуют в обеспечении регенеративной пролиферации и выхода клеток из стрессового состояния, способствуя, возможно, выживанию организма в присутствии окислителей. Структура

гена *Gagr* и свойства его продукта различаются у разных видов, что может означать различную степень вовлеченности доместического гена в клеточные процессы [17, 18].

Полученные результаты свидетельствуют о различном характере экспрессии *Gagr* и функционирования пути Jak-STAT в условиях окислительного стресса у разных видов дрозофил. Эффективность стресс-индукции *Gagr* зависит от количества сайтов связывания ТФ STAT92E на промоторе доместического гена [18]. Виды, предположительно обладающие двумя сайтами связывания STAT92E (*D. melanogaster*, *D. mauritiana*), имеют более высокий уровень экспрессии *Gagr* в опыте, чем *D. yakuba*, содержащий только один сайт связывания. У всех этих видов существует также сходство стресс-индукции *Gagr* и *upd3* (от которого зависит STAT-регуляция доместического гена) [21].

У вида *D. pseudoobscura*, не входящего в подгруппу *melanogaster*, экспрессия ортолога *Gagr* находится на высоком уровне на фоне низкой экспрессии *upd3* и не зависит от присутствия стрессового фактора. Это согласуется с другой структурой промотора (без сайтов связывания STAT92E) и, предположительно, иными свойствами белкового продукта ортолога *Gagr* у этого вида, предполагающими меньшую вовлеченность доместического гена в стрессовые каскады [18].

Наличие хотя бы одного сайта связывания STAT92E в промоторе *Gagr* может играть существенную роль в обеспечении совместной регуляции этого гена с *vir-1* — маркером окислительного стресса [19, 20]. Согласно экспериментальным данным, наибольшая стресс-индукция *vir-1* наблюдается у тех видов, у которых эффективно индуцируется *Gagr* (кроме *D. mauritiana*) (рис. 4). Молекулярные функции обоих этих генов не вполне ясны, но их совместная экспрессия может быть важна для выживания мух в стрессовых

