

УДК 577.21

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ, РЕПРЕССИРУЮЩИХ ТРАНСПОЗОНЫ, В ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *Drosophila melanogaster*

© 2011 г. О. А. Соколова, Е. Ю. Якушев, А. Д. Столяренко,
Е. А. Михалева, В. А. Гвоздев*, М. С. Кленов

Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, 123182

Поступила в редакцию 09.11.2010 г.

Принята к печати 15.11.2010 г.

Комплексы белков семейства Piwi и коротких piРНК (Piwi-interacting RNA) осуществляют репрессию транспозонов в репродуктивных органах животных. Семейство Piwi у *Drosophila melanogaster* представлено тремя белками: Piwi, Aub и Ago3. Белок Piwi функционирует в ядрах соматических и герминальных клеток яичников, а Aub и Ago3 локализируются в цитоплазме герминальных клеток и участвуют в цикле амплификации piРНК в околоядерных гранулах, составляющих особую органеллу — nuage (облако). Известно, что мутации в генах системы piРНК влияют на дерепрессию отдельных мобильных элементов. В представленной работе мы количественно сравнили уровень экспрессии большего числа элементов при мутации в гене *piwi*, в генах *aub*, *mael* и *spn-E*, кодирующих белки гранул nuage, и в гене РНК-хеликазы *armi*, отсутствие которой не препятствует цитоплазматической амплификации piРНК, но нарушает ядерную локализацию белка Piwi. Обнаружено, что для репрессии ряда ретротранспозонов (*HMS-Beagle*, *Gate* и *HeT-A*) нужны гены *piwi*, *armi*, *aub*, *spn-E* и *mael*, которые действуют взаимосвязано, тогда как в репрессии мобильных элементов *I* и *G* участвуют все эти гены, кроме *piwi*. Мы предполагаем, что роль *Armi* не ограничивается его участием в обеспечении ядерной локализации Piwi. Полученные данные указывают на связь цитоплазматических белков nuage Aub, Spn-E и Mael с репрессией ретротранспозонов *Gate* и *HMS-Beagle*, осуществляемой Piwi в ядре. В целом, наши результаты подтверждают представление о стабилизации генома с использованием разных стратегий подавления экспрессии ретротранспозонов, специфичных в отношении отдельных элементов. В то же время, они свидетельствуют о существовании невыясненных пока механизмов взаимодействия между ядерными и цитоплазматическими компонентами piРНК-системы в герминальных клетках.

Ключевые слова: piРНК, короткие РНК, дрозофила, герминальные клетки, мобильные элементы, ретротранспозоны, сайленсинг, nuage, Piwi, репрессия генов.

THE INTERPLAY OF TRANSPOSON SILENCING GENES IN THE *Drosophila melanogaster* GERM-LINE, by O. A. Sokolova, E. Yu. Yakushev, A. D. Stolyarenko, E. A. Mikhaleva, V. A. Gvozdev*, M. S. Klenov (Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia; *e-mail: gvozdev@img.ras.ru). Complexes of Piwi proteins and Piwi-interacting RNAs (piRNAs) carry out the repression of transposable elements in animal gonads. The Piwi protein clade is represented in *D. melanogaster* by three members: Piwi, Aub and Ago3. Piwi protein functions in the nuclei of somatic and germinal ovarian cells, whereas Aub and Ago3 are cytoplasmic proteins of germinal cells. Aub and Ago3 interact with each other in the perinuclear nuage organelle to perform piRNA amplification via the ping-pong mechanism. Previously, derepression of several transposable elements as a result of mutations in the piRNA silencing system was shown. Here we quantify the increase in expression level of an enlarged number of retrotransposons due to the mutations in the *piwi* gene, nuage components coding *aub*, *mael* and *spn-E* genes and the RNA helicase *armi* gene mutation that impairs Piwi nuclear localization, but not the ping-pong cycle. We reveal that *piwi*, *armi*, *aub*, *spn-E* and *mael* genes participate together in the repression of several transposons (*HMS-Beagle*, *Gate* and *HeT-A*), whereas silencing of *I* and *G* elements requires the same genes except *piwi*. We suggest that *Armi* has other functions besides the localizing of Piwi protein in the nuclei. Our data suggest also a role of cytoplasmic Aub, Spn-E and Mael nuage proteins in Piwi-mediated repression of *Gate* and *HMS-Beagle* transposons in the germline nuclei. As a whole, our results corroborate the idea that genome stabilization in the germline is realized by different silencing strategies specific for different transposable elements. At the same time, our data suggest the existence of yet unknown mechanisms of interplay between nuclear and cytoplasmic components of the piRNA machinery in the germline.

Keywords: piRNA, short RNA, drosophila, germline, transposable elements, retrotransposons, silencing, nuage, Piwi, gene repression.

Принятые сокращения: piРНК — короткие РНК, взаимодействующие с белками Piwi (Piwi-interacting RNA); siРНК — короткие интерферирующие РНК (short interfering RNA); МЭ — мобильные элементы, или транспозоны; LTR — длинные концевые повторы (long terminal repeats); AP — щелочная фосфатаза.

* Эл. почта: gvozdev@img.ras.ru

Участие коротких РНК и РНК-интерференции в подавлении экспрессии транспозонов (мобильных элементов, МЭ) обнаружили около 10 лет назад [1, 2]. По современным представлениям подавление активности транспозонов может происходить с помощью всех трех основных типов коротких (21–30 н.) РНК – siРНК [3, 4], piРНК [5, 6] и даже микроРНК [7], но главная роль, особенно в герминальных клетках, отводится piРНК. Короткие РНК всех типов функционируют в составе комплексов с белками семейства Argonaute, в которое входят подсемейства Ago и Piwi. Эндогенные siРНК образуются при процессинге двухцепочечной РНК (дцРНК) белком Dicer и находятся в комплексе с белками подсемейства Ago, тогда как биогенез piРНК, связываемой белками подсемейства Piwi, не зависит от Dicer и, как считается, происходит при участии нуклеаз, расщепляющих одноцепочечный РНК-предшественник [5, 6, 8]. siРНК, направленная на репрессию МЭ, функционирует в соматических клетках разных организмов и в оогенезе млекопитающих [3, 4]. piРНК обнаружены в семенниках и яичниках разных животных [6, 8].

