

*На правах рукописи*

**КАЛМЫКОВА Алла Ивановна**

**Эволюция и механизмы регуляции экспрессии  
повторяющихся генов в геноме *Drosophila***

03.00.26 – молекулярная генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва – 2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте молекулярной генетики РАН

**Научный консультант:**

Академик РАН, профессор В.А. Гвоздев

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, профессор А.И. Ким

Доктор биологических наук, профессор Д.А. Крамеров

Доктор биологических наук А.А. Буздин

**Ведущая организация:** НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова

Защита состоится \_\_\_\_\_ декабря 2009 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 002.37.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН по адресу 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991 г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат фармацевтических наук

Грабовская Л.С.

### Актуальность проблемы

Одна из наиболее захватывающих проблем геномики состоит в понимании молекулярных принципов эволюции генома, включающих такие аспекты, как появление новых генов, приобретение генами новых функций, появление и эволюция гетерохроматиновых локусов. Изучение механизмов регуляции экспрессии генов также остается одним из глобальных направлений исследований в биологии. Транскрипционный, посттранскрипционный и трансляционный уровни регуляции генной активности осуществляются сложными биохимическими путями, зачастую связанными между собой. Исследование экспрессии мобильных элементов, обогащенных разнообразными регуляторными элементами, является традиционным и наиболее плодотворным направлением в данной области. Особый интерес к мобильным элементам генома возник после обнаружения защитной клеточной системы, РНК интерференции (РНКи), распознающей в клетке присутствие двухцепочечной РНК (дцРНК). Повторяющиеся элементы являются источником дцРНК и мишенью РНКи. Мобильные элементы занимают значительную часть генома, составляя 15% генома *Drosophila* и 40% генома человека. Одним из классов мобильных элементов, представленных во всех изученных эукариотических геномах, являются ретротранспозоны — мобильные генетические элементы, перемещающиеся внутри генома путем образования РНК-копии. По своему природному происхождению мобильные элементы являются паразитическими последовательностями: их внедрение в жизненно важные гены может приводить к летальным или вредным мутациям, серьезному нарушению развития и возникновению некоторых форм рака. Тем не менее, они вносят значительный вклад в эволюцию генома-хозяина. Так, изменение регуляции активности гена за счет инсерции мобильного элемента может иметь адаптивное значение и быть подхваченным естественным отбором. Известны многочисленные примеры прямого использования регуляторных последовательностей мобильных элементов, таких как промоторы, энхансеры, сигнал полиаденилирования и т.д. для регуляции активности клеточных генов. Анализ геномных баз данных выявляет обширные группы функциональных генов, в регуляторной или кодирующей части которых находятся фрагменты мобильных элементов, причем, такое соседство может сохраняться в ходе эволюции. Наиболее ярким примером вклада мобильных элементов в регуляцию клеточных процессов являются теломеры *Drosophila*, образующиеся в результате присоединения ретротранспозонов к концам хромосом, что является уникальным примером выполнения жизненно важной функции паразитическими структурами генома.

В клетке существуют защитные механизмы, снижающие активность мобильных элементов. Важнейший из них — система РНКи: ее принято считать иммунитетом на уровне нуклеиновых кислот. Это открытие было сделано 10 лет назад американскими учеными Крэгом Меллоу и Эндрю Фаером (нобелевские лауреаты за 2006 г.). Механизм РНКи служит для подавления активности гена при появлении в клетке гомологичной дцРНК и возник эволюционно как защитная функция генома против вирусов и транспозонов. ДцРНК разрезаются на короткие интерференционные РНК, которые и служат, находясь в составе специальных белковых комплексов, основным посредником этого механизма, находя в клетке гомологичную им матричную РНК. В результате ферментативной активности белков, связывающих короткие РНК, происходит расщепление и деградация мРНК. Мутации генов, участвующих в РНКи, приводят к активации мобильных элементов у многих организмов. Особенную опасность для целостности генома представляет активность мобильных элементов в герминальных тканях, т.к. вызванные транспозициями нарушения генома передаются следующему поколению. Исследования последних лет позволили выявить особый биохимический путь, связанный с использованием коротких РНК и участвующий в подавлении активности мобильных элементов в герминальных тканях.

Не смотря на огромное количество работ, посвященных исследованию механизма РНКи, в этой области остается множество нерешенных проблем, связанных, в первую очередь, с биологической функцией различных коротких РНК в геноме.

Используя в качестве модельной системы хорошо изученный геном *D. melanogaster*, мы показали происхождение гетерохроматиновых тандемных повторов половых хромосом от эухроматинового функционального гена, а также проследили эволюционную историю одного из ретротранспозонов дрозофилы, для которого нами было показано существование в одном геноме структурных вариантов, принципиально отличающихся своими регуляторными свойствами. В данной работе было проведено исследование роли РНКи в регуляции активности широкого спектра ретротранспозонов *Drosophila* в герминальных тканях.

### **Цели и задачи исследования**

Целями настоящей работы было:

1) исследование эволюционной истории повторяющихся последовательностей генома дрозофилы на примере семейства семенник-специфичных генов, родственных  $\beta$  субъединице казеин киназы 2 (СК2) и ДКП(длинный концевой повтор)-содержащего ретротранспозона дрозофилы *1731*;

2) изучение роли различных компонентов системы РНКи на активность широкого спектра ретротранспозонов дрозофилы в герминальных тканях.

В первой части работы предполагалось исследовать эволюционную историю рассматриваемых генов, используя различные методы геномного анализа, такие как скрининги геномных и кДНК библиотек, ПЦР анализ геномной ДНК, анализ геномов различных видов *Drosophila*.

Основным подходом в исследованиях роли РНКи в регуляции экспрессии ретротранспозонов было сравнение уровня экспрессии и частоты транспозиций ретротранспозонов в норме и особях, мутантных по различным компонентам РНКи. В качестве объектов исследования были выбраны как паразитические ретроэлементы, так и те, которые выполняют жизненно-важную функцию в геноме, теломерные ретротранспозоны. В данном случае задачей исследования было понять, участвует ли система РНКи в регуляции длины теломер у дрозофилы, контролируя частоту перемещений теломерных ретротранспозонов на конец хромосомы. Для понимания механизма РНК-сайленсинга в герминальных клетках, предполагалось исследование основных интермедиатов процесса РНКи, коротких РНК, специфичных для ретроэлементов, а также изучение биогенеза антисмысловых РНК, как основного источника эффекторных коротких РНК, комплементарных мишени – кодирующей РНК ретроэлементов. Решение поставленных задач позволит ответить на вопрос о функциональной роли мобильных элементов и РНКи, как механизма контроля их активности, в эволюции регуляторных путей генома.

### **Научная новизна и практическая ценность работы**

В ходе выполнения работы исследовались вопросы, связанные с такими фундаментальными проблемами, как эволюция генома высших эукариот. Впервые показано, что протяженные участки гетерохроматина возникли путем амплификации функционального эухроматинового гена. Подробно прослежена эволюционная история одного из ретротранспозонов дрозофилы, что подчеркивает эволюционную лабильность мобильных элементов, которые являются мощным потенциалом для изменений генома их хозяев.

Изучена роль механизма РНКи в регуляции активности мобильных элементов генома в герминальных тканях, что чрезвычайно важно для сохранения целостности генома, так как перемещения мобильных элементов в предшественниках половых клеток являются наследуемыми и могут быть причиной мутаций, нарушения развития и опухолевой трансформации. Объектами исследования были как паразитические

ретротранспозоны, так и выполняющие жизненно важную функцию – теломерные ретроэлементы. Основным подходом в этих исследованиях было использование мутантов по генам системы РНКи, у которых, с помощью широкого спектра молекулярно-генетических и цитологических методов, изучалось поведение как эндогенных ретротранспозонов, так и трансгенных репортерных систем. Показано, что мутации компонентов РНК-сайленсинга приводят к значительному накоплению транскриптов ретротранспозонов в герминальных тканях дрозофилы. Впервые для высших эукариот удалось показать, что мутация *piwi*, основного компонента герминального пути РНК-сайленсинга, приводит не только к накоплению транскриптов, но и к повышенной частоте транспозиций ретроэлемента в герминальных тканях, что прямо доказывает роль системы РНКи в контроле частоты транспозиций ретротранспозонов.

Впервые показана роль механизма РНКи в регуляции длины теломер у эукариот. Теломерные ретротранспозоны дрозофилы отличаются от разбросанных по геному и перемещающихся случайным образом мобильных элементов; они перемещаются исключительно на конец хромосомы и выполняют важнейшую функцию поддержания теломер. Как показали наши исследования, эти элементы также являются мишенью системы РНКи. Мы показали, что экспрессия и транспозиция теломерных ретроэлементов *Drosophila melanogaster* находится под контролем некоторых генов, являющихся компонентами РНКи. Показано, что на фоне мутаций по генам РНКи происходит не только накопление транскриптов теломерных элементов в яичниках дрозофилы, но и увеличение частоты их транспозиций на конец хромосомы, что позволило сделать очень важный вывод о том, что система РНКи участвует в негативной регуляции длины теломер у дрозофилы. Этот механизм использует короткие РНК, комплементарные РНК-мишени, что указывает на важную роль антисмысловой транскрипции в осуществлении данного контроля. Мы обнаружили, что теломерный ретроэлемент *HeT-A* транскрибируется в обоих направлениях за счет активности двунаправленного промотора, исследование которого представляет общебиологический интерес с точки зрения понимания функционирования эукариотических промоторов. Впервые показано, что не только смысловые, но и антисмысловые транскрипты, являются мишенью системы РНКи. Недавние исследования показали, что многие клеточные гены транскрибируются в обоих направлениях, и являются потенциальными мишенями РНКи. Полученные на примере теломерных ретротранспозонов дрозофилы данные о биогенезе некодирующих антисмысловых РНК являются принципиально новыми в понимании роли антисмыслового пула РНК в регуляции клеточных генов.

В ходе выполнения работы исследовались также общие принципы организации теломер у *D. melanogaster*. Показано, что недавно обнаруженный в теломерах дрозофилы ретротранспозон *TAHRE* способен перемещаться на конец хромосомы, следовательно, этот элемент является полноправным участником поддержания теломер у дрозофилы. Детальная характеристика этого элемента позволила предположить, что *TAHRE* может служить источником ревертазы для перемещений ретротранспозона - *HeT-A* – основного компонента теломерной ДНК у дрозофилы, что указывает на разделение функций между различными элементами теломер дрозофилы.

Исследование роли РНКи в контроле длины теломер и формировании теломерного гетерохроматина является фундаментальной проблемой и позволит по-новому рассмотреть роль повторяющихся элементов в функционировании теломеры у разных организмов.

#### **Апробация работы**

Результаты, полученные в данной работе, были представлены на семинарах ИМГ РАН, на американских ежегодных конференциях по генетике дрозофилы (США, 1996, 1997, 2006, 2007), на международной конференции по гетерохроматину дрозофилы (Италия, 2005), на Кейстоунских симпозиумах, посвященных функциям микроРНК (2007, 2009), на ежегодных коллоквиумах по мобильным элементам (Франция, 2003, 2004), на конференции «Молекулярные механизмы процессов онтогенеза» (Москва, 2006), на международном конгрессе по мобильным элементам (Сан-Мало, Франция, 2008), а также на других конференциях и научных школах.

#### **Структура работы**

Диссертация изложена на 169 страницах. включает в себя стандартные разделы и иллюстрирована 3 таблицами и 36 рисунками.

Ряд данных, представленных в работе, был получен в результате плодотворного сотрудничества с Ю.А. Абрамовым, М.С. Кленовым, Я.М. Розовским, М.Ю. Савицким, Ю.Я. Шевелевым, с работавшими под руководством автора аспирантами А.А. Добрицей, Д.А. Квоном, С.Г. Шпизом, Е.Ю. Песковой, а также с К. Мезонот (Национальный центр научных исследований, Франция) и О.-Г. Иссингером (Университет г. Оденса, Дания), которым автор приносит глубокую благодарность.

## Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 статей в международных и отечественных рецензируемых журналах, из них 3 обзорные публикации.

## Результаты и обсуждение

### Молекулярная эволюция повторяющихся генов *Drosophila*

**Эволюционное происхождение генов дрозофилы, участвующих в сперматогенезе.**

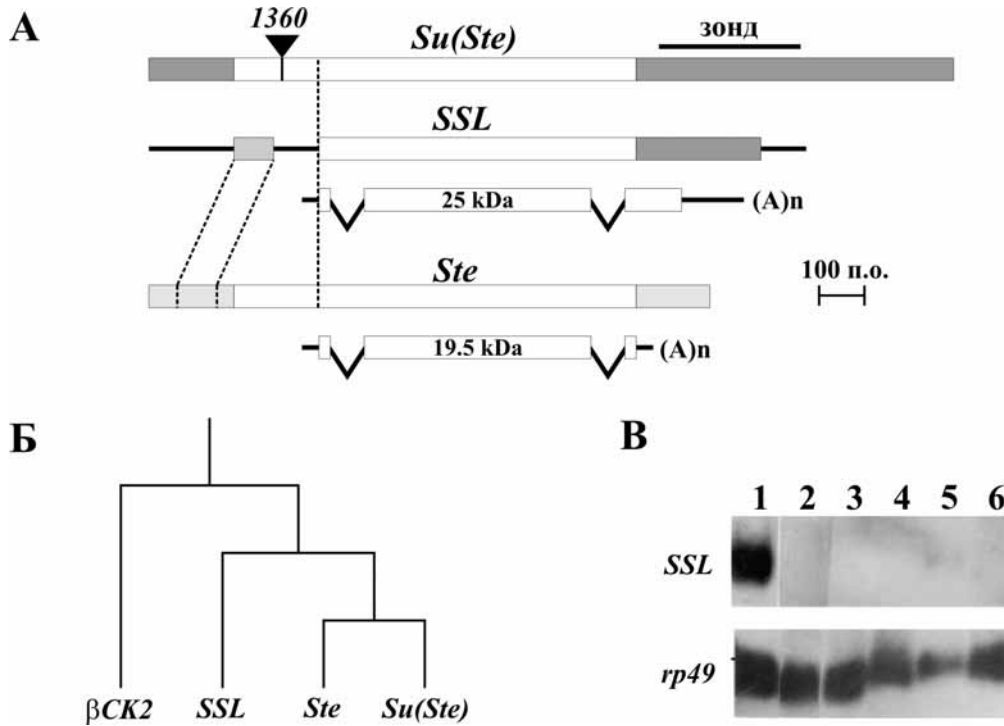
На основе молекулярно-эволюционного анализа были прослежены эволюционные взаимоотношения семейства родственных генов, участвующих в сперматогенезе.