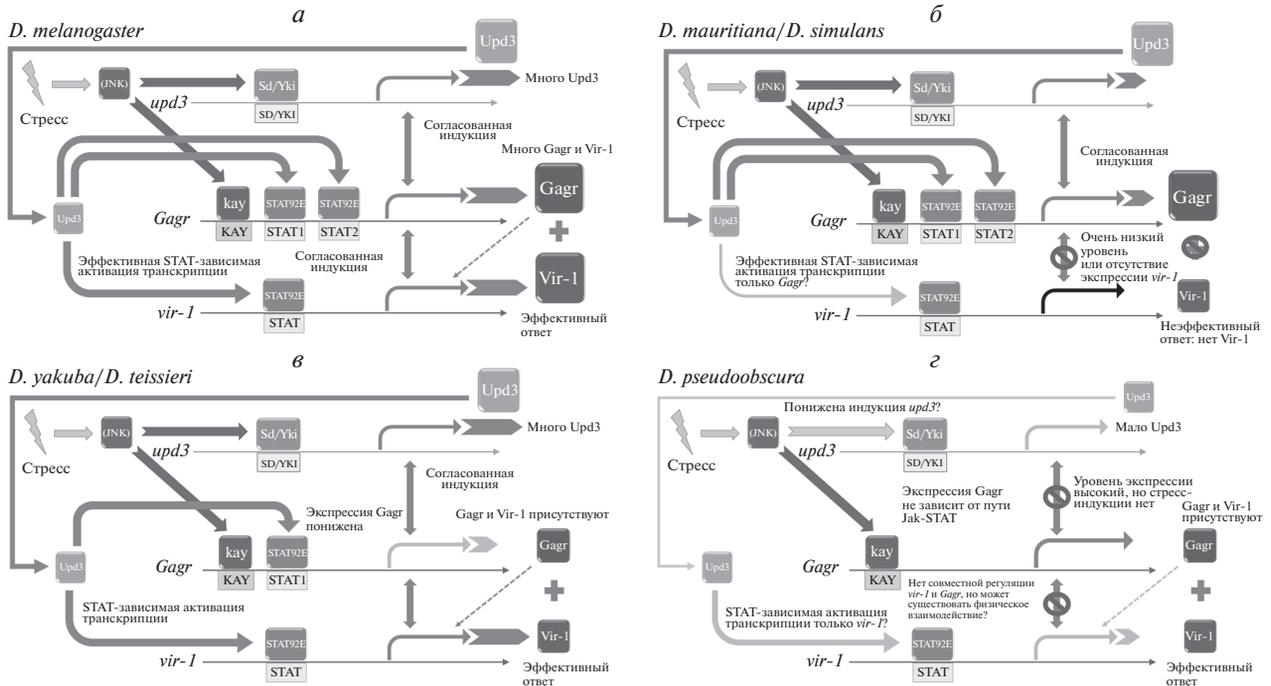


Рис. 4. Предполагаемая схема стресс-зависимой регуляции *Gagr* у видов рода *Drosophila*. *a* – Схема регуляции у *D. melanogaster*, *б* – *D. mauritiana* и *D. simulans*, имеющие два сайта связывания STAT92E в промоторе *Gagr*, но различный характер индукции *vir-1*. *в* – Схема регуляции у *D. yakuba* и *D. teissieri*, имеющих один (действующий) сайт связывания STAT. *г* – Схема регуляции у *D. pseudoobscura*, не имеющей сайтов связывания STAT в промоторе домашнего гена. Пояснения в тексте.

условиях. Согласно полученным результатам, самую низкую жизнеспособность на персульфате аммония показали виды, у которых наблюдалась низкая экспрессия *vir-1* в стрессовых условиях (*D. simulans* и *D. mauritiana*). Для *D. simulans* также характерно отсутствие индукции *upd3*, что может означать сниженную роль Jak-STAT в ответе на стресс у этого вида (рис. 4б). С другой стороны, более слабая стресс-индукция *vir-1* (и *upd3*) у *D. teissieri* по сравнению с *D. yakuba* на фоне одинаковой экспрессии *Gagr* не повлияла на жизнеспособность. Это может быть связано с непосредственным участием *Gagr* в регенеративной пролиферации и, возможно, во взаимодействии с *vir-1*, компенсирующим его пониженную экспрессию (рис. 4в). У *D. pseudoobscura*, не входящего в подгруппу *melanogaster*, характер экспрессии *vir-1* в условиях стресса различается и, по-видимому, никак не согласован с экспрессией *Gagr* (не реагирующей на стресс в обоих случаях). Это согласуется с предполагаемым отсутствием STAT-зависимой регуляции *Gagr* у этого вида (рис. 4г).

В отличие от стресс-индуцируемой экспрессии *Gagr*, *vir-1* и *upd3*, демонстрирующей межвидовую изменчивость, ген *Rel* сильно индуцируется только у *D. mauritiana* и очень слабо – у *D. melanogaster*. Практически полное отсутствие межвидовых различий в экспрессии *Rel* по сравнению с другими

тестируемыми генами свидетельствует об отсутствии прямого влияния сигнального пути IMD на стресс-индукцию *Gagr* у исследованных видов дрозофил.

Полученные результаты свидетельствуют о роле вовлеченности домашнего гена в клеточные сигнальные каскады стрессового ответа в ходе филогенеза рода *Drosophila*, но конкретные молекулярные функции гена *Gagr* и его белкового продукта, а также его партнеров до сих пор недостаточно изучены. Слабо охарактеризованы и функции ряда генов, имеющих общую с *Gagr* JNK/STAT-регуляцию и по характеру экспрессии являющихся маркерами стрессовых воздействий (в том числе *vir-1*). Функциональный анализ генетического и белкового окружения *Gagr* позволит лучше понять природу эволюционных преобразований, происходящих в процессе молекулярной доместикиции.