Способы образования piРНК и ее вклад в подавление экспрессии транспозонов лучше всего изучены у дрозофилы [6, 8]. piРНК образуется при процессинге протяженных транскриптов гетерохроматиновых областей генома (мастер-локусов), которые содержат фрагменты МЭ [9]. В ходе так называемого “первичного процессинга” не идентифицированная пока нуклеаза вырезает piРНК из транскриптов мастер-локусов. Подсемейство Piwi у *Drosophila melanogaster* представлено тремя белками: ядерным Piwi и цитоплазматическими Aub и Ago3. Все три белка связывают piРНК и обладают эндонуклеазной (“слайсерной”) активностью, необходимой для расщепления мишеней – РНК МЭ, участки которой комплементарны piРНК [9–11]. Предполагается, что piРНК в комплексе с ядерным белком Piwi могут не только осуществлять посттранскрипционную регуляцию экспрессии МЭ, но и вызывать изменения структуры хроматина комплементарных участков ДНК в ядре [12, 13].

Необходимо отметить, что в репродуктивных органах клетки разного типа могут различаться по составу белков, участвующих в piРНК-зависимой репрессии МЭ. В настоящей работе мы изучали закономерности подавления экспрессии транспозонов в яичниках дрозофилы, содержащих герминальные и соматические клетки. Развивающийся ооцит находится в яйцевой камере, которая состоит из герминальных питающих клеток и окружена слоем соматических фолликулярных клеток. Яйцевые камеры образуются в результате деления стволовых клеток, расположенных в особых зонах яичников – гермариях. В соматических клетках яичников присутствует белок Piwi, но не Aub и Ago3, здесь piРНК образуется исключительно за счет первичного процессинга [14, 15]. В герминальных клетках помимо первичного процессинга существует также меха-

низм амплификации piРНК при участии белков Aub и Ago3 – так называемый цикл “пинг-понг” [9, 11, 14, 15]. В ходе этого цикла расщепляемая с участием антисмысловой piРНК и белка Aub смысловая мРНК МЭ служит источником смысловой piРНК, которая, в свою очередь, включается в комплекс с белком Ago3 и используется для разрезания антисмыслового предшественника. piРНК, “запускающая” этот цикл, может образоваться за счет первичного процессинга, либо наследуется от матери (материнская piРНК) [9, 16]. Модель пинг-понг-цикла была предложена в результате обнаружения при секвенировании piРНК, образующих комплексы с разными белками подсемейства Piwi, пинг-понг-пар – частично перекрывающихся комплементарных последовательностей [9, 11]. Пинг-понг-цикл, по-видимому, осуществляется в околоядерной органелле герминальных клеток – piage, в которой колокализуются Aub и Ago3 [9, 14], а также находятся белки Spn-E, Maelstrom (Mael) и ряд других белков, участвующих в piРНК-зависимом сайленсинге [17–19]. Мутация гена предполагаемой РНК-хеликазы Spn-E полностью нарушает пинг-понг-цикл [14]. В процессах биогенеза piРНК участвует также предполагаемая РНК-хеликаза Armi, отсутствие которой препятствует транспорту Piwi в ядро, снижает количество piРНК, но лишь частично нарушает функционирование цикла пинг-понг [14]. Результаты, полученные в нашей работе, указывают на существование дополнительных, еще не выявленных функций этого белка, а также дополняют и расширяют представления о взаимосвязи разных стратегий репрессии МЭ, обеспечивающих стабильность генома в клетках зародышевого пути.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии *D. melanogaster*. Мух содержали при 25°C на стандартной среде. Использовали следующие линии, несущие мутации в генах piРНК-системы: *spindle-E (spn-E¹)*, генотип – *ru¹ st¹ spn-E¹ e¹ca¹/TM3, Sb¹ e^s* (точечная замена в хеликазном домене, индуцирована этилметансульфонатом) и *ru¹ st¹ spn-E^{hls3987} e¹ca¹/TM3, Sb¹ e^s* (мутация вызвана встраиванием Р-элемента) [20, 21]; *armi¹*, генотип – *w; armi^{72.1}/TM3 Sb¹ Ser¹* (мутация обусловлена встраиванием Р-элемента, что привело к делеции части 5'-нетранслируемой области гена *armi*) [22]; *aub*, генотип – *w¹¹¹⁸; aub^{QC42} cn¹ bw¹/CyO* и *w¹¹¹⁸; aub^{HN} cn¹ bw¹/CyO* (точечные замены в гене *aubergine*) [23]; *piwi*, генотип – *piwi²/CyO* (мутация вызвана встраиванием элемента *P-ry11*) [24, 25]; *mael*, генотип – *w*; mael^{r20}/TM3, Sb¹* [26] и *y¹ w^{67c23} mael^{EY08554}/TM3, Sb¹* (мутация вызвана встраиванием Р-элемента в 5'-нетранслируемую область гена *maelstrom*); *flamenco – flam^{OR}* [27], любезно предоставленная А. Кимом.

Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени. РНК выделяли с использованием реактива Trizol (“Invitrogen”) согласно инструкциям производителя. После осаждения этанолом РНК переосаждали LiCl в конечной концентрации 3 М, обрабатывали ДНКазой I (“Ambion”) и проводили обратную транскрипцию с oligo-dT-праймером и ревертазой SuperScript II (“Invitrogen”) согласно инструкциям производителя. Параллельно ставили контрольные опыты без добавления фермента (-RT). Во всех реакциях обратной транскрипции-ПЦР, приведенных в работе, продукты амплификации в -RT при тех же условиях не выявлялись.

Количественную ПЦР использовали для оценки количества транскриптов МЭ в яичниках мух, гомо- и гетерозиготных по мутациям. Количество ПЦР-продукта в реакционной смеси определяли после каждого цикла амплификации по флуоресценции красителя SYBR Green. В реакцию добавляли 3 мкл кДНК, по 2 мкл каждого праймера в концентрации 3.3 пМ, 3 мкл 10× буфера (0.67 М Трис-НCl, рН 8.8, 166 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween-20), 6 мкл 25 мМ MgCl₂, 6 мкл смеси четырех dNTP (концентрация каждого dNTP 1 мМ), SYBR Green I (1/10000 из стока стандартной концентрации, “Синтол”, Россия), ROX (1/3000 из стока с концентрацией 100 пмоль/мкл, “Синтол”) и 0.6 мкл ДНК-полимеразы Hot Start Taq (“СибЭнзим”, Россия). ПЦР проводили в амплификаторе Chromo4 (“BioRad”). Амплифицировали в тех же пробах и использовали для нормирования РНК генов *Adh* и *rp49*.