Мы исследовали эволюцию гетерохроматиновых повторов *Stellate* (*Ste*) и *Suppressor-of-Stellate* (*Su(Ste)*). Гиперэкспрессия генов *Ste*, происходящая в отсутствие локуса *Su(Ste)*, приводит к накоплению в семенниках кристаллов белка *Ste*, родственного регуляторной  $\beta$ -субъединице казеин-киназы 2 (СК2), следствием чего является нарушение сперматогенеза и стерильность самцов. Экспрессия генов *Ste* супрессируется по механизму, близкому к РНКи, в котором основную роль играют короткие РНК, образуемые повторами *Su(Ste)* (Aravin et al. 2001). Был обнаружен новый уникальный эухроматиновый ген  *$\beta$ СК2tes*, кодирующий семенник-специфичную  $\beta$ -субъединицу СК2, сходный по своей структуре и нуклеотидной последовательности с генами *Ste* и *Su(Ste)*, и являющийся их эволюционным предшественником (рис.1).

Обнаружение этого гена приходится на то время, когда последовательность генома дрозофилы была еще не полностью представлена в базах данных. кДНК этого гена были выявлены случайно при скрининге библиотеки кДНК из семенников с помощью зонда, специфичного для генов *Su(Ste)*. Кроме кДНК генов *Su(Ste)*, был отобран ряд кДНК неизвестного гена, гомологичного генам *Su(Ste)* на 70% и обладающего протяженной ОРС, гомологичной  $\beta$ СК2. Ген был назван *SSL* (*Su(Ste)*-like), а позднее переименован в  *$\beta$ СК2tes* (от testes, семенники). Из космидной библиотеки генома дрозофилы был отобран клон, содержащий этот ген. Сравнение структуры гена и кДНК выявляет наличие двух интронов, положение и последовательность которых совпадает с интронами генов *Ste*. Гибридизация *in situ* с политенными хромосомами позволила картировать новый ген на 2 хромосоме, в сайте 60D1-2. На рис. 1А представлено сравнение структур трех родственных генов:  *$\beta$ СК2tes*, *Ste* и *Su(Ste)*. На основе молекулярно-эволюционного анализа нуклеотидной последовательности гена  *$\beta$ СК2tes* было показано, что этот ген произошел от предкового гена,  *$\beta$ СК2*, активного на всех



этапах развития, с участием обратной транскрипции, т.е. процесса образования копии ДНК на матрице РНК с последующим встраиванием этой копии в геном. Об этом



**Рис. 1 Семейство родственных генов, участвующих в сперматогенезе.**

**А** Сравнение структур родственных генов *Ste*, *Su(Ste)* и *SSL* (*βCK2tes*) и их транскриптов. Области гомологии не заштрихованы; Y-специфическая область *Su(Ste)* и гомологичный ей район гена *SSL* затемнены; заштрихованные участки обозначают специфичные районы для гена *Ste* и гомологичную им область в *SSL*. Тонкой линией обозначена последовательность, уникальная для гена *SSL*. Указан зонд, использованный для скрининга библиотеки кДНК. Мобильный элемент 1360 обозначен черным треугольником. **Б** Эволюционные взаимоотношения семейства генов, родственных регуляторной субъединице казеин киназы 2. **В** Нозерн-анализ РНК, выделенной из семенников (1), эмбрионов (2), личинок (3), куколок (4), самцов (5) и самок (6) выявляет семенник-специфичную экспрессию гена *SSL*. В качестве контроля нагрузки использовали гибридизацию с транскриптами конститутивно экспрессирующегося гена *rp49*.

свидетельствует отсутствие некоторых интронов, характерных для гена *βCK2*, в гене *βCK2tes*. При этом сохраняется непрерывная гомология аминокислотной последовательности. Можно предположить, например, интеграцию кДНК, образованной на частично процессированной РНК *βCK2*. В любом случае, точное вырезание трех интронов в гене *βCK2tes* по сравнению в предковом геном *βCK2* говорит о том, что *βCK2tes* является ретрогеном, причем, функциональным ретрогеном, как показали дальнейшие исследования.

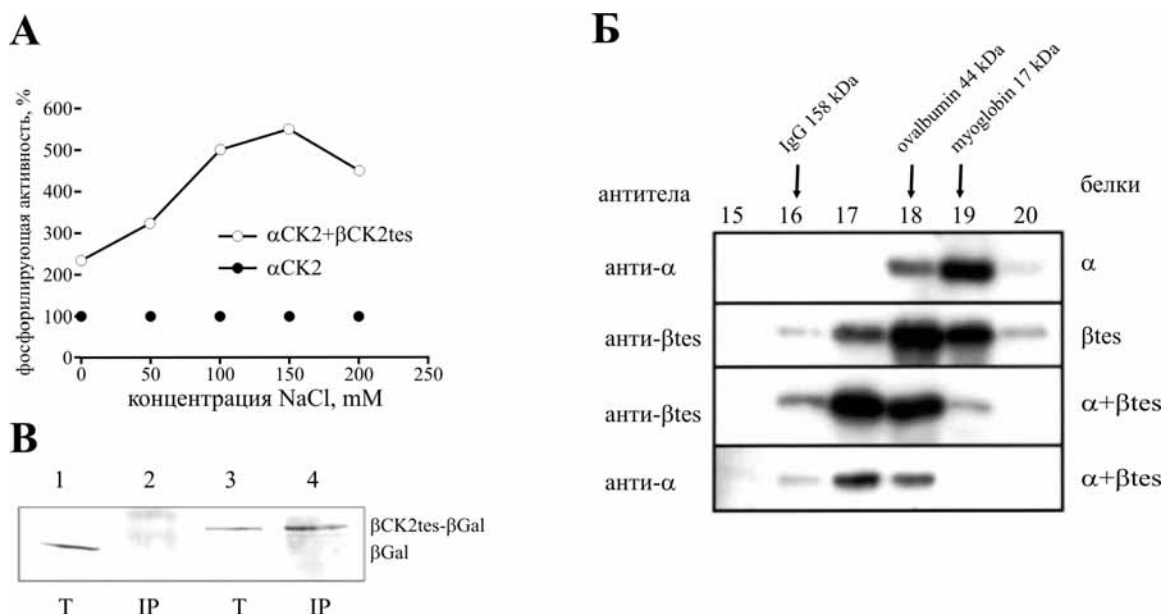
Эволюционную историю семейства генов, родственных регуляторной субъединице СК2, можно представить следующим образом (рис.1Б). Ген *βCK2tes* является

ретрогеном, произошедшим от гена  $\beta\text{CK2}$ , приобретая тканеспецифичные свойства. По-видимому, дупликация гена  $\beta\text{CK2tes}$  привела к появлению общего предка генов  $\text{Ste}/\text{Su}(\text{Ste})$ . Появившиеся гены  $\text{Ste}$  и  $\text{Su}(\text{Ste})$  в дальнейшем амплифицировались, дав начало современным кластерам гетерохроматиновых генов X и Y хромосом у *D. melanogaster*. В данном случае очевидно происхождение гетерохроматиновых генов половых хромосом от аутосомного гена, хотя некоторые промежуточные этапы эволюции пока остаются неясными. По-видимому, эволюция гетерохроматина половых хромосом имеет общие принципы для разных организмов, о чем свидетельствует происхождение гетерохроматиновых повторов Y хромосомы человека от аутосомного семенник-специфичного гена (Saxena et al. 1996).

Несмотря на гомологию всего в 45% между ОРС  $\beta\text{CK2tes}$  и  $\beta\text{CK2}$ , предполагаемый белок  $\beta\text{CK2tes}$  содержит консервативные участки, необходимые для его функционирования, как регуляторная субъединица холофермента СК2, такие как Glu-Asp-богатый мотив, С-конец, обогащенный пролинами, что важно для образования комплекса с каталитической  $\alpha$  субъединицей СК2, мотив «цинковые пальцы». СК2 является одним из ключевых клеточных протинкиназ, участвующих в регуляции клеточного цикла, развитии и дифференцировке. Было предположено, что  $\beta\text{CK2tes}$  кодирует тканеспецифичную, а именно, семенник-специфичную,  $\beta$  субъединицу СК2. Действительно, Нозерн-анализ выявляет транскрипты  $\beta\text{CK2tes}$  только в семенниках (рис. 1В). Биохимические исследования, проведенные нами *in vitro* на очищенном белке и на белковых экстрактах из тканей дрозофилы, продемонстрировали, что обнаруженный нами ген действительно кодирует регуляторную субъединицу протеинкиназы СК2 в семенниках (рис.2). Для исследования свойств белка  $\beta\text{CK2tes}$  были получены высокоспецифичные поликлональные кроличьи антитела к рекомбинантному белку, экспрессированному в *E. coli*.

Холофермент СК2 состоит из двух  $\alpha$  и двух  $\beta$  субъединиц, при этом  $\beta$  субъединицы способны увеличивать активность  $\alpha$  субъединиц, не обладая каталитической активностью. Мы исследовали способность  $\beta\text{CK2tes}$  стимулировать активность  $\alpha\text{CK2}$ , используя рекомбинантные белки  $\alpha\text{CK2}$  и  $\beta\text{CK2tes}$  в тесте *in vitro* с участием синтетического полипептида, являющегося субстратом СК2. Было показано, что активность  $\alpha\text{CK2}$  увеличивается в 5.5 раз в присутствии эквимольного количества белка  $\beta\text{CK2tes}$  в физиологических условиях (рис. 2А). Была также выявлена специфичность действия  $\beta\text{CK2tes}$  в отношении некоторых субстратов СК2, характерная для канонической регуляторной  $\beta\text{CK2}$ . Эксперименты с использованием метода гель-

филтрации выявляют способность рекомбинантных белков  $\alpha$ СК2 и  $\beta$ СК2tes образовывать гетеротетрамер  $\alpha$ 2 $\beta$ 2, характерный для СК2, а белок  $\beta$ СК2tes образует



**Рис. 2 Функциональная активность продукта гена  $\beta$ СК2tes.**

**А** Очищенный белок  $\beta$ СК2tes стимулирует активность  $\alpha$ СК2. Представлены графики зависимости фосфорилирующей активности  $\alpha$ СК2 от концентрации NaCl в присутствии (незакрашенные точки) или отсутствии (темные точки) эквимольного количества рекомбинантного белка  $\beta$ СК2tes. В качестве субстрата использовался синтетический пептид RRRDDDSDDD. **Б** Анализ состава комплекса  $\beta$ СК2tes и  $\alpha$ СК2 с помощью гель-филтрации. Белки  $\alpha$ СК2 и  $\beta$ СК2tes по отдельности и в эквимольном соотношении были пропущены через колонку Superose 6, Pharmacia SMART system. Полученные фракции были проанализированы с помощью Вестерн-анализа с использованием анти-  $\beta$ СК2tes и анти-  $\alpha$ СК2 антител. Позиции белковых маркеров указаны стрелками. **В** Иммунопреципитация слитного белка  $\beta$ СК2tes- $\beta$ -галактозидаза из экстракта семенников с помощью анти-  $\alpha$ СК2 антител. Белковый экстракт из семенников трансгенных самцов, экспрессирующих  $\beta$ -галактозидазу (1) или слитный белок  $\beta$ СК2tes- $\beta$ -галактозидаза (3) был преципитирован с анти-  $\alpha$ СК2 антителами. Полученный комплекс был очищен и проанализирован с помощью Вестерн-анализа и антител против  $\beta$ -галактозидазы (2 и 4). Т – белковый экстракт из семенников; IP – очищенный комплекс после иммунопреципитации.

гомодимер (рис.2Б). И наконец, иммунопреципитация экстракта белков из семенников с использованием антител к  $\alpha$ СК2 выявляет в связавшейся фракции белок  $\beta$ СК2tes, что прямо указывает на то, что  $\beta$ СК2tes входит в состав холофермента СК2 в семенниках (рис. 2В). Это первый пример обнаружения отдельного гена для регуляторной субъединицы протеинкиназы СК2, продукт которого выполняет тканеспецифичную роль.