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

Статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dupressoir A., Marceau G., Vernochet C., Benit L., Kanellopoulos C., Sapin V., Heidmann T. (2005) Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**(3), 725–730.
2. Emera D., Wagner G.P. (2012) Transposable element recruitments in the mammalian placenta: impacts and mechanisms. *Brief. Funct. Genomics*. **11**(4), 267–276.
3. Henke C., Strissel P.L., Schubert M.-T., Mitchell M., Stolt C.C., Faschingbauer F., Beckmann M.W., Strick R. (2015) Selective expression of sense and antisense transcripts of the Sushi-ichirelated retrotransposon-derived family during mouse placentogenesis. *Retrovirology*. **12**, 9.
4. Kämmerer U., Germeyer A., Stengel S., Kapp M., Denner J. (2011) Human endogenous retrovirus K (HERV-K) is expressed in villous and extravillous cytotrophoblast cells of the human placenta. *J. Reprod. Immunol.* **91**(1–2), 1–8.
5. Mallet F., Bouton O., Prudhomme S., Cheynet V., Oriol G., Bonnaud B., Lucotte G., Duret L., Mandrand B. (2004) The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a *bona fide* gene involved in hominoid placental physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**(6), 1731–1736.
6. Cho G., Lim Y., Golden J.A. (2011) XLMR candidate mouse gene, *Zcchc12* (*Sizn1*) is a novel marker of Cajal–Retzius cells. *Gene Exp. Patterns*. **11**, 216–220.
7. Navas-Pérez E., Vicente-García C., Mirra S., Burguera D., Fernández-Castillo N., Ferrán J.L., López-Mayorga M., Alaiz-Noya M., Suárez-Pereira I., Antón-Galindo E., Ulloa F., Herrera-Úbeda C., Cuscó P., Falcón-Moya R., Rodríguez-Moreno A., D’Aniello S., Cormand B., Marfany G., Soriano E., Carrión Á.M., Carvajal J.J., Garcia-Fernández J. (2020) Characterization of an eutherian gene cluster generated after transposon domestication identifies *Bex3* as relevant for advanced neurological functions. *Genome Biol.* **21**, 267.
8. Benit L., Parseval N. De, Casella J.F., Callebaut I., Cordonnier A., Heidmann T. (1997) Cloning of a new murine endogenous retrovirus, MuERV-L, with strong similarity to the human HERV-L element and with a *gag* coding sequence closely related to the *Fv1* restriction gene. *J. Virol.* **71**(7), 5652–5657.
9. Kaneko-Ishino T., Ishino F. (2012) The role of genes domesticated from LTR retrotransposons and retroviruses in mammals. *Front. Microbiol.* **3**, 262.
10. Yap M.W., Colbeck E., Ellis S.A., Stoye J.P. (2014) Evolution of the retroviral restriction gene *Fv1*: inhibition of non-MLV retroviruses. *PLoS Pathogens*. **10**(3), e1003968.
11. Hantak M.P., Einstein J., Kearns R.B., Shepherd J.D. (2021) Intercellular communication in the nervous system goes viral. *Trends Neurosci.* **44**(4), 248–259.
12. Schrader L., Schmitz J. (2019) The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Mol. Ecology*. **28**, 1537–1549.
13. Chen W., Schwalie P.C., Pankevich E.V., Gubelmann C., Raghav S.K., Dainese R., Cassano M., Imbeault M., Jang S.M., Russeil J., Delessa T., Duc J., Trono D., Wolfrum C., Deplancke B. (2019) ZFP30 promotes adipogenesis through the KAP1-mediated activation of a retrotransposon-derived *Pparg2* enhancer. *Nat. Commun.* **10**(1), 1809.
14. Deng B., Xu W., Wang Z., Liu C., Lin P., Li B., Huang Q., Yang J., Zhou H., Qu L. (2019) An LTR retrotransposon-derived lncRNA interacts with RNF169 to promote homologous recombination. *EMBO Rep.* **20**(11), e47650.
15. Nefedova L., Kim A. (2017) Mechanisms of LTR-retroelement transposition: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Viruses*. **9**(4), 81.
16. Malik H.S., Henikoff S. (2005) Positive selection of Iris, a retroviral envelope-derived host gene in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* **1**(4), e44.
17. 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.
18. 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**(4), 396.
19. Dostert C., Jouanguy E., Irving P., Troxler L., Galiana-Arnoux D., Hetru C., Hoffmann 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**(9), 946–953.
20. Gruenewald C., Botella J.A., Bayersdorfer F., Navarro J.A., Schneuwly S. (2009) Hyperoxia-induced neurodegeneration as a tool to identify neuroprotective genes in *Drosophila melanogaster*. *Free Rad. Biol. Med.* **46**(12), 1668–1676.
21. Wright V.M., Vogt K.L., Smythe E., Zeidler M.P. (2011) Differential activities of the *Drosophila* JAK/STAT pathway ligands Upd, Upd2 and Upd3. *Cell. Signal.* **23**(5), 920–927.
22. Santabarbara-Ruiz P., Lopez-Santillan M., Martinez-Rodriguez I., Binagui-Casas A., Perez L., Milan M., Corominas M., Serras F. (2015) ROS-Induced JNK and p38 signaling is required for unpaired cytokine activation during *Drosophila* regeneration. *PLoS Genet.* **11**(10), e1005595.
23. Staley B.K., Irvine K.D. (2010) Warts and Yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Curr. Biol.* **20**(17), 1580–1587.
24. Biteau B., Karpac J., Hwangbo D., Jasper H. (2011) Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling. *Exp. Gerontol.* **46**(5), 349–354.
25. Ermolaeva M.A., Schumacher B. (2014) Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability. *Trends Genet.* **30**(3), 95–102.
26. Myllymäki H., Valanne S., Rämetsä M. (2014) The *Drosophila* Imd signaling pathway. *J. Immunol.* **192**, 3455–3462.
27. Jakob H., Leininger S., Lehmann T., Jacobi S., Gutewort S. (2007) Peroxo compounds, inorganic. In: *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/14356007.a19_177.pub2
28. Belozerov 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), 3695–3706.
29. Brun S., Vidal S., Spellman P., Takahashi K., Tricoire H., Lemaitre B. (2006) The MAPKKK Mekk1 regulates the expression of *Turandot* stress genes in response to septic injury in *Drosophila*. *Genes Cells*. **11**, 397–407.