Использовали следующие праймеры: gypsy-for – 5'-CTTCACGTTCTGCGAGCGGTCT-3', gypsy-rev – 5'-CGCTCGAAGGTTACCAGGTAGGTTTC-3' – для выявления транскриптов МЭ *gypsy*; gtwin-s1 – 5'-GCCTCTAAAATTAGGGTTCTTTCAGTCC-3', gtwin-as1 – 5'-TCGCAGGATTGTCTGATAGTGTGATAC-3' – для выявления транскриптов МЭ *gtwin*; MDG1-d – 5'-AACAGAAACGCCAGCAACAGC-3', MDG1-r – 5'-CGTTCCCATGTCCGTTGTGAT-3' – для выявления транскриптов МЭ *MDG1*; GATE-s1 – 5'-CCTTTGGGAAGCAGGCGTAAA-3', GATE-as1 – 5'-TCTTCAGACATAGGAGAGAGCGGC-3' – для выявления транскриптов МЭ *Gate*; Het-A s2 – 5'-CGCAAAGACATCTGGAGGACTACC-3', Het-A as – 2 5'-TGCCGACCTGCTTGGTATTG-3' – для выявления транскриптов МЭ *HeT-A*; Beagle-s – 5'-TGATGAAACACATTACCAGAACSTTGA-3', Beagle-as – 5'-AATGCCSTTGTCGGACACGA-3' – для выявления транскриптов МЭ *HMS-Beagle*; I-el-s2 – 5'-TGAAATACGGCATACTGCCCCCA-3', I-el-as2 – 5'-GCTGATAGGGAGTTCGGAGCAGATA-3' – для выявления транскриптов *I*-элемента; G-el-s1 – 5'-CAGAACAAGTGCSTGAGTCAATCG-3', G-el-as1 – 5'-GTCCAGTCCGTTTTCAGCGTATCTCTCCG-3' – для выявления транскриптов *G*-элемента.

Транскрипты *Adh* выявляли с использованием праймеров Adh-d3 – 5'-CGGCATCTAAGAAGTGATACTCCCAAAA-3', Adh-r3 – 5'-TGAGTGTG-

CATCGAATCAGCCTTATT-3'; для выявления транскриптов *rp49* – *rp49-s2* – 5'-TCCGCCAGCATAACAGGC-3' и *rp49-as2* – 5'-CAATCCTCGTTGGCACTCACC-3'.

Гибридизация РНК *in situ*. РНК-зонд получали с помощью *in vitro* транскрипции с T7-РНК-полимеразой (“Promega”) и DIG RNA Labeling Mix (“Roche”) согласно инструкциям фирм-производителей на матрице линейаризованной плазмидной ДНК или ПЦР-продукта, несущего на одном конце T7-промотор. Зонд, выявляющий смысловую РНК *MDG1*, получали с использованием любезно предоставленного А. Калмыковой вектора pBS SK(-), содержащего фрагмент геномной ДНК размером 350 п.н. [28]. Смысловую РНК *HMS-Beagle* и *Gate* выявляли с использованием ПЦР-продуктов, полученных при амплификации геномной ДНК со следующими праймерами: 5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGA AATGCCCTTGTCGGACACGA-3' и 5'-TGATGAAACACATTACCAGAACSTTGA-3' для *HMS-Beagle*; 5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATTATGGCACTGCCAAGAAGGATAGCTC-3' и 5'-GCCATAACCCTCACTAAAGGGAAGTGGTGGCCGGCACTCACACG-3' – для *Gate* [29].

ДНК-матрицы очищали с помощью колонок Qiaquick (“Qiagen”) согласно инструкциям фирмы. После T7-транскрипции в течение 15 мин проводили обработку ДНКазой RQ1 (“Promega”). После осаждения и промывки 70%-ным этанолом РНК растворяли в 20 мкл обработанной диэтилпирикарбонатом (DEPC) воды и добавляли 80 мкл гибридационного буфера HS (50% формамид, 5× SSC, 0.1% Tween 20, 100 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося, 50 мкг/мл гепарина). Яичники препарировали в 1× PBS (137 мМ NaCl, 2.68 мМ KCl, 10.14 мМ Na₂HPO₄, 1.76 мМ KH₂PO₄), фиксировали в растворе 4%-ного параформальдегида в 1× PBS в течение 1 ч на льду, промывали 2 раза по 5 мин раствором PBT (1× PBS, 0.1% Tween 20) и в течение 10 мин обрабатывали раствором протеиназы К (“Boehringer Mannheim”) с концентрацией 50 мкг/мл в 1× PBS. Реакцию останавливали, добавляя раствор глицина с концентрацией 2 мг/мл в PBT в течение 2 мин. После этого органы промывали в PBT (2 раза по 5 мин), повторно фиксировали в течение 20 мин в 4%-ном растворе параформальдегида в 1× PBS и промывали 2 раза по 5 мин в PBT. Препарат промывали HS и PBT (1 : 1) и предгибридизовали в HS при 60°C в течение 1–3 ч. Гибридизацию проводили при 60°C в течение ночи в буфере HS, содержащем 2.5–5 нг/мкл зонда, и предварительно прогревом при 80°C в течение 3 мин. После гибридизации препарат последовательно промывали при 60°C: 3 раза по 30 мин буфером HS; 2 раза по 15 мин раствором 2× SSC с 0.1% Tween 20; 2 раза по 15 мин раствором 0.2× SSC с 0.1% Tween 20; 1 раз в течение 15 мин PBT при комнатной температуре.

Детекция при помощи щелочной фосфатазы.

Препарат блокировали в течение 1–2 ч при комнатной температуре в растворе 1× PBT-Triton 0.3% (PBT-Tr 0.3%) с добавлением козьей сыворотки до 3% и инкубировали в том же растворе с добавлением антител в течение 1 ч. Использовали антитела anti-DIG-AP (“Roche”), конъюгированные со щелочной фосфатазой (AP), в разведении 1 : 2000. Препарат последовательно промывали при комнатной температуре раствором PBT-Tr 0.3% (5 раз по 15 мин) и 1× PBT (1 раз, 15 мин). Для детекции AP препарат промывали буфером для AP (100 мМ NaCl, 50 мМ MgCl₂, 100 мМ Трис pH 9.5, 0.1% Tween 20, 1 мМ левамизол) в течение 10 мин и инкубировали в том же буфере с добавлением субстрата для AP NBT/BCIP (20 мкл стокового раствора (“Roche”) на 1 мл буфера AP) при комнатной температуре. Развитие реакции наблюдали визуально, реакцию останавливали через 0.5–1 ч с помощью нескольких промывок в PBT. Препарат помещали в 70%-ный раствор глицерина в 1× PBS и наносили на предметное стекло.

Флуоресцентная гибридизация РНК и иммуноокрашивание.