Ген  $\beta$ СК2tes является примером появления в геноме функционального ретрогена. Поскольку ретрокопии лишены регуляторных последовательностей, обычно они

образуют в геноме псевдогены, т.е. гены, не способные экспрессироваться, подвергаться воздействию отбора и поэтому постепенно вырождающиеся. Было предположено, что в данном случае ретрокопия, по-видимому, попала под влияние семенник-специфичных регуляторных элементов, которые либо возникли в результате мутаций, либо предсуществовали в месте интеграции этой копии в геноме. Действительно, секвенирование космиды, содержащий ген *βCK2tes*, выявило на расстоянии меньше, чем 1 т.п.н., от гена *βCK2tes* другой семенник-специфичный ген, *Pros28.1B*. Этот ген также является геномной копией конститутивно-экспрессирующегося гена *Pros28.1*. После появления геномного сиквенса стало возможным провести транскрипционное картирование района ближайшего окружения генов *βCK2tes* и *Pros28.1B*, в результате чего в этом районе были выявлены другие гены, имеющие семенник-специфичную экспрессию (Kalmykova et al. 2005). Данные о присутствии в одном коротком хромосомном фрагменте не родственных друг другу генов, проявляющих одинаковый тип транскрипции (в семенниках), позволили выдвинуть гипотезу о существовании внутри кластера общих для всех генов ткане-специфичных регуляторных элементов, координированно активирующих их транскрипцию на определенной стадии сперматогенеза. В дальнейшем, анализ геномов различных организмов позволил выявить кластеры ткане-специфичных генов у дрозофилы и других организмов.

### **Эволюция структурных вариантов ретротранспозона *Drosophila 1731***

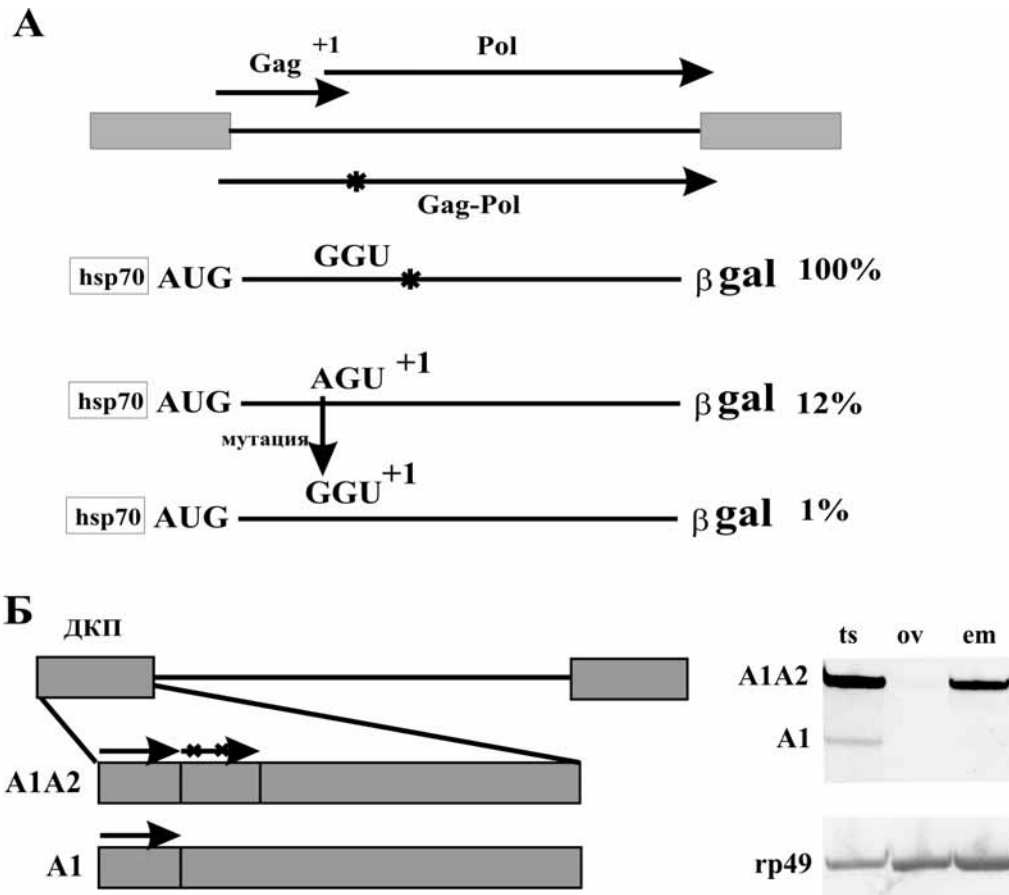
Функциональная роль и эволюционное значение ретротранспозонов, составляющих значительную часть генома эукариот, являются темой нескончаемых научных дискуссий. Накоплен большой экспериментальный материал, демонстрирующий процесс коадаптации ретротранспозонов и генома хозяина. Многие клеточные гены заимствовали у ретроэлементов их регуляторные участки, такие как энхансеры, участки полиаденилирования, сайты связывания с регуляторными белками. Впечатляющим примером являются теломеры дрозофилы, основной составляющей частью которых являются ретроэлементы. Увеличивающееся число данных о вовлечении и использовании ретротранспозонов в систему регуляции генома дает основания считать, что эти элементы поддерживаются в геноме как источник молекулярных возможностей для эволюционных изменений. Необходимость избежать систему защиты генома, направленную на подавление экспансии мобильных элементов, приводит к быстрому эволюционированию регуляторных и структурных функций ретротранспозонов, о чем ярко свидетельствует полиморфизм мобильных элементов. Именно с функциональной

точки зрения была исследована эволюция ретротранспозонов в разных видах дрозофилы на примере ДКП-содержащего ретротранспозона *1731*, для которого нами было показано существование структурных вариантов, принципиально отличающихся своими регуляторными свойствами и стратегией экспрессии.

Мы исследовали детально структурные варианты регуляторной и кодирующей областей ретротранспозона *1731* (рис.3). Показано существование двух типов копий, различающихся структурными изменениями в области трансляционного сдвига рамки считывания. Один тип копий, в результате механизма сдвига рамки трансляции +1 (+1 frameshifting), кодирует, как и многие ретровирусы и ретротранспозоны, два полипептида, Gag и Pol, необходимых в определенном соотношении для обеспечения жизненного цикла ретроэлемента. Сдвиг рамки обеспечивается трансляционной паузой; обычно это редко используемый сериновый кодон AGU. В данном случае в районе предполагаемого сдвига рамки находятся два таких кодона. Второй тип копий содержит делецию одного нуклеотида после предполагаемого сайта сдвига рамки, что приводит к образованию слитной рамки (Рис. 3А). Анализ представительной выборки клонов, содержащих район сдвига рамки, из разных видов *Drosophila* подгруппы *melanogaster*, выявил, что такой вариант является наиболее распространенным в геномах *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* и *D. sechellia*. Однонуклеотидная делеция выявляется в различных позициях, что предполагает возникновение слитной рамки в результате независимых событий. Во всех копиях со слитной рамкой наблюдаются замены нуклеотидов в области сдвига рамки, причем эти замены приводят к появлению часто используемых кодонов вместо двух «редких» сериновых кодонов. Доказана роль одного из сериновых кодонов в механизме сдвига рамки (рис.3А). Присутствие этих замен, повышающих эффективность трансляции белка, указывает на то, что подобные изменения возникли под давлением отбора. Эти замены элиминируют трансляционную паузу, а однонуклеотидная делеция восстанавливает рамку Pol в отсутствие +1 сдвига рамки (рис.3А). В результате этих эволюционных событий образуется слитный белок, обладающий такими свойствами составляющих его белков Gag и Pol, как сигнал ядерной локализации и ревертазная активность. Можно предположить, что слитный полипептид, являющийся неканоническим для ретротранспозонов, однако кодируемый большинством копий элемента *1731*, мог приобрести новую функцию в геноме.

Для этого же ретротранспозона *1731* был выявлен полиморфизм регуляторной области длинного концевого повтора. Известно, что ДКП разных ретротранспозонов содержат большой набор регуляторных элементов, таких как энхансеры, инсуляторы, сайты связывания многих регуляторных белков. ДКП ретротранспозона *1731* содержит

элементы, ответственные за гормональный ответ, тепловой шок и стрессовые воздействия (Ziarczyk and Best-Belpomme 1991). Выявлены два варианта копий *1731*, в одном из которых содержится удвоенный участок в ДКП размером 28 пар нуклеотидов (рис. 3Б). Появление тандемных дупликаций характерно для активности



**Рис. 3 Структурные варианты ретротранспозона 1731.**

**А** структурный полиморфизм в области сдвига рамки трансляции. Прямоугольниками обозначены длинные концевые повторы (ДКП); стрелками - открытые рамки считывания; звездочкой - делеция; +1 обозначает область сдвига рамки. Указаны триплеты, участвующие в механизме сдвига рамки: редко встречающийся сериновый кодон AGU и часто встречающийся глициновый кодон GGU. Приведены схемы конструкций, использованных для измерения эффективности трансляции белков ретротранспозона *1731* в системе трансфекции культуры клеток. Относительное количество репортерного белка β-галактозидазы обозначено в %.

**Б:** структурный полиморфизм длинного концевого повтора ретротранспозона *1731*. Представлены типы ДКП A1A2 и A1. Стрелками обозначена повторяющаяся последовательность, крестиками - нуклеотиды, по которым различаются повторы. Справа представлены результаты полуколичественного RT-PCR, выявляющего транскрипты A1A2 копий в семенниках (ts), яичниках (ov) и эмбрионах (em), а A1 копий - только в семенниках. В качестве контроля нагрузки использовали RT-PCR для конститутивно экспрессирующегося гена *rp49*.

обратной транскриптазы, основного фермента ретроэлементов. Возникающие повторы могут дивергировать и приобретать разные свойства. Так в случае с ретротранспозоном *1731* - в копиях, несущих дупликацию (A1A2), повторы лишь слегка различаются по

последовательности, но обладают совершенно разными функциями. Известно, что только один из повторов ответственен за гормональный ответ и регуляцию при тепловом шоке. В геноме сохранились также исходные копии, не содержащие дубликацию этого района (A1). Эти копии не обладают новыми регуляторными элементами, отвечающими на тепловую и гормональную регуляцию. Была исследована тканевая специфичность экспрессии двух выявленных вариантов ДКП. Показано, что вариант A1A2 экспрессируется в эмбрионах, культуре клеток, герминальных тканях, т.е. обладает более широким спектром экспрессии, чем вариант A1, который преимущественно экспрессируется в семенниках (рис.3Б). Кроме того, в геномах трех независимо полученных клеточных культур, где многие мобильные элементы амплифицируются, происходит преимущественная экспансия варианта A1A2. Дубликация произошла до того, как разделились виды подгруппы *melanogaster*, т.к. подобные структурные варианты обнаружены в геномах *D. simulans*, *D. mauritiana* и *D. sechellia*. Интересно то, что в геноме *D. mauritiana* структурный вариант A1 является доминирующим, в то время как в других видах преобладают копии A1A2.

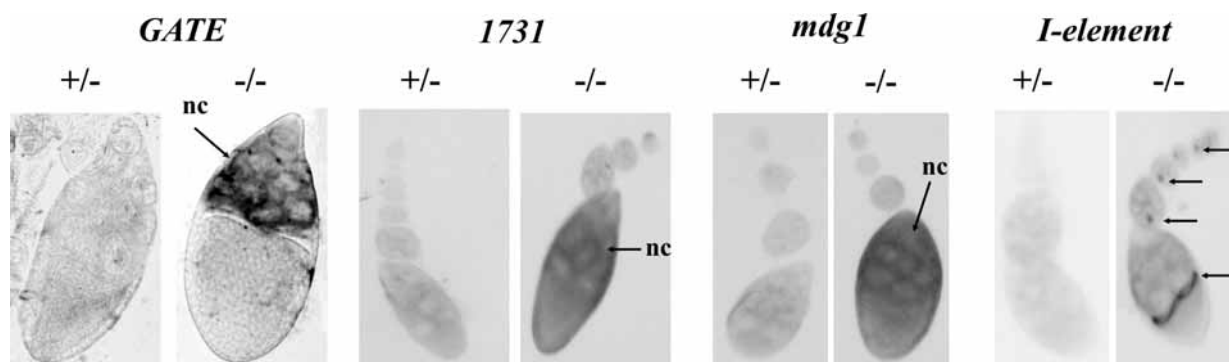
Анализ последовательности генома *D. melanogaster*, собственных данных, а также отдельных ранее описанных клонов ретротранспозона 1731, позволил сделать вывод о том, что основное количество активных копий этого элемента в геноме *D. melanogaster* представлено структурным вариантом, обладающим дубликацией в ДКП и кодирующим слитный белок. Т.о., удалось проследить замену одного типа копий ретротранспозона в геноме на функционально и структурно иной тип копий, что произошло за эволюционно короткий срок. Существование в одном геноме нескольких структурно-функциональных вариантов ретротранспозона указывает на эволюционную динамику мобильных элементов, что вносит вклад в эволюционный потенциал генома.

### **Роль системы РНК-сайленсинга в регуляции активности широкого спектра ретротранспозонов в герминальных тканях *Drosophila***

#### **Дерепрессия ретротранспозонов в яичниках *Drosophila* у мутантов piРНК пути**

Мобильные элементы являются источником возникновения мутаций и нарушений развития, поэтому их активность в геноме строго контролируется. РНКи является важным регуляторным механизмом, контролирующим экспрессию и частоту перемещений мобильных элементов в разных организмах. Согласно последним данным, у дрозофилы существуют три класса коротких РНК и три пути, работающие с их участием. микроРНК, образующиеся из шпилечных структур, и кодируемые

клеточными генами, осуществляют трансляционный контроль клеточных мРНК. piРНК (Piwi interacting), имеющие размер 25-29 нт., служат для подавления активности мобильных элементов в герминальных тканях, где они взаимодействуют с особыми белками семейства Аргонавт, относящимися к подсемейству Piwi (Vagin et al. 2006; Brennecke et al. 2007). Их биогенез пока остается загадкой, т.к. эндонуклеазы Dicer, участвующие в образовании микроРНК и siРНК (short interfering RNA), не влияют на процессинг piРНК в герминальных тканях. siРНК образуются из дцРНК с помощью рибонуклеазы Dicer2 и в комплексе с белком Ago2, осуществляют посттранскрипционную деградацию гомологичной РНК-мишени (Hammond 2005). Считалось, что этот путь направлен на экзогенную дцРНК вирусного происхождения, или искусственно введенную. Недавно методом секвенирования библиотек коротких РНК было показано существование эндогенных siРНК, endo-siРНК, гомологичных разнообразным мобильным элементам и образующихся с помощью белков Dcr2 и Ago2 в соматических тканях (Czech et al. 2008; Ghildiyal et al. 2008; Kawamura et al. 2008). По-видимому, в соматических тканях также осуществляется РНКи-зависимое подавление экспрессии мобильных элементов, хотя несколько другим путем, нежели в герминальных тканях.