Involvement of the *Gagr* Gene, a Domesticated *gag* Gene of Retrovirus, in the Stress Response Pathway in Different *Drosophila* Species

A. N. Gigin¹ and L. N. Nefedova^{1, *}

¹*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

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

The *Gagr* gene is a domesticated *gag* retroelement gene in *Drosophila melanogaster*, whose function is associated with a stress response. The protein products of the *Gagr* gene and its homologues in different *Drosophila* species have a highly conserved structure; however, they demonstrate a certain variability in the promoter region of the gene, apparently associated with the gradual acquisition of a new function and involvement in new signaling pathways. In this work we studied the effect of oxidative stress caused by ammonium persulfate on the survival of various species of the genus *Drosophila* (*D. melanogaster*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. yakuba*, *D. teissieri*, *D. pseudoobscura*), analyzed the correlation between the structure of promoter regions and stress-induced changes in the expression of the *Gagr* gene and its homologues in different *Drosophila* species and comparison of stress-induced changes in the expression of oxidative stress markers: Jak-STAT signaling pathway activator gene *upd3*, Jak-STAT pathway effector *vir-1*, and signaling pathway target IMD *Rel*. It was found that in *D. simulans* and *D. mauritiana* sensitivity to ammonium persulfate is significantly increased, which correlates with a reduced level of transcription of *vir-1* gene orthologues. The latter is due to a decrease in the number of binding sites for the transcription factor STAT92E, a component of the Jak-STAT signaling pathway, in the *vir-1* promoter region. Consistent changes in the expression of the *Gagr*, *upd3*, *vir-1* genes are observed in all species of the *melanogaster* subgroup, except *D. pseudoobscura*, which indicates an increase in the role of *Gagr* in the regulation of stress response pathways during the phylogenesis of the genus *Drosophila*.

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