Флуоресцентный сигнал (FISH) выявляли методом тирамидной амплификации. После гибридизации препарат блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в растворе PBT-Tr 0.3% с добавлением сыворотки до 3% и перекиси водорода до 1% (для избавления от активности эндогенных пероксидаз). Затем препарат последовательно промывали при комнатной температуре раствором PBT-Tr 0.3% (4 раза по 15 мин) и инкубировали в растворе PBT-Tr 0.3% с добавлением антител в течение 1–2 ч при комнатной температуре (либо в течение ночи при +4°C). Использовали антитела anti-DIG-POD, Fab-фрагменты (“Roche”), конъюгированные с доменом пероксидазы, с разведением 1 : 500. Препарат промывали при комнатной температуре (4 раза по 15 мин) раствором PBT-Tr 0.3%, после чего инкубировали в том же растворе в течение 30 мин с добавлением Тирамид-FAM (20 мкл стокового раствора на 500 мкл PBT-Tr 0.3%), затем добавляли перекись водорода до концентрации 0.015% и инкубировали в течение 30–40 мин. Препарат промывали (4 раза по 15 мин) раствором PBT-Tr 0.3% и окрашивали ДНК раствором 1× DAPI в PBS в течение 10–20 мин. Для иммуноокрашивания белка Piwi яичники инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными кроличьими поликлональными антителами (1 : 500 в PBT-Tr 0.3%), предоставленными А. Аравиным и Г. Хэнноном [9], промывали 3 раза по 15 мин в PBT и инкубировали с вторичными антителами Alexa Fluor 488 (“Invitrogen”) в течение 3 ч при комнатной температуре или 18 ч при 4°C. Препараты помещали в раствор Slow-Fade® Gold (“Invitrogen”) и наносили на предметное стекло. Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 510 META (“Carl Zeiss”).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимосвязь регуляции соматических и герминальных мобильных элементов

Мы сравнили влияние мутаций, нарушающих образование белков piRNA-зависимого сайленсинга (Piwi, Armi, Spn-E, Aub и Mael), на количество транскриптов различных ретротранспозонов в яичниках дрозофилы. Использовали мутации *piwi*², *armi*¹, *spn-E*¹, трансгетерозигот *aub*^{QC42/aub}^{HN} (далее *aub*), а также линии *mael*^{r20} и *mael*^{EY08554} (суммарно обозначены как *mael*). На рис. 1 представлены отношения количества транскриптов у гомозигот по мутациям к их количеству у гетерозигот, измеренные методом ОТ-ПЦР. Ранее сообщалось о влиянии некоторых из этих мутаций на накопление транскриптов отдельных ретротранспозонов [2, 12, 18, 28–32]. Как видно из рис. 1, эффекты мутаций сильно различаются. Кроме того, варьирует спектр мутаций, вызывающих дерепрессию разных МЭ, что отчасти можно объяснить различиями в их транскрипции в разных клетках яичника. LTR-содержащие ретроэлементы *gypsy* и *gwin* экспрессируются в соматических фолликулярных клетках яичника, где их репрессия обеспечивается геном *piwi* [14, 33–35]. Мутация *piwi*² приводит к сильному накоплению (в 15–25 раз) РНК этих элементов, тогда как мутации *aub*, *mael*, *spn-E*¹ и *armi*¹ влияют незначительно или же совсем не влияют на экспрессию *gypsy* и *gwin* (рис. 1a). Этот результат хорошо согласуется с опубликованными данными, показавшими, что в соматических клетках в отличие от герминальных отсутствует пинг-понг-цикл амплификации piRNA, зависимый от генов *aub* и *spn-E* [14]. Отсутствие эффекта мутации *armi*¹ на экспрессию МЭ в фолликулярных клетках может быть связано с тем, что она нарушает синтез белка Armi только в герминальных клетках, но не затрагивает регуляторный элемент, обеспечивающий транскрипцию гена *armi* в соматических клетках яичников [36].

Необычна регуляция экспрессии другого LTR-транспозона – *МДГ1*. Как и в случае соматических МЭ *gypsy* и *gwin*, наиболее сильная дерепрессия *МДГ1* наблюдается при мутации *piwi*², а мутации *armi*¹, *aub* и *mael* не оказывают значительного эффекта (рис. 1a). Однако в отличие от соматических МЭ транскрипты *МДГ1* обнаруживаются методом гибридизации *in situ* как в соматических, так и в герминальных клетках яичников у мутантов *piwi*² (рис. 2a). Отсутствие влияния мутации *armi*¹, подтвержденное с помощью гибридизации *in situ* (рис. 2a), свидетельствует о том, что белок Piwi участвует в репрессии *МДГ1* исключительно в соматических, но не в герминальных клетках, поскольку мутация *armi*¹ полностью нарушает функционирование Piwi в ядрах герминальных клеток [14]. Таким образом, накопление транскриптов *МДГ1* в герминальных клетках на фоне мутации *piwi*² не связано с нарушением репрессии в самих герминальных

клетках, а происходит, по-видимому, в результате транспорта транскриптов из соматических клеток. Возможность такого транспорта РНК некоторых LTR-содержащих МЭ, экспрессирующихся в фолликулярных клетках, показана ранее [37, 38]. Возможность транспорта транскриптов *МДГ1* в герминальные клетки подтверждается тем, что мутация мастер-локуса *flamenco*, генерирующего рiРНК в соматических клетках [14], также приводит к накоплению транскриптов *МДГ1* не только в соматических, но и в герминальных клетках (рис. 2б).

Другая особенность регуляции элементов *МДГ1* — их заметная дерепрессия при мутации *spn-E¹* (рис. 1а). С помощью *in situ* гибридизации РНК обнаружено, что мутация *spn-E¹* вызывает накопление транскриптов *МДГ1* преимущественно в гермаририи — как в соматических, так и герминальных клетках, а также в яйцевых камерах ранних стадий, тогда как мутации *piwi²* и *flamenco* приводят к накоплению РНК *МДГ1* в яйцевых камерах всех стадий (рис. 2). Таким образом, в регуляции *МДГ1* принимают участие локус *flamenco*, а также гены *piwi* и *spn-E*, но не участвует рiРНК-система герминальных клеток, нарушаемая мутациями *aub*, *mael* и *armi¹*. Это беспрецедентный случай регуляции МЭ, который предполагает, что ген *spn-E* отвечает не только за пинг-понг-амплификацию рiРНК в герминальных клетках, но и, возможно, обеспечивает функционирование Piwi в соматических клетках гермаририи.