**Рис. 4 Влияние мутации гена *spn-E* на экспрессию ретротранспозонов в яичниках.** Представлены результаты РНК *in situ* гибридизации с использованием однонитевых зондов, выявляющих смысловые транскрипты ретротранспозонов *GATE*, *1731*, *mdg1*, *I*-элемента в яичниках гетерозиготных самок *spn-E/+* (+/-) и гомозиготных самок *spn-E/spn-E* (-/-). Накопление транскриптов *GATE*, *mdg1* и *1731* наблюдается в питающих клетках (nc), а *I*-элемента – как в питающих клетках, так и в области ооцита (обозначено черными стрелками).

Особенно важен контроль активности ретротранспозонов в герминальных клетках, т.к. мутации, вызванные перемещениями мобильных элементов в этих тканях, передаются следующему поколению. Методом *in situ* РНК гибридизации было изучено влияние мутаций, нарушающих образование белков, участвующих в piРНК пути, на характер транскрипции ретротранспозонов, относящихся к различным классам, в

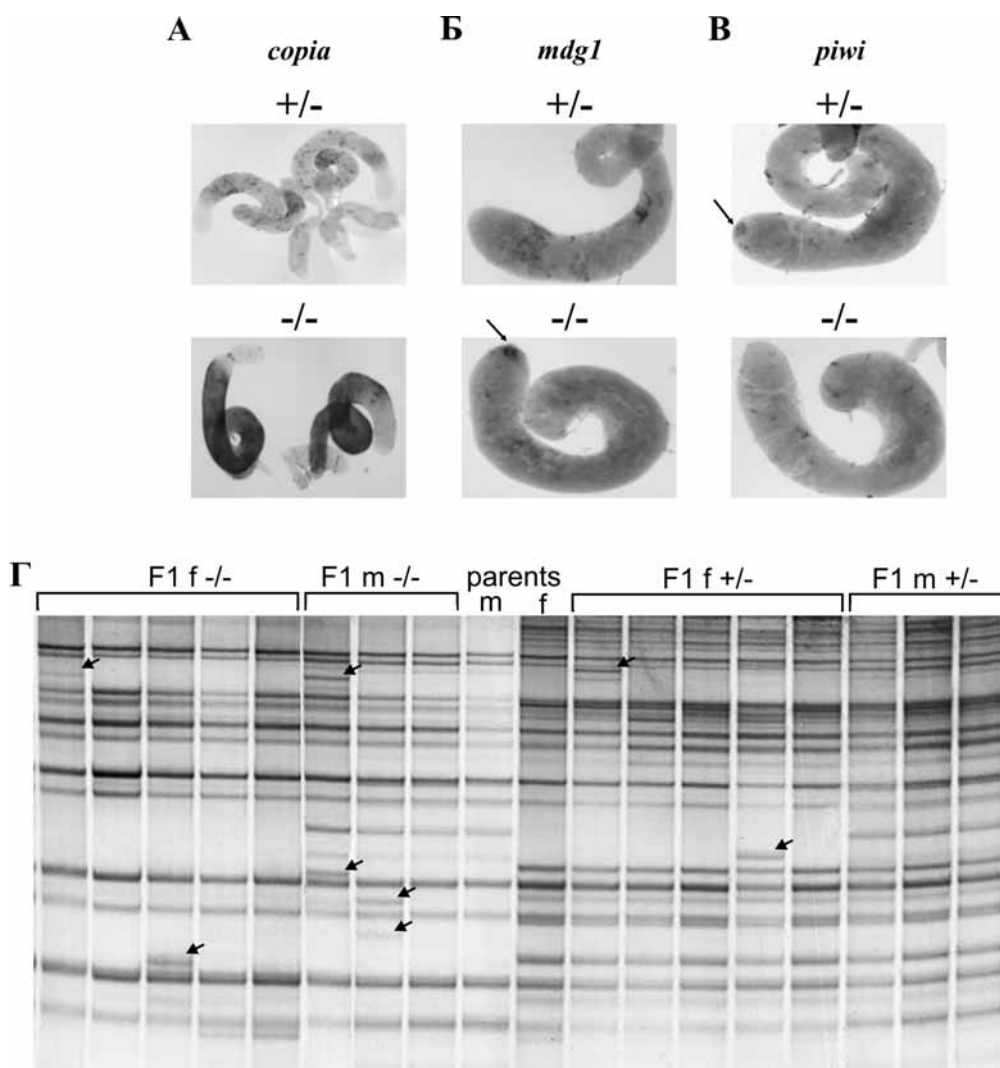


герминальных тканях мутантных мух. Показано, что нарушение piRNA сайленсинга, вызываемое мутацией гена *spn-E*, кодирующего РНК-хеликазу, приводило к депрессии всех исследуемых ретротранспозонов, как ДКП-содержащих (*mdg1*, *1731*, *GATE*), так и элементов типа LINE (*I*-элемент) в яичниках гомозиготных мух (рис. 4). Показано, что мутация *spn-E* приводит к накоплению транскриптов ретротранспозонов в цитоплазме питающих клеток, начиная с ранних стадий оогенеза. Для ретротранспозона *I* показано, что его транскрипты накапливаются не только в питающих клетках, но и в ооците (рис.4), причем такая картина локализации транскриптов наблюдается во всех исследованных мутантах piRNA пути, таких как *spn-E*, *aub*, *vasa*, *armitage*. Это позволяет сделать вывод о том, что piRNA путь осуществляет контроль экспрессии широкого спектра ретротранспозонов в яичниках дрозофилы. Большинство перечисленных выше компонентов piRNA пути локализуется в особой перинуклеарной структуре, nuage (от фр. «облако»), где, как считается, происходят основные этапы РНК сайленсинга.

#### **Белок Piwi контролирует частоту транспозиций ретротранспозона в герминальных тканях самцов**

Исследование распределения транскриптов тех же ретротранспозонов в семенниках мутантных мух выявило более сложную картину. Мутация гена *spn-E* приводит к накоплению транскриптов ретротранспозона *coria* в семенниках и не влияет на транскрипцию других ретротранспозонов. Была исследована мутация гена *piwi*, кодирующего белок семейства Аргонавт подсемейства Piwi. Этот белок в норме необходим для поддержания герминальных стволовых клеток (Cox, Chao and Lin 2000). Мутация *piwi*, приводящая к исчезновению продукта этого гена в стволовых клетках (рис.5B), вызывает повышение уровня транскрипции ретротранспозона *mdg1* только в области пролиферативного центра, где расположены герминальные стволовые клетки, как видно из результатов РНК *in situ* гибридизации с семенниками (Рис. 5Б). В то же время, транскрипты *coria* накапливаются на более поздних стадиях сперматогенеза (рис. 5А). Эти данные указывают на то, что наряду с универсальными механизмами супрессии ретротранспозонов в герминальных тканях, существуют индивидуальные особенности регуляции для различных мобильных элементов. Транскрипты ретроэлементов являются интермедиатами транспозиций, и их количество регулируется системой РНКи, однако, до сих пор прямых данных о влиянии РНКи на частоту транспозиций мобильных элементов у дрозофилы не было получено. Подобные исследования затруднены тем, что подавляющее большинство известных мутантов piRNA пути стерильны. Мы

исследовали роль *piwi* в контроле частоты транспозиций ретротранспозона *mdg1*. Т.к. самцы *piwi/piwi* частично фертильны, есть возможность получить потомство таких самцов и исследовать в нем распределение ретротранспозонов. Была получена геномная ДНК из отдельных особей F1 от скрещивания самцов *piwi<sup>3</sup>/+* и *piwi<sup>3</sup>/piwi<sup>3</sup>* с самками *piwi<sup>3</sup>/+*, а также геномная ДНК родителей. Для анализа количества копий



**Рис.5 Влияние мутации гена *piwi* на экспрессию ретротранспозонов в семенниках.** Представлены результаты РНК *in situ* гибридизации с семенниками самцов *piwi/+* (+/-) и *piwi/piwi* (-/-). **А** Транскрипты ретротранспозона *copia* накапливаются на всех стадиях сперматогенеза в семенниках мух, мутантных по гену *piwi*. **Б** Активация транскрипции ретротранспозона *mdg1* в герминальных стволовых клетках самцов на фоне мутации *piwi*. Транскрипты *mdg1* в герминальных стволовых клетках обозначены стрелкой. **В** Исчезновение транскриптов *piwi* в герминальном центре семенников *piwi/piwi* (транскрипты *piwi* в апикальной части семенника у самцов *piwi/+* обозначены стрелкой). **Г** Транспозиции *mdg1* в мутантах *piwi*. Геномная ДНК, выделенная из индивидуальных особей (самцов, m, самок, f, как гетерозиготных, +/-, так и гомозиготных, -/-) была обработана рестриктазой, лигирована и амплифицирована с помощью *mdg1*-специфичных праймеров. Представлен анализ геномной ДНК особей F1 от скрещивания самцов *piwi<sup>3</sup>/piwi<sup>3</sup>* и самок *piwi<sup>3</sup>/+* (parents, m, f). Дополнительные полосы в препаратах ДНК у потомков, отсутствующие в родительской ДНК (обозначены стрелками), указывают на транспозиции *mdg1*.

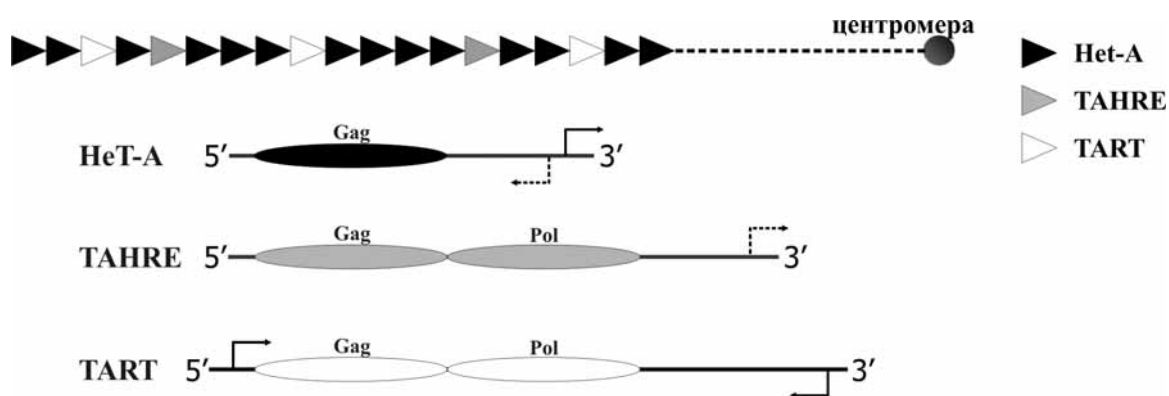
ретротранспозона *mdg1* в геномах родителей и потомков был применен метод обратной ПЦР, с последующим разделением радиоактивно меченых продуктов в ПААГ. С помощью этого метода можно выявить появление дополнительных полос, соответствующих новым копиям *mdg1*, в геноме у потомков по сравнению с родительской ДНК. Этим методом удалось выявить появление новых инсерций у потомков от гомозиготного самца (рис.5Г), в то время как у потомков гетерозиготного самца отличий от родительского паттерна распределения копий *mdg1* выявлено не было. Частота транспозиций *mdg1* в семенниках *piwi* мутантов оценивается как 0.19 транспозиций на поколение. Для сравнения, частота спонтанных транспозиций составляет  $10^{-4}$  на элемент на поколение. Таким образом, мутация компонента piRNA пути приводит к «транспозиционному взрыву», сопровождающемуся высокой частотой перемещений ретротранспозона. Интересно то, что все мутации, влияющие на биогенез piRNA и приводящие к дерепрессии мобильных элементов, сопровождаются нарушениями гаметогенеза, остановкой мейоза и стерильностью. Предполагается, что перемещения мобильных элементов вызывают разрывы ДНК и активацию ответа клетки на поврежденную ДНК, что приводит к остановке мейоза. Подтверждением этой гипотезы служат данные о том, что мутации генов, кодирующих такие компоненты репарационного пути как киназы ATR и Chk2, супрессируют нарушения оогенеза, вызванные мутациями генов piRNA пути (Chen, Pane and Schupbach 2007; Klattenhoff et al. 2007). Наши данные о мобилизации мобильных элементов в piRNA мутантах пока являются единственными фактами, которые указывают на целесообразность данного предположения.

### **Роль системы РНК-сайленсинга в регуляции активности теломерных ретроэлементов *Drosophila***

#### **Структура теломер *Drosophila***

Теломеры представляют собой нуклеопротеиновый комплекс на концах линейных хромосом. Основной функцией удлинения теломерной ДНК является компенсация деградации хромосом в результате концевой недорепликации (Оловников 1971). Концы линейной ДНК могут подвергаться процессам репарации, как в случае двухцепочечных разрывов, что может привести к слиянию теломер и нарушению целостности хромосом. Предотвращает этот нежелательный процесс образование так называемого кэпа (от англ.