Роль *Armi* в герминальных клетках не ограничивается участием в обеспечении ядерной локализации *Piwi*

В герминальных клетках, наряду с ядерным белком Piwi, функционируют цитоплазматические рiРНК-связывающие белки Aub и Ago3, которые взаимодействуют друг с другом и осуществляют амплификацию рiРНК по механизму пинг-понг [14, 15]. Предполагается, что в пути сайленсинга с помощью Piwi участвует РНК-хеликаза Armi, поскольку в мутантах *armi* сохраняется пинг-понг-цикл, но нарушается локализация белка Piwi в ядрах герминальных клеток. В пути сайленсинга вместе с Aub/Ago3 функционируют РНК-хеликаза Spn-E и ряд других белков, входящих в состав piage [14]. Остается непонятным, почему в герминальных клетках одни рiРНК попадают в комплекс с Piwi, а другие — в комплекс с Aub и Ago3. Неясно также, насколько взаимосвязаны пути сайленсинга с помощью Piwi и Aub/Ago3, или они не зависят друг от друга, существуют ли общие стадии и общие компоненты этих двух путей. На рис. 1б представлены результаты анализа влияния различных мутаций на экспрессию *I*- и *G*-элементов LINE-типа. Известно, что рiРНК, комплементарные этим элементам, активно амплифицируются в пинг-понг-цикле в герминальных клетках [9, 14, 15]. Кроме того показано, что количество соответствующих этим транспозо-

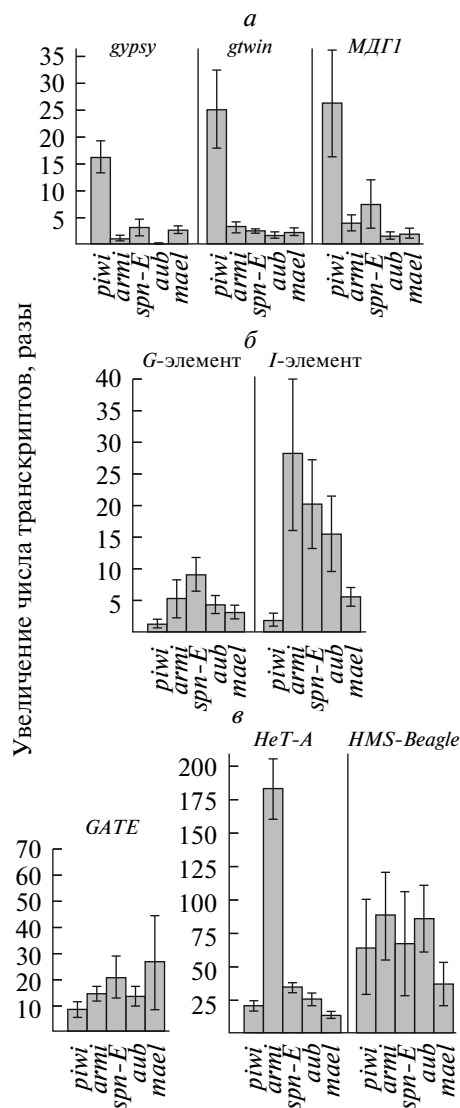


Рис. 1. Изменения количества транскриптов мобильных элементов при мутациях в генах системы рiРНК-сайленсинга. Представлены отношения количества транскриптов, оцениваемых методом количественной ОТ-ПЦР, у гомозигот по этим мутациям к их количеству у гетерозигот, нормированные по количеству РНК генов *adh* и *rp49*. Анализировали мобильные элементы, экспрессирующиеся в соматических (а) и герминальных (б, в) клетках яйчников *Drosophila*.

нам рiРНК, находящихся в комплексах с белками Ago3 и Aub, во много раз превышает их количество в комплексе с Piwi [9]. Действительно, мы обнаружили, что количество транскриптов *I*- и *G*-элементов возрастает при мутациях *aub* и *spn-E*, но не *piwi²* (рис. 1б). Неожиданностью оказалась дерепрессия этих элементов и при мутации *armi¹*, что особенно ярко выражено в случае *I*-элемента (рис. 1б) [12, 31]. Дерепрессию, вызванную мутацией *armi¹*, нельзя объяснить внеядерной локализацией Piwi, поскольку полное отсутствие Piwi при мутации *piwi²* не сказывается на накоплении транскриптов этого эле-

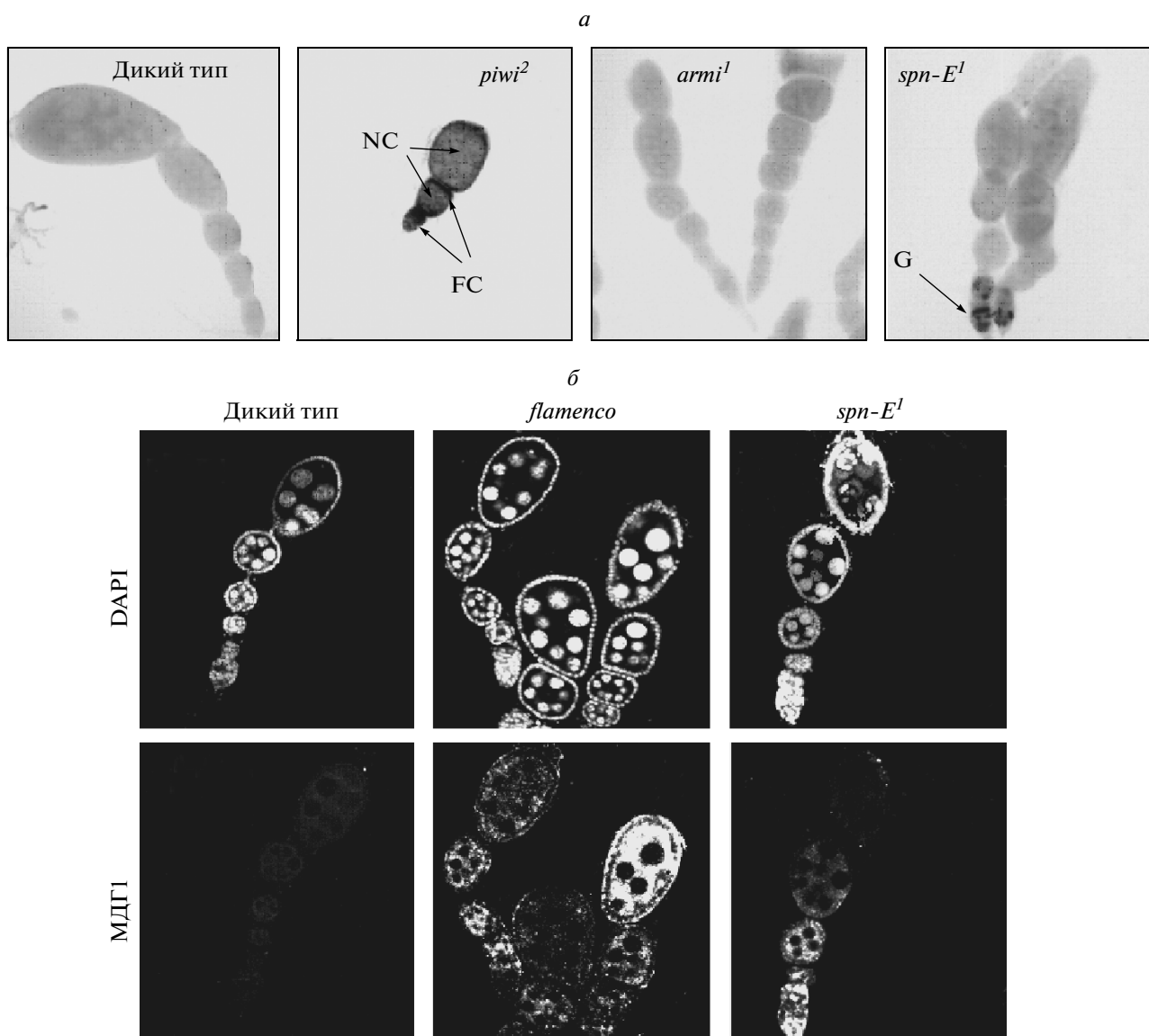


Рис. 2. Локализация РНК ретротранспозона *МДГ1* в яичниках мух, несущих мутации генов рiРНК-сайленсинга (*piwi*², *armi*¹, *spn-E*¹) и мастер-локуса *flamenco*. *a* – Гибридизация *in situ* с DIG-РНК зондом с последующей детекцией с помощью щелочной фосфатазы. Мутация *piwi*² вызывает накопление транскриптов в соматических фолликулярных (FC) и в герминальных питающих (NC) клетках яичников. Мутация *armi*¹ не приводит к значительному накоплению транскриптов. Мутация *spn-E*¹ приводит к накоплению РНК в соматических и герминальных клетках, преимущественно в гермариях (G) и ранних яйцевых камерах. *б* – Гибридизация *in situ* с последующей детекцией с помощью флуоресцентных антител. DAPI выявляет ядра клеток. В диком типе транскрипты МДГ1 не детектируются. Мутация локуса *flamenco* вызывает накопление транскриптов МДГ1 в соматических и герминальных клетках яйцевых камер различных стадий и гермария, *spn-E*¹ – преимущественно в клетках гермариев.

мента (рис. 1б). Таким образом, можно предполагать, что белок Argmi не только выполняет функции, связанные с ядерным импортом Piwi, но он вовлечен также в функционирование цитоплазматической рiРНК-системы Aub/Ago3 в герминальных клетках, причем эта роль Argmi не связана непосредственно с пинг-понг-амплификацией, поскольку значительное количество комплементарных пинг-понг-пар рiРНК сохраняется у мутантов *armi*¹ [14]. Мутация *armi*¹ приводит к сильной дерепрессии

герминального ретротранспозона *HeT-A*, во много раз превышающей эффекты других мутаций, например *spn-E* и *aub* (рис. 1в) [31]. Влияние мутации *piwi*² в этом случае несравненно слабее эффекта мутации *armi*¹. Это также свидетельствует о том, что влияние мутации *armi*¹ вряд ли определяется только лишь ядерной делокализацией Piwi. Недавно получены данные, предполагающие, что белок Argmi участвует в первичном процессинге рiРНК в цитоплазме соматических клеток яичников [36]. Наши

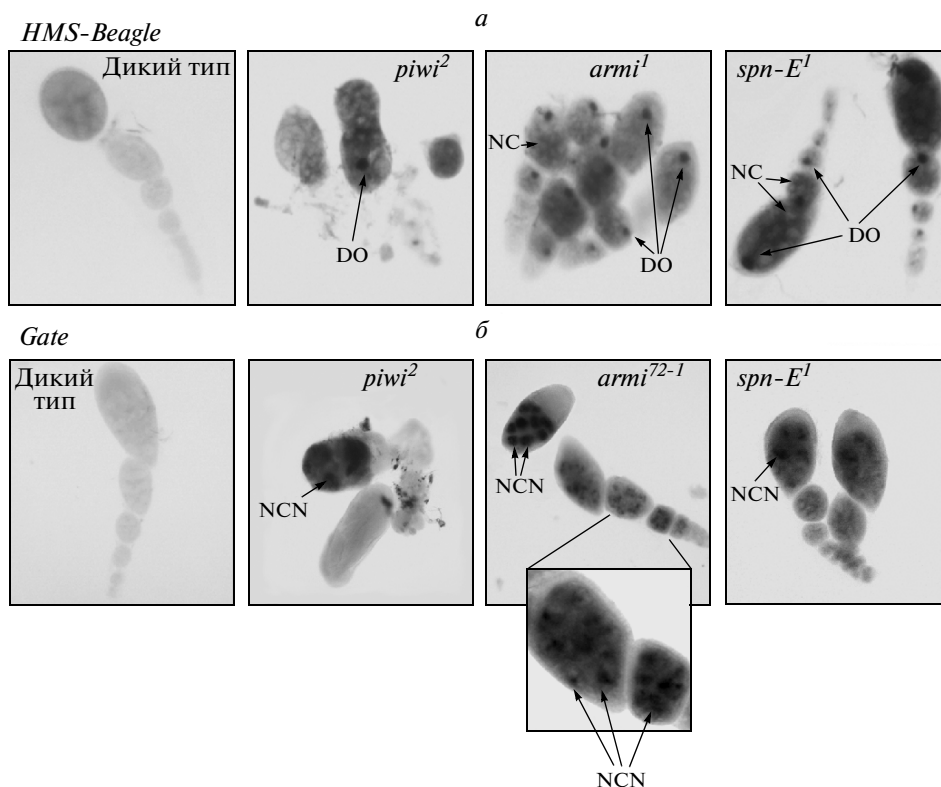


Рис. 3. Локализация РНК ретротранспозонов *HMS-Beagle* и *Gate* в яичниках мух, несущих мутации генов piRNA-сайленсинга. *a* – Мутации *piwi²*, *armi¹* и *spn-E¹* вызывают накопление транскриптов *HMS-Beagle* в развивающихся ооцитах (DO) и герминальных питающих клетках (NC) яичников. *б* – Транскрипты *Gate* накапливаются преимущественно в ядрах питающих клеток (NCN).

результаты можно интерпретировать, если предположить, что аналогичную роль *Armi* играет и в герминальных клетках. Механизм первичного процессинга, по-видимому, необходим для образования piRNA, загружаемых в комплекс с *Piwi*, а также с *Aub* [9]. Поэтому предположение об участии *Armi* в первичном процессинге в герминальных клетках позволяет объяснить влияние мутации *armi¹* на экспрессию *I*- и *G*-элементов, регулируемых с помощью *Aub/Ago3*-системы, но не *Piwi*. Сохраняющиеся у мутантов *armi* пинг-понг-пары piRNA [14] могут образоваться в результате амплификации piRNA, унаследованных от матери, но не piRNA, полученных в результате первичного процессинга. По-видимому, в piRNA-процессинге участвует РНК-хеликазный домен белка *Armi*. Известно, что РНК-хеликазы способны расплетать РНК, а также рестраивать РНК-белковые комплексы [39].