сар, колпак), представляющего из себя белковый комплекс на конце хромосомы. Кроме того, теломеры, наряду с центромерами, играют важнейшую роль в митотическом и мейотическом поведении хромосом, а в интерфазном ядре определяют хромосомную территорию своей хромосомы в ядерном пространстве. Белки, связанные с теломерными и субтеломерными последовательностями, формируют особый теломерный хроматин, структура которого обеспечивает выполнение перечисленных выше функций теломер. У подавляющего большинства организмов фермент теломераза осуществляет удлинение теломеры за счет синтеза коротких последовательностей ДНК (6-11 нуклеотидов) на матрице РНК, кодируемой собственным клеточным геном (Greider and Blachburn 1985). Теломеры *Drosophila* образуются за счет ретротранспозиций специализированных теломерных ретротранспозонов (Pardue and DeBaryshe 2003).



**Рис.6 Схема теломер дрозофилы.** Показано тандемное расположение, по принципу голова к хвосту, ретротранспозонов *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*, образующих теломерную ДНК. *HeT-A* представлен в теломере *D. melanogaster* наибольшим числом копий. Представлены схемы строения ретротранспозонов *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*. Овалами обозначены открытые рамки считывания, черными короткими стрелками - промоторы элементов, известные из литературных данных, пунктирными стрелками – обнаруженные в данной работе.

В теломерах *Drosophila* обнаружено три семейства ретротранспозонов - *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*. Все они относятся к ретроэлементам, не содержащим ДКП. Особенностью теломерных элементов является специфичность их транспозиций на конец хромосомы, так, что разные элементы располагаются в случайном порядке, но всегда по принципу голова-к-хвосту, их поли(А) хвосты направлены к центромере (рис.6). Основным структурным компонентом теломер является элемент *HeT-A*, число копий которого в геномах линий *D. melanogaster* около 30; *TART* представлен меньшим

числом – около десяти – копий (George et al. 2006). Представителей третьего семейства, *TAHRE*, выявлено 4 копии в геноме линии *D. melanogaster*, использованной для секвенирования в рамках геномного проекта, только одна копия является полноразмерной (Abad et al. 2004b). До сих пор транспозиции ретроэлемента *TAHRE* детектированы не были. Элемент *HeT-A* является неавтономным, т.к. не содержит ОРС, кодирующего ревертазу, в то время как элементы *TART* и *TAHRE* кодируют ревертазу, необходимую для процесса транспозиции. Считается, что ревертазную активность *HeT-A* заимствует *in trans*, возможно, в транспозиции *HeT-A* участвует ревертаза *TART* или *TAHRE*. Особенностью транскрипции *HeT-A* является то, что его промотор находится в 3' области и осуществляет экспрессию следующего за ним элемента (Danilevskaya et al. 1997) (рис.6). *HeT-A* транскрибируется в герминальных тканях и активно делящихся клетках, например, в имагинальных дисках личинки, где происходит закладка будущих тканей взрослой особи (George and Pardue 2003; Walter and Biessmann 2004). Особенностью транскрипции *TART* является наличие двух промоторов, смыслового и антисмыслового, расположенных в 5' и 3' UTR, в области длинных прямых неконцевых повторов, характерных для этого элемента (Danilevskaya et al. 1999; Maxwell, Belote and Levis 2006). Функциональные особенности элемента *TAHRE* до сих пор не были исследованы.

Поддержание теломер дрозофилы с помощью мобильных элементов является, пожалуй, уникальным примером выполнения жизненно важной функции паразитическими элементами генома. Известно, что за одно поколение теломера дрозофилы укорачивается на 70-75 н. (Biessmann and Mason 1988), в то время как транспозиция полноразмерного ретротранспозона приводит к удлинению хромосомы на несколько т.п.н.. Очевидно, что для обеспечения нормальной длины теломер необходим строгий контроль частоты транспозиций. В клетке существуют защитные механизмы, снижающие активность мобильных элементов, важнейшим из которых является система РНКи. Как показано в данной работе, теломерные ретроэлементы, не смотря на их важнейшую функцию в геноме, также являются мишенью системы РНКи.

### **Экспрессия теломерных ретротранспозонов *HeT-A*, *TART* и *TAHRE* в герминальных тканях регулируется с помощью рiРНК**

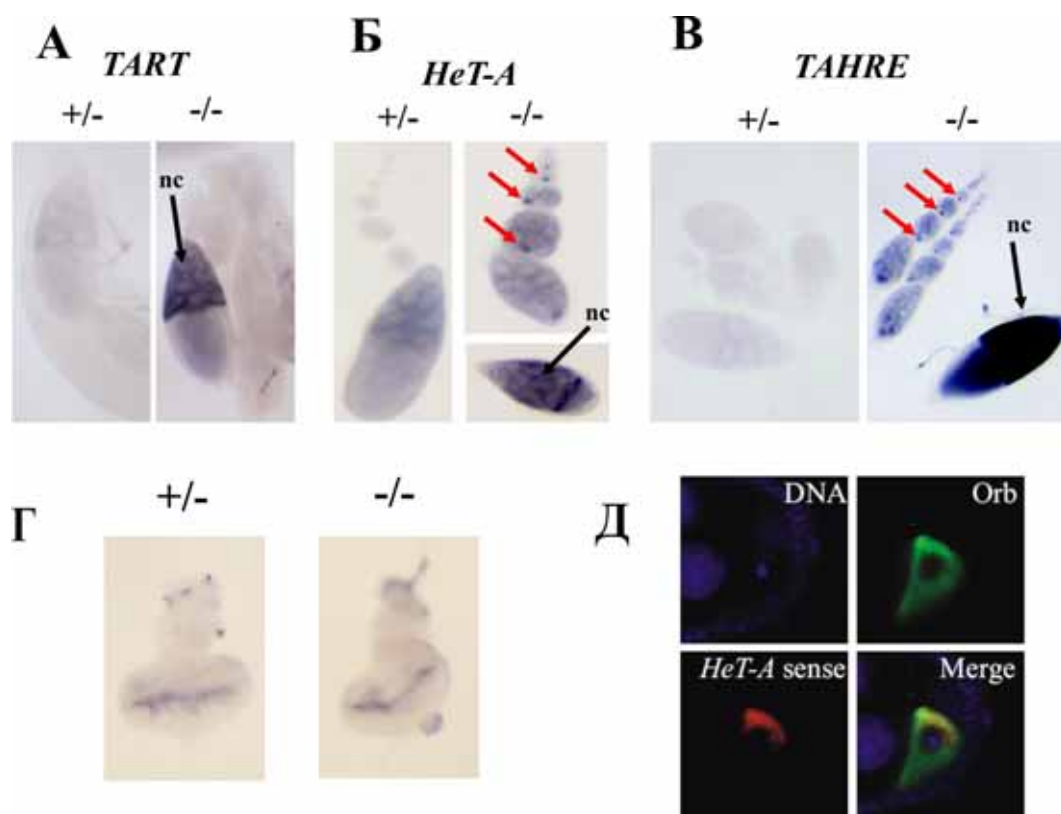
Экспрессия теломерных ретротранспозонов в яичниках мутантов рiРНК пути исследовалась с помощью RT-PCR и *in situ* РНК гибридизации. Методом РНК *in situ* гибридизации на яичниках дрозофилы с использованием одностебельных зондов показано,

что на фоне мутаций по локусу *vasa*, и генам *spn-E*, кодирующему РНК-хеликазу, *aub* и *piwi*, кодирующим белки подсемейства Piwi, происходит значительное увеличение количества смысловых транскриптов всех трех семейств теломерных ретротранспозонов, *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*. Интересно то, что паттерн распределения их транскриптов в яичниках мутантных мух резко различается (рис.7). Транскрипты ретроэлемента *TART* обнаруживаются на поздних стадиях оогенеза в цитоплазме питающих клеток. На фоне мутаций генов *spn-E*, *aub* и *vasa*, смысловые транскрипты *HeT-A* и *TAHRE* накапливаются в районе ооцита, начиная с ранних стадий оогенеза, а также в цитоплазме питающих клеток. РНК FISH (fluorescence *in situ* hybridization) анализ позволил локализовать транскрипты *HeT-A* в цитоплазме ооцита (рис. 7Д). Совпадение клеточной локализации транскриптов автономного элемента *TAHRE* и неавтономного элемента *HeT-A* позволяет сделать вывод о том, что *TAHRE* может служить источником обратной транскриптазы для перемещений ретротранспозона *HeT-A* – основного компонента теломерной ДНК у дрозофилы, что указывает на разделение функций между различными элементами теломер дрозофилы. Известно, что *HeT-A* активно экспрессируется в соматических тканях с активно делящимися клетками (в мозге и имагинальных дисках) (George and Pardue 2003; Walter and Biessmann 2004). Мы не выявили изменения в экспрессии *HeT-A* методом гибридизации РНК *in situ* в глазо-антеннальных имагинальных дисках мутантов гена *spn-E* (рис.7Г), что подчеркивает специфическую роль системы piRNA в регуляции экспрессии теломерных ретроэлементов в герминальной ткани.

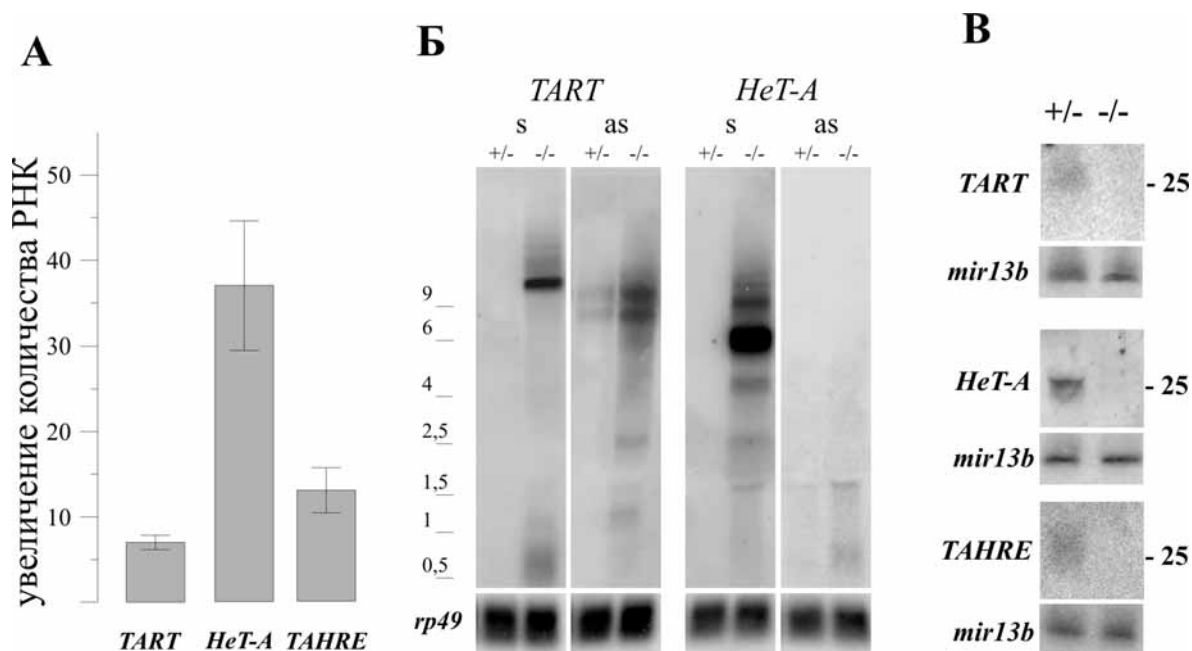
RT-PCR и Нозерн-блот анализы подтверждают накопление транскриптов теломерных ретроэлементов в яичниках у мутантов по piRNA пути (рис.8). В случае *HeT-A* наблюдается резкое накопление транскриптов в яичниках гомозиготных самок (в десятки раз выше, чем в норме). Количество транскриптов *TART* и *TAHRE* также значительно увеличивается (рис.8А). Нозерн-блот анализ показывает накопление транскриптов *HeT-A* и *TART*, соответствующих по размеру полноразмерным копиям, в яичниках гомозиготных мутантов *spn-E* (рис.8Б).

Короткие РНК, специфичные для *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*, были исследованы в яичниках мутантов piRNA пути с помощью Нозерн-анализа (рис.8В). Показано, что для всех трех элементов короткие РНК имеют размер 25-29 н., т.е. относятся к классу piRNA. Эти РНК детектируются только в яичниках гетерозигот и исчезают, или их количество убывает, в яичниках гомозигот по всем исследованным мутациям. Исчезновение коротких РНК коррелирует с дерепрессией ретротранспозонов, что является прямым указанием на роль piRNA в регуляции экспрессии теломерных ретротранспозонов.

Транскрипты ретротранспозонов являются интермедиатами транспозиций, поэтому возникает вопрос, меняется ли у таких мутантов частота транспозиций теломерных элементов на конец хромосомы? Иными словами, участвует ли система piRNA в контроле длины теломер у дрозофилы?



**Рис. 7** Накопление транскриптов теломерных ретротранспозонов в яичниках мутантов по гену *spn-E*. Представлены результаты РНК *in situ* гибридизации с использованием односторонних антисмысловых зондов с яичниками мух *spn-E*/+ (+/-) и *spn-E/spn-E* (-/-). **А** Смысловые транскрипты *TART* детектируются в цитоплазме питающих клеток (nc) на поздних стадиях оогенеза в гомозиготных самках. **Б** Транскрипты *HeT-A* детектируются в цитоплазме питающих клеток и в развивающемся ооците (отмечено красными стрелками) у самок *spn-E/spn-E*. **В** Транскрипты *TAHRE* имеют такой же паттерн распределения, как и транскрипты *HeT-A*. **Г** Детекция смысловых транскриптов ретротранспозона *HeT-A* в имагинальных дисках личинок у мутантов *spn-E*. Уровень экспрессии *HeT-A* в активно делящихся клетках одинаков у особей *spn-E*<sup>1</sup>/+ и *spn-E*<sup>1</sup>/ *spn-E*<sup>1</sup>. **Д** РНК FISH анализ яичников мух *spn-E/spn-E* с антисмысловым *HeT-A* зондом в сочетании с иммуноокрашиванием. Транскрипты *HeT-A* (красные) локализуются в цитоплазме ооцита, маркером которой служит белок Orb (зеленый). ДНК покрашена DAPI (синий).