Взаимосвязь ядерного белка *Piwi* и компонентов piage

Самый сильный эффект мутации *piwi²* на дерепрессию герминально экспрессирующихся транспозонов обнаружен у LTR-содержащего элемента *HMS-Beagle* (рис. 1*б*). РНК *HMS-Beagle* накапливается в питающих клетках и в развивающихся ооци-

тах (рис. 3*а*), что похоже на описанный ранее характер распределения транскриптов *I*-элемента и *HeT-A* [30, 32]. Примерно одинаковая степень дерепрессии *HMS-Beagle* (в 60–80 раз) обнаружена при мутациях *piwi*, *armi*, а также генов *aub*, *spn-E* и *mael*, кодирующих белки, входящие в состав околоядерных гранул piage (рис. 1*в*). Эти данные показывают, что белок *Piwi* и цитоплазматические белки piage репрессируют этот МЭ независимо, а, скорее всего, совместно, поскольку нарушение любого компонента в этой системе приводит к одинаковым эффектам дерепрессии. Мы также обнаружили сходное влияние всех исследованных мутаций на дерепрессию элемента *Gate* (рис. 1*б*). С помощью гибридизации *in situ* мы выявили транскрипты *Gate* [29] в ядрах питающих клеток в случае мутаций *piwi²*, *armi¹*, *spn-E* (рис. 3*б*), *aub* и *mael* (данные не приведены). По-видимому, способность транскриптов этого МЭ к ядерному экспорту значительно снижена. Поскольку экспрессия *Gate* регулируется в клеточном ядре, логично предположить, что непосредственную репрессию этого МЭ осуществляет ядерный белок *Piwi*, а не цитоплазматические белки *Aub/Ago3*. Влияние на репрессию *Gate* мутаций в генах *aub*, *spn-E* и *mael*, кодирующих компоненты piage, можно объяснить, если предположить, что эта структура участвует в функционировании *Piwi*. Возможно, созревание

комплексов Piwi-piРНК и их транспорт в ядро питающих клеток происходят при участии компонентов piage. Известно, что в соматических фолликулярных клетках загрузка коротких РНК в комплекс с Piwi происходит в цитоплазме [36, 40]. Высказанное нами предположение позволяет объяснить ранее обнаруженное влияние гена *spn-E*, кодирующего белок piage, на структуру хроматина МЭ и ядерную репрессию *HeT-A* [12, 41].

Для понимания взаимосвязи piage с ядерным сайленсингом МЭ особый интерес могут представлять эффекты мутаций гена *mael*. Кодированный этим геном белок Mael, содержащий домены HMG (High mobility group), характерные для негистоновых белков хроматина [42], локализуется преимущественно в piage, но также мигрирует в ядро [17], однако роль этих перемещений и функции Mael в целом остаются непонятными. Мы обнаружили, что ядерная локализация Piwi сохраняется у мутантов по гену *mael* (рис. 4). Таким образом, Mael не участвует в ядерном импорте Piwi, что, тем не менее, не исключает его возможного участия в функционировании белка Piwi в ходе ядерного сайленсинга. В отличие от одних данных [15] и в соответствии с другими [14] мы показали, что мутация *aub* также не приводит к нарушению ядерной локализации Piwi, тогда как в мутантах *spn-E* значительное количество Piwi обнаруживается в цитоплазме, а в мутантах *armi¹*, как уже отмечалось, Piwi полностью исчезает из ядер герминальных клеток (рис. 4).

Наши данные свидетельствуют о том, что различные компоненты системы piРНК в яичниках *D. melanogaster* взаимодействуют значительно более тесно, чем это предполагалось. На примере транспозона *МДГ1* мы показали возможное пересечение соматического и герминального путей piРНК-сайленсинга. Наши результаты также указывают на необходимость гена *armi* не только для Piwi-, но и для *Aub*-зависимой репрессии МЭ и на возможную роль piage в ядерном сайленсинге МЭ с помощью Piwi, что позволяет рассматривать пути Piwi и *Aub/Ago3* как единую взаимосвязанную систему сайленсинга МЭ в герминальных клетках.

Авторы выражают глубокую благодарность А. Калмыковой за предоставленную плазмиду, содержащую последовательность *МДГ1*, А. Аравину и Г. Хэннону за антитела к Piwi, А. Киму — за линию мух *flam^{OR}*, а также С. Лаврову за помощь в проведении флуоресцентной *in situ* гибридизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-01812-а, 09-04-12101-офи_м), грантов президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-65160.2010.4), Программы Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” и Государственного контракта ГК № 02.740.11.2008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ketting R.F., Fischer S.E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G.J., Plasterk R.H. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**, 2654–2659.
2. Aravin A.A., Naumova N.M., Tulin A.V., Vagin V.V., Rozovsky Y.M., Gvozdev V.A. 2001. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr. Biol.* **11**, 1017–1027.
3. Ghildiyal M., Seitz H., Horwich M.D., Li C., Du T., Lee S., Xu J., Kittler E.L., Zapp M.L., Weng Z., Zamore P.D. 2008. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science.* **320**, 1077–1081.
4. Tam O.H., Aravin A.A., Stein P., Girard A., Murchison E.P., Cheloufi S., Hodges E., Anger M., Sachidanandam R., Schultz R.M., Hannon G.J. 2008. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature.* **453**, 534–538.
5. Klattenhoff C., Theurkauf W. 2008. Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development.* **135**, 3–9.
6. Malone C.D., Hannon G.J. 2009. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell.* **136**, 656–668.
7. Shalgi R., Pilpel Y., Oren M. 2010. Repression of transposable-elements — a microRNA anti-cancer defense mechanism? *Trends Genet.* **26**, 253–259.
8. Siomi H., Siomi M.C. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature.* **457**, 396–404.
9. Brennecke J., Aravin A.A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R., Hannon G.J. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell.* **128**, 1089–1103.
10. Saito K., Nishida K.M., Mori T., Kawamura Y., Miyoshi K., Nagami T., Siomi H., Siomi M.C. 2006. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev.* **20**, 2214–2222.
11. Gunawardane L.S., Saito K., Nishida K.M., Miyoshi K., Kawamura Y., Nagami T., Siomi H., Siomi M.C. 2007. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science.* **315**, 1587–1590.
12. Klenov M.S., Lavrov S.A., Stolyarenko A.D., Ryazansky S.S., Aravin A.A., Tuschl T., Gvozdev V.A. 2007. Repeat-associated siRNAs cause chromatin silencing of retrotransposons in the *Drosophila melanogaster* germline. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5430–5438.
13. Yin H., Lin H. 2007. An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature.* **450**, 304–308.
14. Malone C.D., Brennecke J., Dus M., Stark A., McCombie W.R., Sachidanandam R., Hannon G.J. 2009. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell.* **137**, 522–535.
15. Li C., Vagin V.V., Lee S., Xu J., Ma S., Xi H., Seitz H., Horwich M.D., Syrzycka M., Honda B.M., Kittler E.L., Zapp M.L., Klattenhoff C., Schulz N., Theurkauf W.E., Weng Z., Zamore P.D. 2009. Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell.* **137**, 509–521.