**Рис. 8** *spn-E* участвует в подавлении экспрессии теломерных ретротранспозонов в яичниках дрозофилы.

**А** RT-PCR анализ количества транскриптов *HeT-A*, *TART* и *TAHRE* в яичниках мутантов по гену *spn-E*. Гистограммы являются результатом обработки данных пяти экспериментов. Высота столбцов отражает отношение количества транскриптов ретротранспозонов *HeT-A*, *TART* или *TAHRE* к количеству транскриптов конститутивного гена *rp49* в яичниках мух *spn-E/spn-E* (-/-), нормированное на такое же соотношение для мух *spn-E/+* (+/-). Наблюдается накопление транскриптов теломерных ретротранспозонов на фоне гомозиготного состояния мутации (*spn-E/spn-E*). **Б** Нозерн-анализ тотальной РНК, выделенной из яичников мутантов *spn-E*; гибридизация с одонитевыми зондами, специфичными к смысловым (s) или антисмысловым (as) транскриптам *HeT-A* и *TART*. Позиции РНК маркера обозначены в т.н.. В качестве контроля нагрузки использовали гибридизацию с транскриптами конститутивно экспрессирующегося гена *rp49*. Наблюдается накопление полноразмерных смысловых транскриптов *HeT-A* и *TART*, а также антисмысловых транскриптов *TART* в мутантах *spn-E/spn-E*. Антисмысловые транскрипты *HeT-A* не детектируются. **В** Нозерн-анализ коротких РНК, специфичных для теломерных ретроэлементов, в яичниках мутантов *spn-E*; гибридизация со смысловыми одонитевыми зондами. Гибридизация с олигонуклеотидом, комплементарным микроРНК *mir13b* сделана в качестве контроля нагрузки. Обозначена позиция РНК маркера размером 25 н. рРНК, специфичные для *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*, исчезают в яичниках *spn-E/spn-E*.

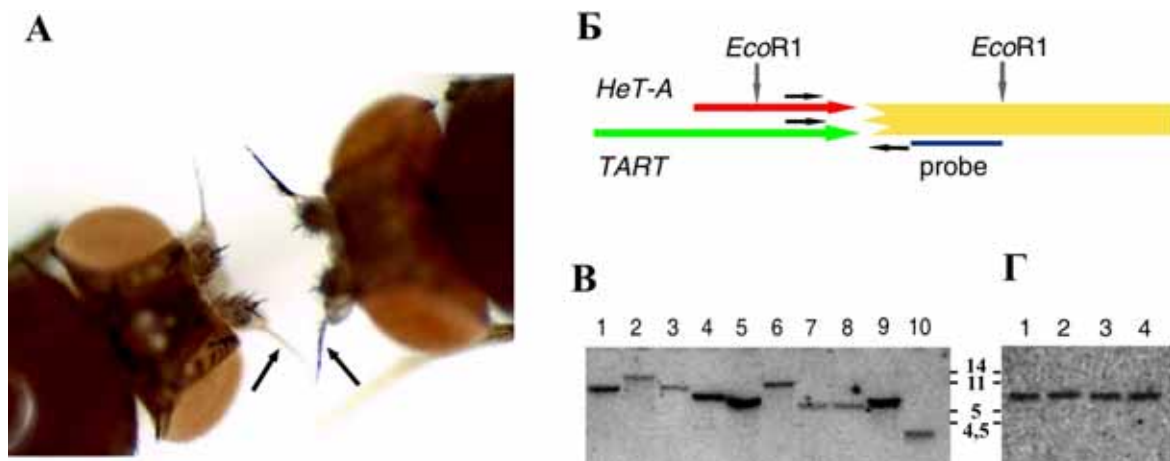


## Увеличение частоты транспозиций теломерных элементов на конец хромосомы на фоне мутаций по генам *spn-E* и *aub*

Частота присоединений теломерных ретроэлементов в рiРНК мутантах была исследована с применением генетической системы, разработанной в лаборатории П.Г. Георгиева, позволяющей фенотипически отслеживать транспозиции теломерных элементов к концу терминальноделетированной хромосомы (Savitsky et al. 2002). Эта система основана на том, что присоединения теломерных ретроэлементов к концу терминальноделетированной хромосомы в ооцитах самки могут быть детектированы фенотипически у потомства в результате активации гена, находящегося на конце хромосомы. Мы использовали терминальную делецию X хромосомы в районе локуса *yellow*, продукт которого в норме определяет темную окраску тела и щетинок мух. Мутации гена нарушают синтез пигмента, и особи с концевой хромосомной делецией приобретают желтую окраску, т.к. ген *yellow* у них не работает. Однако к оборванному концу хромосомы могут присоединяться теломерные ретротранспозоны, что приведет к активации того же гена и появлению темноокрашенных мух (рис.9А). Механизм такой активации до конца не ясен. Считается, что белковый комплекс, формирующийся на конце хромосомы, кэп, препятствует работе гена, а присоединение теломерного элемента открывает возможность функционированию регуляторных элементов гена. Т.к. терминальная делеция затрагивает несколько жизненно важных генов, то хромосома, несущая ее ( $y^{TD}$ ), летальна в гомозиготном состоянии. В качестве гомологичной X хромосомы используют хромосому с делецией генов *yellow* и *achaete* (хромосома *y ac*), которые не являются жизненно важными генами. Данная система позволяет следить за событиями, происходящими только на конце терминальноделетированной хромосомы.

Кроме того, отсутствие гена *yellow* в гомологичной хромосоме *a priori* позволяет отвергнуть возможность удлинения хромосомы  $y^{TD}$  за счет генной конверсии. Т.о. появление темноокрашенных мух в данной системе свидетельствуют о транспозиции на конец оборванной хромосомы теломерного элемента.

Для того, чтобы исследовать влияние генов рiРНК пути на частоту присоединений теломерных элементов к концу хромосомы, в линию, содержащую терминальноделетированную X хромосому  $y^{TD}$ , вводили хромосому, несущую мутации



**Рис. 9 Анализ присоединений теломерных ретротранспозонов к концу терминальноделетированной X хромосомы.**

**А** Изменение окраски арист (отмечено стрелками) с желтой (слева) на черную (справа) в результате присоединения *HeT-A* или *TART* к терминальноделетированной X-хромосоме и активации гена *yellow*. **Б** схематическое изображение присоединений *HeT-A* или *TART* к терминальноделетированной X-хромосоме в области гена *yellow*. Область гена *yellow* обозначена желтым прямоугольником. Присоединения *HeT-A* или *TART* обозначены соответственно красной и зеленой стрелками. Вертикальной стрелкой обозначен сайт рестриктазы *EcoR1*. Синей горизонтальной линией обозначен зонд к гену *yellow*, использовавшийся для Саузерн-блот анализа (Рис.9В, Г). Область присоединения ретротранспозонов к терминальноделетированной X-хромосоме была амплифицирована при помощи праймеров, схематически обозначенных маленькими горизонтальными стрелками. **В** Саузерн-блот анализ ДНК потомства индивидуальных особей  $y^{TD}/y^{ac}; spn-E^1/MKRS$  с желтыми аристами (без присоединений, дорожка 10), и с черными аристами (с присоединениями *TART* или *HeT-A*, дорожки 1-6 и 7-9, соответственно). ДНК была обработана рестриктазой *EcoR1*. Фильтр был гибридизован с зондом, отмеченным на схеме Б. Фрагмент размером около 4 т.п.н. дорожки 10 соответствует расстоянию от сайта рестриктазы *EcoR1* до конца терминальноделетированной X-хромосомы. Фрагменты размером от 5 до 15 т.п.н. дорожек 1-6 соответствуют различным по длине присоединениям ретротранспозона *TART*. Фрагменты размером около 5 т.п.н. дорожек 7-9 соответствуют присоединениям ретротранспозона *HeT-A*, имеющего консервативный сайт рестриктазы *EcoR1* в 3' области. **Г** Саузерн-блот анализ геномной ДНК, выделенной из линий, полученных от четырех самок с черными аристами (присоединение ретротранспозона *TART*), которые, в свою очередь, являлись потомством от индивидуальной особи  $y^{TD}/y^{ac}; aub^{QC42}/CyO$  с желтыми аристами. Идентичность гибридизовавшихся фрагментов подтверждает гипотезу присоединения *TART* на ранней премейотической стадии оогенеза. Размер ДНК-маркера отмечен в т.п.н.

генов *spn-E* и *aub*. Т.к. особи, гомозиготные по большинству мутаций генов рiРНК пути, стерильны, эта система позволяет исследовать генетически только дозовые эффекты у самок, гетерозиготных по мутации (самцы с хромосомой  $y^{TD}$  не выживают). Терминальная делеция находилась в регуляторной области гена *yellow*, в результате чего особи с терминальной делецией имели желтые аристы. Присоединение ретротранспозона к концу хромосомы приводило к изменению фенотипа и аристы особи и ее потомков становились черными (рис. 9А).

При исследовании мух, несущих хромосому  $y^{TD}$  и мутации по генам *spn-E* и *aub* в гетерозиготном состоянии было отмечено появление особей с черными аристами. Генетический анализ проводился в течение пяти поколений. Исследовался аллель гена *aub* - *aub<sup>QC42</sup>* и два различных аллеля гена *spn-E*: *spn-E<sup>l</sup>*, вызванный точечной заменой в хеликазном домене и *spn-E<sup>hls3987</sup>*, являющийся результатом инсерции Р-элемента. При анализе контрольной линии  $y^{TD}$ , не несущей мутаций РНКи генов, особей с измененным фенотипом выявлено не было. Однако ранее при использовании данной системы с терминальноделетированной X хромосомой была определена частота спонтанных присоединений, она равнялась 0,04% (Kahn et al. 2000). В таблице 1 приведены сводные данные. Видно, что оба мутантных аллеля гена *spn-E* привели к более чем 100-кратному повышению частоты появления мух с темными аристами, а мутация по гену *aub* к более низкому, но также значительному эффекту. Эти данные позволяют сделать вывод об участии рiРНК пути в регуляции частоты транспозиций теломерных ретротранспозонов на конец хромосомы, другими словами, в регуляции длины теломер у дрозофилы.

**Таблица 1**

Частоты присоединений к терминальноделетированной хромосоме на фоне мутаций *spn-E* и *aub*

РНК-и мутации	Число особей с измененным фенотипом/общее число особей в поколении					% Q (F2 – F5)*
	F1	F2	F3	F4	F5	
<i>spn-E<sup>l</sup>/MKRS</i>	1/569	3/146	41/1281	13/1162	37/998	2.1
<i>spn-E<sup>hls3987</sup>/MKR</i>	1/556	36/416	18/156	35/247	37/998	6.5
<i>S</i>						
<i>aub<sup>QC42</sup>/Cy</i>	0/651	3/306	10/787	17/2629	—	0.8
<i>O</i>						
Контроль* *	0/735	0/1005	0/595	0/744	0/824	0.0

\*Q – средняя частота события изменения фенотипа на общее число особей в поколении

\*\* объединенный результат для линий  $y^{TD}/y$  ac; *TM6/MKRS* и  $y^{TD}/y$  ac; *CyO/If*

### **Мутации генов *spn-E* и *aub* в гетерозиготном состоянии вызывают активные транспозиции на конец хромосомы ретротранспозона *TART***

Для того, чтобы определить природу присоединившегося элемента в мухах с измененным фенотипом, необходимо было проанализировать границу между геном *yellow* и присоединившимся ретротранспозоном. Геномная ДНК для анализа терминальных присоединений выделялась из потомства самок с темными аристами. Определение того, какой мобильный элемент присоединился к концу хромосомы, было

проведено с помощью ПЦР с использованием праймеров из 5' области гена *yellow* и 3' области ретротранспозонов *TART* или *HeT-A* (рис. 9Б). Место терминальной делеции в гене *yellow* было определено в предварительных опытах с использованием Саузерн-анализа и находилось в районе 1.5 т.п.н. перед стартом транскрипции гена *yellow* (рис.9В). Т.к. известно несколько семейств ретротранспозона *TART*, сильно различающихся в их 3' области, праймеры подбирались к трем основным семействам – А, В1 и С (номера последовательностей в базе данных GenBank U02279, U14101 и AY600955, соответственно). 3' последовательность *HeT-A* в значительной степени полиморфна между разными копиями, поэтому праймеры подбирались к наиболее консервативному участку. Кроме того, необходимо отметить, что эти праймеры были универсальны для элементов *HeT-A* и *TAHRE*. Полученные ПЦР продукты были отсекувенированы.

Результаты приведены в таблице 2. На фоне мутации *spn-E<sup>l</sup>* в подавляющем большинстве случаев происходило присоединение ретротранспозона *TART*, а на фоне мутаций *spn-E<sup>hls3987</sup>* и *aub<sup>QC42</sup>* были детектированы только присоединения *TART*, при этом были выявлены транспозиции представителей всех трех семейств – А, В1 и С.

**Таблица 2**

Идентификация теломерных ретротранспозонов, присоединившихся к концу терминальноделетированной хромосомы на фоне мутаций *spn-E* и *aub*

	РНК-и мутации		
	<i>spn-E<sup>l</sup></i>	<i>spn-E<sup>hls3987</sup></i>	<i>aub<sup>QC42</sup></i>
<i>TART</i>	29	38	16
<i>HeT-A</i>	6	-	-
Общее число *	35	38	16

\*общее число проанализированных отводков с черными аристами.

Это было неожиданно, т.к. в предшествующих работах, где исследовалось влияние К<sub>u</sub> белков и белка HP1 на регуляцию длины теломер дрозофилы в этой же генетической системе, в большинстве случаев к терминальноделетированной хромосоме присоединялся *HeT-A* (Savitsky et al. 2002; Melnikova, Biessmann and Georgiev 2005).

В результате секвенирования ПЦР продуктов было выявлено, что присоединения происходили к разным нуклеотидным позициям регуляторной области гена *yellow*. Это объясняется укорочением терминальноделетированной хромосомы в результате концевой недорепликации. Все присоединившиеся ретротранспозоны имели на 3' конце олиго(А) участки, короткие (3-11 нуклеотидов) в случае присоединения *HeT-A* и

длинные (20-28 нуклеотидов) в случае присоединения *TART*. Эти факты свидетельствуют о том, что присоединения произошли в результате процесса ретротранспозиции к концу хромосомы.

Генетический скрининг терминальных присоединений проводился у потомков мух, поддерживающихся как при массовом, так и при индивидуальных скрещиваниях. В потомстве отдельных самок, несущих хромосому  $y^{TD}$  и мутации генов *spn-E*<sup>hls3987</sup> или *aub*<sup>QC42</sup>, были выявлены несколько особей с измененным фенотипом. При анализе ПЦР продуктов, содержащих границу между присоединением и геном *yellow*, на фоне каждой из мутаций были выявлены несколько случаев абсолютно идентичных присоединений как по типу присоединившегося элемента (во всех случаях были обнаружены присоединения *TART*), так и по нуклеотидной позиции присоединения к гену *yellow*. Саузерн анализ подтвердил идентичность присоединений у мух, являющихся потомками одной самки (рис.9Г). Появление таких кластеров потомков одной мухи с идентичными присоединениями свидетельствует о том, что присоединения происходят на премейотических стадиях оогенеза, после чего герминальные клетки делятся и дают начало нескольким ооцитам с идентичными присоединениями теломерных элементов.

В результате проведенного Саузерн анализа геномной ДНК из потомства выборочных особей с различными типами присоединений было показано, что присоединения имеют различную длину, и присоединяются различные по своей структуре элементы (рис 9В). Различия в длине продуктов рестрикции ДНК для линий с присоединением ретротранспозона *TART* могут быть объяснены как присоединением различных копий мобильного элемента, некоторые из которых имеют полиморфный сайт рестриктазы *EcoR1*, использованной для Саузерн-анализа, так и присоединением неполноразмерных копий, имеющих оборванный 5' конец в результате низкой процессивности обратной транскриптазы.

Таким образом, было показано, что мутации по генам, кодирующим компоненты РНКи *spn-E* и *aub* в гетерозиготном состоянии, приводят к существенному повышению частоты присоединений теломерного ретротранспозона *TART* к концу хромосомы.

### **Активные транспозиции ретротранспозона *HeT-A* к концу хромосомы происходят на фоне мутации гена *spn-E* в гомозиготном состоянии**

Как было показано ранее, мутации генов, кодирующих компоненты РНКи, приводят к значительному накоплению транскриптов ретротранспозона *HeT-A* в области ооцита в яичниках мух, гомозиготны х по мутации . Ввиду того, что такие особи

стерильны, и анализировать результаты присоединений к концу терминальноделетированной хромосомы генетическими методами в них было невозможно, мы исследовали присоединения *HeT-A* к концу хромосомы в яичниках у мух *spn-E<sup>l</sup>/spn-E<sup>l</sup>* и *spn-E<sup>l</sup>/spn-E<sup>hls3987</sup>*, содержащих терминальноделетированную хромосому *y<sup>TD</sup>* с помощью ПЦР анализа. Для этого из зрелых ооцитов этих мух была выделена геномная ДНК, которая содержала ДНК из ооцита и окружающих его фолликулярных клеток, где, однако, эффекта РНКи на экспрессию *HeT-A* не наблюдалось (рис. 7Б). В качестве контроля, геномная ДНК была выделена из каркасов мух после удаления яичников. Был проведен вложенный ПЦР с использованием праймеров к гену *yellow* и *HeT-A/TART*. ПЦР продукты гетерогенного размера были выявлены только в ДНК из ооцитов мутантных мух при использовании праймеров к элементу *HeT-A*. Секвенирование этих фрагментов подтвердило присоединения *HeT-A* к концу хромосомы. Т.о., активная экспрессия *HeT-A* в яичниках гомозиготных по мутации гена *spn-E* мух действительно сопровождается активными транспозициями этого элемента к концу хромосомы. Причина того, почему *TART* является первичной мишенью РНКи в гетерозиготных мутантах, остается до конца неясной. Возможно, что в гетерозиготах по генам РНКи ревертаза, кодируемая элементом *TART*, связывается со своей же матрицей и осуществляет ее транспозицию в соответствии с так называемой моделью цис-предпочтения. В гомозиготе, где резко увеличивается количество транскриптов *HeT-A*, происходит конкуренция за связывание с ревертазой, и наблюдаются транспозиции *HeT-A*.

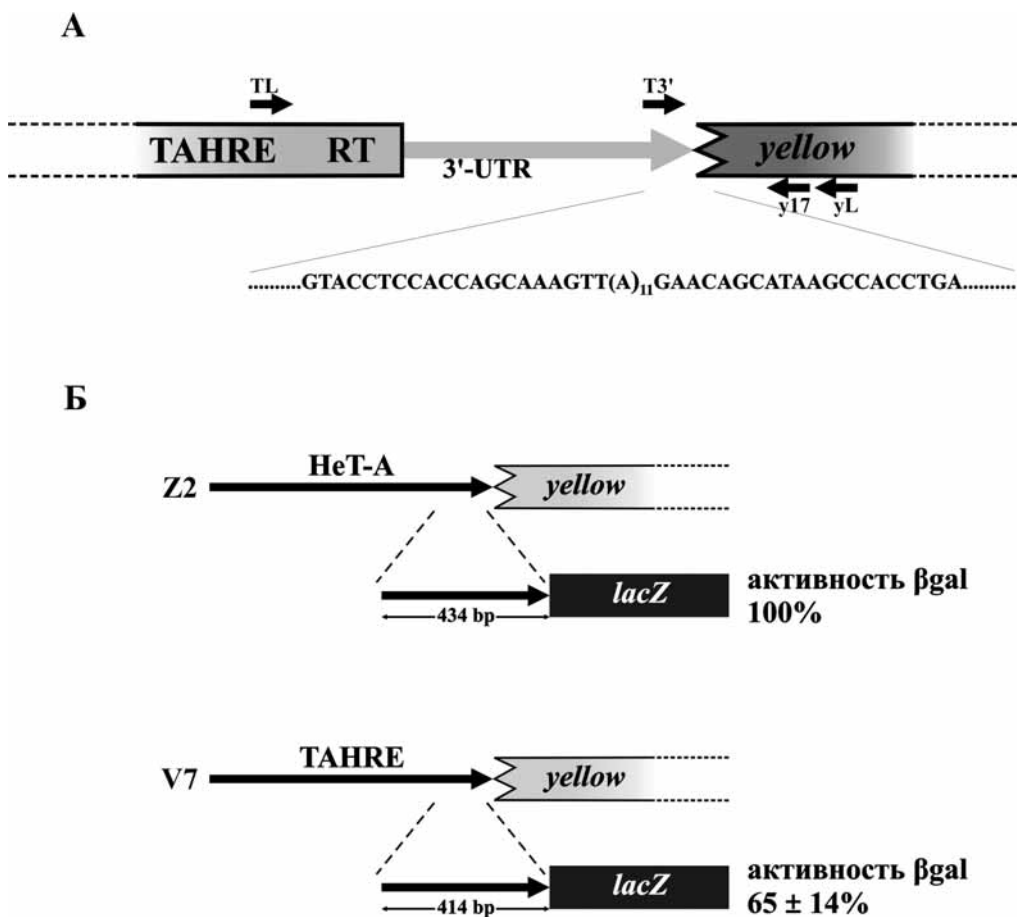
Итак, основным результатом этой части работы является демонстрация того, что система РНКи участвует в регуляции длины теломер у *Drosophila*, а именно, осуществляет негативный контроль экспрессии и частоты транспозиций на конец хромосомы специфических теломерных ретротранспозонов. Механизм этой регуляции остается пока что неизвестным. Он может осуществляться как на посттранскрипционном уровне и сводиться к регуляции количества транскриптов, так и на уровне изменения структуры теломерного хроматина, и, как следствие, приводить к увеличению уровня транскрипции ретроэлементов и/или изменению доступности конца хромосомы для присоединения ретроэлемента.

## Ретротранспозон *TAHRE* участвует в поддержании теломер *Drosophila*.

Как упоминалось выше, в теломерах *D. melanogaster* обнаружены три семейства ретротранспозонов – *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*. Спонтанные присоединения к теломере первых двух элементов были описаны неоднократно (Biessmann et al. 1992; Sheen and Levis 1994; Kahn et al. 2000; Golubovsky et al. 2001). Элемент *TAHRE* был обнаружен *in silico* при анализе геномного сиквенса *D. melanogaster* (Abad et al. 2004b). Этот элемент, так же как и *TART*, имеет две открытые рамки считывания, кодирующие белки Gag и Pol, однако, его 5' и 3' нетранслируемые области высоко гомологичны элементу *HeT-A*, что и послужило причиной к выбору названия этого элемента (telomere-associated and *HeT-A*-related element). Обнаружение нового теломерного элемента, *TAHRE*, заставило по-новому взглянуть на эволюцию теломерных ретротранспозонов *Drosophila*. Предполагается, что *TART* и *TAHRE* возникли в результате дивергенции общего предкового элемента, а *HeT-A* произошел от *TAHRE*, утратив ген ревертазы (Abad et al. 2004b).

Оставалось неясным, участвует ли *TAHRE* в поддержании теломер у *Drosophila*. В анализе присоединений к терминальноделетированной хромосоме мы использовали праймеры, универсальные для *HeT-A* и *TAHRE*, поэтому мы не можем сказать, происходили ли транспозиции *TAHRE* к концу хромосомы в данной системе. Для того, чтобы однозначно ответить на вопрос о возможности спонтанных транспозиций *TAHRE* на конец хромосомы, были проанализированы ранее полученные линии мух со спонтанными присоединениями к терминальноделетированной X хромосоме. Геномная ДНК, выделенная из таких мух с неидентифицированными присоединениями, была подвергнута ПЦР анализу с использованием праймеров из гена *yellow* и 3' области элемента *TAHRE* (рис.10А, праймеры у17 и ТЗ'). Однако, элементы *HeT-A* и *TAHRE* высоко гомологичны в 3' области, поэтому полученные положительные результаты нуждались в дополнительном подтверждении. Для этого на ДНК из пяти линий, полученных при первичном отборе, был поставлен ПЦР с использованием праймеров из гена *yellow* и специфического для *TAHRE* праймера из рамки, кодирующей ревертазу (рис.10А, праймеры TL и уL). В одной из пяти линий был получен ампликон размером около 6 т.п.н.. Амплифицированный фрагмент *TAHRE* размером 6 т.п.н. был клонирован, секвенирован, а полученная последовательность была выровнена с известными копиями элемента *TAHRE*. Секвенирование позволило однозначно отнести этот элемент к семейству ретротранспозонов *TAHRE*. Вновь перемещенная копия

обладает такими чертами, характерными для *TAHRE*, как наличие 3' нетранслируемой области, высоко гомологичной таковой *HeT-A*, примыкающей к рамке считывания, кодирующей ревертазу, которая отсутствует у *HeT-A*. Обнаруженный нами элемент гомологичен на 99.8% ранее секвенированной копии *TAHRE* (номер последовательности в GenBank - AJ542584) и также обладает делецией размером 327 п.н. в 3' области, что отличает его от других трех секвенированных копий *TAHRE*. Этот элемент содержит поли(A) последовательность на 3' конце, что свидетельствует о ретротранспозиции.



**Рис. 10** Характеристика теломерного ретротранспозона *TAHRE*

**А** *TAHRE* может присоединяться к концу хромосомы. Схема присоединения *TAHRE* к гену *yellow*, находящемуся на конце терминальноделетированной хромосомы. Праймеры, использованные в опыте, обозначены стрелками.

**Б** Промоторная активность 3' области *TAHRE*. Фрагменты *HeT-A* и *TAHRE* (около 400 п.н. от сайта полиаденилирования) были субклонированы из копий, присоединившихся к терминальноделетированной X хромосоме (соответствующие линии дрозофилы обозначены как z2 и v7). Конструкции для трансфекции культуры клеток были сделаны на основе вектора pCaSpeR-AUG-β-gal. Ферментативная активность конструкции, содержащей *TAHRE*, выражена как процент от таковой для *HeT-A*. Активность β-галактозидазы в клетках, трансфицированных вектором без вставки, не детектировалась.