16. Brennecke J., Malone C.D., Aravin A.A., Sachidanandam R., Stark A., Hannon G.J. 2008. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science*. **322**, 1387–1392.
17. Findley S.D., Tamanaha M., Clegg N.J., Ruohola-Baker H. 2003. *Maelstrom*, a *Drosophila* spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1 homolog, Aubergine, in nuage. *Development*. **130**, 859–871.
18. Lim A.K., Kai T. 2007. Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 6714–6719.
19. Lim A.K., Tao L., Kai T. 2009. piRNAs mediate post-transcriptional retroelement silencing and localization to pi-bodies in the *Drosophila* germline. *J. Cell. Biol.* **186**, 333–342.
20. Gillespie D.E., Berg C.A. 1995. Homeless is required for RNA localization in *Drosophila* oogenesis and encodes a new member of the DE-H family of RNA-dependent ATPases. *Genes Dev.* **9**, 2495–2508.
21. Gonzalez-Reyes A., Elliott H., St Johnston D. 1997. Oocyte determination and the origin of polarity in *Drosophila*: the role of the spindle genes. *Development*. **124**, 4927–4937.
22. Cook H.A., Koppetsch B.S., Wu J., Theurkauf W.E. 2004. The *Drosophila* SDE3 homolog armitage is required for oskar mRNA silencing and embryonic axis specification. *Cell*. **116**, 817–829.
23. Schupbach T., Wieschaus E. 1991. Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics*. **129**, 1119–1136.
24. Lin H., Spradling A.C. 1997. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*. **124**, 2463–2476.
25. Cox D.N., Chao A., Baker J., Chang L., Qiao D., Lin H. 1998. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* **12**, 3715–3727.
26. Clegg N.J., Frost D.M., Larkin M.K., Subrahmanyam L., Bryant Z., Ruohola-Baker H. 1997. *maelstrom* is required for an early step in the establishment of *Drosophila* oocyte polarity: posterior localization of grk mRNA. *Development*. **124**, 4661–4671.
27. Pelisson A., Teyssset L., Chalvet F., Kim A., Prud'homme N., Terzian C., Bucheton A. 1997. About the origin of retroviruses and the co-evolution of the gypsy retrovirus with the *Drosophila flamenco* host gene. *Genetica*. **100**, 29–37.
28. Kalmykova A.I., Klenov M.S., Gvozdev V.A. 2005. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2052–2059.
29. Kogan G.L., Tulin A.V., Aravin A.A., Abramov Y.A., Kalmykova A.I., Maisonhaute C., Gvozdev V.A. 2003. The GATE retrotransposon in *Drosophila melanogaster*: mobility in heterochromatin and aspects of its expression in germline tissues. *Mol. Genet. Genomics*. **269**, 234–242.
30. Vagin V.V., Klenov M.S., Kalmykova A.I., Stolyarenko A.D., Kotelnikov R.N., Gvozdev V.A. 2004. The RNA Interference Proteins and *Vasa* locus are involved in the silencing of retrotransposons in the female germline of *Drosophila melanogaster*. *RNA Biology*. **1**, 54–58.
31. Vagin V.V., Sigova A., Li C., Seitz H., Gvozdev V., Zamore P.D. 2006. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*. **313**, 320–324.
32. Savitsky M., Kwon D., Georgiev P., Kalmykova A., Gvozdev V. 2006. Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline. *Genes Dev.* **20**, 345–354.
33. Sarot E., Payen-Groschene G., Bucheton A., Pelisson A. 2004. Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster flamenco* gene. *Genetics*. **166**, 1313–1321.
34. Pelisson A., Sarot E., Payen-Groschene G., Bucheton A. 2007. A novel repeat-associated small interfering RNA-mediated silencing pathway downregulates complementary sense gypsy transcripts in somatic cells of the *Drosophila* ovary. *J. Virol.* **81**, 1951–1960.
35. Mevel-Ninio M., Pelisson A., Kinder J., Campos A.R., Bucheton A. 2007. The *flamenco* locus controls the gypsy and ZAM retroviruses and is required for *Drosophila* oogenesis. *Genetics*. **175**, 1615–1624.
36. Olivieri D., Sykora M.M., Sachidanandam R., Mechtler K., Brennecke J. 2010. An *in vivo* RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *EMBO J.* **29**, 3301–3317.
37. Chalvet F., Teyssset L., Terzian C., Prud'homme N., Santamaria P., Bucheton A., Pelisson A. 1999. Proviral amplification of the Gypsy endogenous retrovirus of *Drosophila melanogaster* involves *env*-independent invasion of the female germline. *EMBO J.* **18**, 2659–2669.
38. Leblanc P., Desset S., Giorgi F., Taddei A.R., Fausto A.M., Mazzini M., Dastugue B., Vaury C. 2000. Life cycle of an endogenous retrovirus, ZAM, in *Drosophila melanogaster*. *J. Virol.* **74**, 10658–10669.
39. Котельников Р.Н., Шпиз С.Г., Калмыкова А.И., Гвоздев В.А. 2006. Белки, связывающие РНК, в процессах РНК-интерференции. *Молекуляр. биология*. **40**, 595–608.
40. Saito K., Inagaki S., Mituyama T., Kawamura Y., Ono Y., Sakota E., Kotani H., Asai K., Siomi H., Siomi M.C. 2009. A regulatory circuit for piwi by the large *Maf* gene traffic jam in *Drosophila*. *Nature*. **461**, 1296–1299.
41. Shpiz S., Kwon D., Rozovsky Y., Kalmykova A. 2009. rasiRNA pathway controls antisense expression of *Drosophila* telomeric retrotransposons in the nucleus. *Nucl. Acids Res.* **37**, 268–278.
42. Thomas J.O. 2001. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 395–401.