Для того, чтобы более подробно охарактеризовать новый теломерный элемент *TAHRE*, была исследована его промоторная активность. Известно, что промотор *HeT-A*



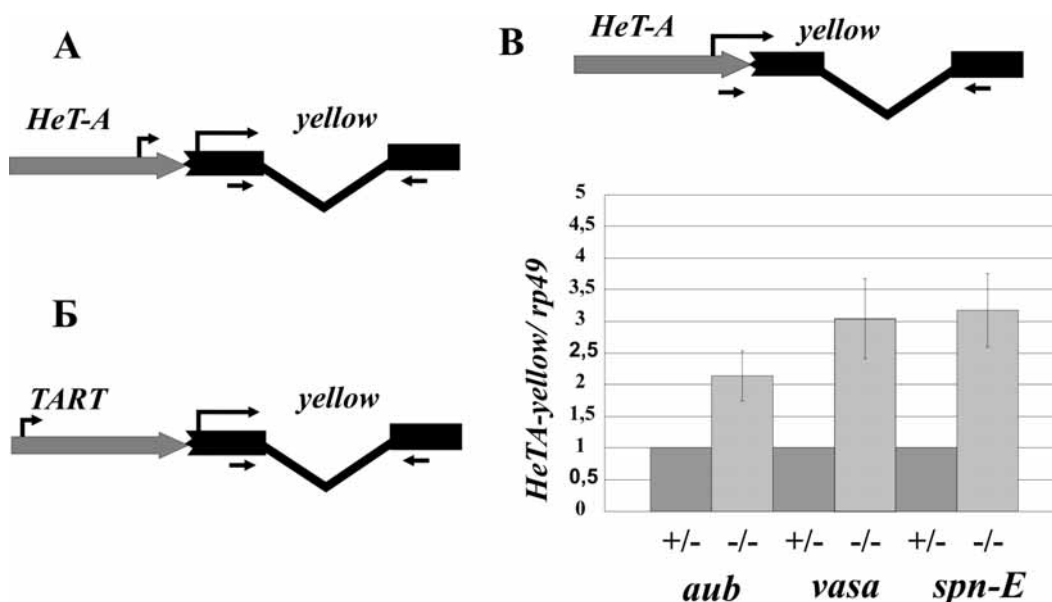
обладает необычным свойством, т.к. расположен в 3' UTR элемента и направляет транскрипцию следующей копии в теломерной цепи ретроэлементов (Danilevskaya et al. 1997). *HeT-A* и *TAHRE* высоко гомологичны в 3' области. Мы исследовали промоторную активность 3' области вновь присоединившегося *TAHRE* с использованием транзientной трансфекции культуры клеток дрозофилы репортерными конструкциями. Фрагменты размером около 400 п.н. от 3' конца элементов *HeT-A* и *TAHRE* были клонированы в вектор pCaSpeR-AUG- $\beta$ -gal. Промотор *HeT-A* был также субклонирован из копии *HeT-A*, присоединившейся к терминальноделетированной хромосоме (рис. 10Б). Последовательности анализируемых фрагментов *HeT-A* и *TAHRE* были гомологичны примерно на 80%. Ферментативная активность  $\beta$ -галактозидазы была измерена в экстрактах трансфецированных клеток дрозофилы Schneider 2. Активность репортерного гена под промотором *TAHRE* была высокой, 64+14% от активности, обеспечиваемой промотором *HeT-A*. Т.о., *TAHRE* как и *HeT-A* обладает промотором, расположенным в конце 3' UTR.

Т.о., недавно обнаруженный в теломерах дрозофилы элемент *TAHRE* способен перемещаться на конец хромосомы, а, следовательно, этот элемент является полноправным участником поддержания теломер у дрозофилы. Является ли наличие в теломерах *D. melanogaster* трех семейств ретротранспозонов избыточным, или разные элементы выполняют различные функции? Основным структурным компонентом теломер *Drosophila* является ретроэлемент *HeT-A*, лишенный собственной ревертазы, другими словами, неавтономный ретроэлемент. *TART* и *TAHRE*, несмотря на то, что присутствуют не на всех теломерах, являются консервативными теломерными элементами в разных видах *Drosophila* (Casacuberta and Pardue 2002; Casacuberta and Pardue 2003). Предполагалось, что ревертаза *TART* и/или *TAHRE* может осуществлять транспозиции *HeT-A* (Rashkova et al. 2002; Abad et al. 2004b). Данные о совпадении клеточной локализации транскриптов *TAHRE* и *HeT-A*, представленные в данной работе, указывают на то, что *TAHRE* может служить источником ревертазы для перемещений ретротранспозона *HeT-A*. Секвенирование теломерных областей у эволюционно отдаленных видов *Drosophila* выявило в них ретроэлементы, значительно отличающиеся от теломерных элементов *D. melanogaster*, однако, для теломер всех проанализированных видов *Drosophila* является характерным наличие в них сочетания автономных и неавтономных ретротранспозонов (Villasante et al. 2007), что указывает на эволюционно устойчивое сочетание таких элементов в теломере, и предполагает разделение функций между ними.

## Экспрессия репортерных генов, находящихся под промотором ретротранспозона *HeT-A*, находится под контролем рiРНК пути

Механизм РНКи-зависимого сайленсинга теломерных ретроэлементов, так же как и других ретротранспозонов, остается неизвестным. Биохимический путь, связанный с короткими РНК, может приводить как к посттранскрипционной деградации мРНК, так и к формированию неактивного хроматина в гомологичном локусе, т.е. к транскрипционному сайленсингу (Matzke and Birchler 2005). Для дрожжей и растений показано, что короткие РНК в составе белкового комплекса, основным компонентом которого является белок семейства Аргонавт, привлекают гистонметилтрансферазы к гомологичным последовательностям, формируя эпигенетическую метку, характерную для гетерохроматина (Heig et al. 2005; Onodera et al. 2005; Volpe et al. 2002). У млекопитающих короткие РНК вызывают метилирование промоторов ретротранспозонов (Aravin et al. 2008). Наиболее вероятно, что в сайленсинге ретротранспозонов дрозофилы принимают участие оба механизма, как транскрипционный, так и пост-транскрипционный, что достигается с помощью процесса компартментализации (Klattenhoff and Theurkauf 2008), а именно, ядерный белок Piwi участвует в образовании и функционировании первичных рiРНК в ядре, которые передаются в цитоплазму, где происходит их амплификация по механизму «пинг-понг» с образованием вторичных рiРНК, осуществляющих деградацию мишени в цитоплазме. Скорее всего, этот механизм работает в особой структуре герминальных клеток, nuage. Nuage представляет собой перинуклеарное пространство, содержащее РНП-гранулы, в которых могут концентрироваться рiРНК и их мишени.

В случае теломерных ретротранспозонов вопрос о механизме сайленсинга наиболее интересен, т.к. ответ на него позволит понять, вносит ли рiРНК-зависимый сайленсинг вклад в формирование теломерного хроматина. В качестве одного из подходов к исследованию механизма РНКи-зависимого сайленсинга теломерных ретротранспозонов были исследованы репортерные системы, в которых гены-репортеры экспрессировались под контролем промотора *HeT-A*. В качестве такой репортерной системы были использованы линии с присоединениями теломерных элементов к терминальноделетированной хромосоме, на конце которой находится ген *yellow*. В этих линиях исследовалась экспрессия гена *yellow*, находящегося в непосредственной близости от присоединившихся к концу хромосомы элементов *HeT-A* или *TART*, в

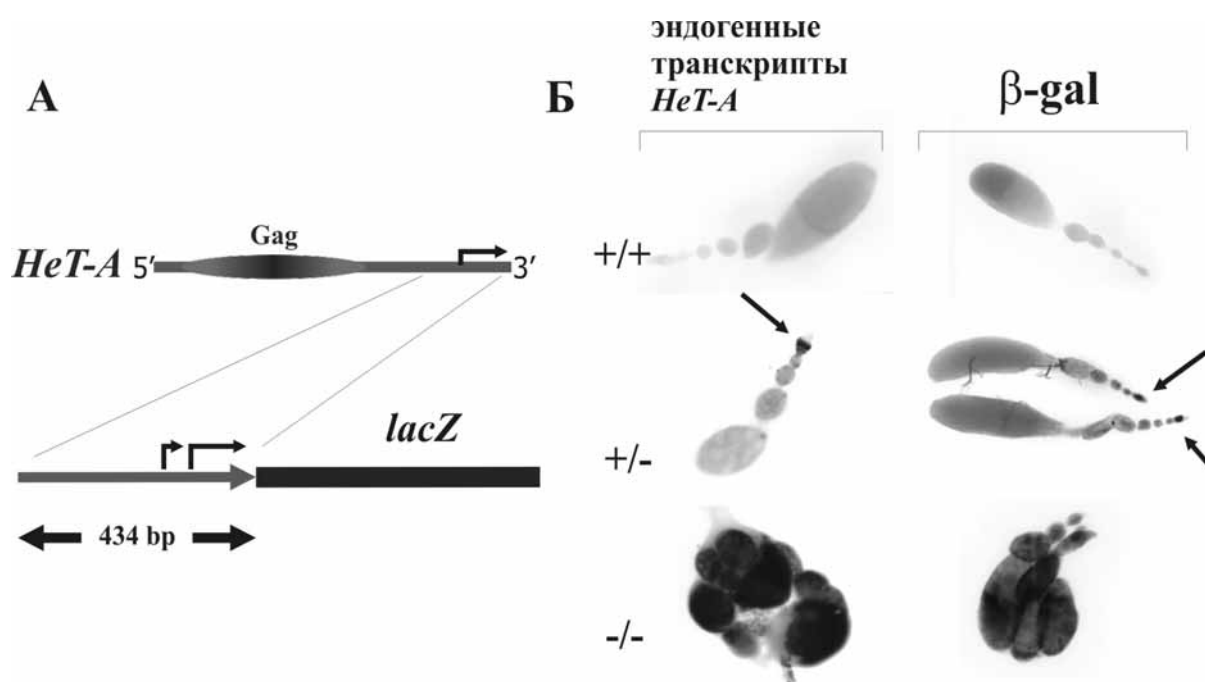


**Рис. 11** Экспрессия гена *yellow*, находящегося под промотором *HeT-A*, находится под контролем рiРНК пути

Схемы присоединения *HeT-A* (А) или *TART* (Б) к концу хромосомы, терминальноделетированной в области гена *yellow*, сохранившего свою промоторную область. В таких случаях изменения экспрессии гена *yellow* не происходит. В Схеме присоединения *HeT-A* к терминальноделетированной хромосоме после деградации регуляторной области *yellow*, в результате чего образуется слитный транскрипт *HeT-A-yellow*. RT-PCR анализ количества транскриптов *HeT-A-yellow* в яичниках мутантов по генам *spn-E*, *aub* и *vasa*. Гистограммы являются результатом обработки данных трех экспериментов. Высота столбцов отражает отношение количества транскриптов *HeT-A-yellow* к количеству транскриптов конститутивного гена *rp49* в яичниках гомозиготных по мутациям мух (-/-), нормированное на таковое соотношение для гетерозиготных мух (+/-). Старты транскрипции обозначены изогнутыми стрелками; короткими стрелками обозначены праймеры, используемые для RT-PCR; схематично показан интрон гена *yellow*.

мутантах по генам РНКи. Такую репортерную систему можно считать эндогенной, т.к. известно, что терминальноделетированные хромосомы, так же как и нормальные, подвергаются процессу «кэпирования», т.е. на их конце формируется белковый комплекс, характерный для теломер и содержащий белок HP1. В тех линиях, где произошли присоединения *HeT-A* (рис. 11А) или *TART* (рис. 11Б), но ген *yellow* экспрессируется с собственного промотора, изменений в количестве транскрипта *yellow* на фоне мутации РНКи гена *spn-E* не происходит. Это указывает на то, что если и формируется на последовательностях *TART* и *HeT-A* неактивный хроматин РНКи-зависимым способом, то распространения его на соседний промотор не происходит, даже в случае присоединений *HeT-A*, промотор которого расположен в 3' части элемента, и расстояние между промоторами *HeT-A* и *yellow* меньше 300 п.н.. В тех линиях, где присоединения *HeT-A* к гену *yellow* произошли уже после конечной деградации промотора *yellow*, ген *yellow* находится под контролем промотора *HeT-A*, находящегося

в его 3' области (рис. 11В). Экспрессия гена *yellow* в таких линиях меняется на фоне мутаций генов piRNA пути *spn-E*, *aub* и *vig* (рис. 11В). С помощью 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) анализа было показано, что транскрипция гена *yellow* начинается в 3' части *HeT-A*. Выявлено два старта транскрипции, -30 и -95 п.н. перед сайтом полиаденилирования *HeT-A*, при этом положение -30 является основным стартом. Т.о., часть ретротранспозона *HeT-A* (30-95 нуклеотидов) входящая в состав слитного транскрипта *HeT-A-yellow*, ответственна за то, что данный транскрипт становится мишенью РНКи. Ген *yellow* содержит интрон, что делает возможным исследовать количество как сплайсированных так и не сплайсированных транскриптов *HeT-A-yellow*. Представленность несплайсированного транскрипта косвенно отражает уровень транскрипции, т.к. сплайсинг происходит ко-транскрипционно.



**Рис. 12** Экспрессия трансгенной конструкции *HeT-A-lacZ* находится под контролем piRNA пути. **А** Схема трансгенной конструкции, полученной на основе вектора pCaSpeR-AUG- $\beta$ -gal и содержащей промоторную 3' область *HeT-A*. Стрелками обозначены старты транскрипции. **Б** Окрашивание яичников на активность  $\beta$ -галактозидазы с помощью X-gal (справа) в мухах дикого типа (+/+) и в *piwi* мутантах (гетеро- и гомозиготах, +/- и -/-, соответственно). Слева представлены результаты *in situ* РНК гибридизации с зондом *HeT-A* яичников *piwi* мутантов. Стрелки указывают на появление окраски в гермариуме самок *piwi*/+.

Если количество сплайсированного слитного транскрипта *HeT-A/yellow* увеличивается на фоне мутаций РНКи генов *spn-E*, *aub* и *vig*, то количество несплайсированного

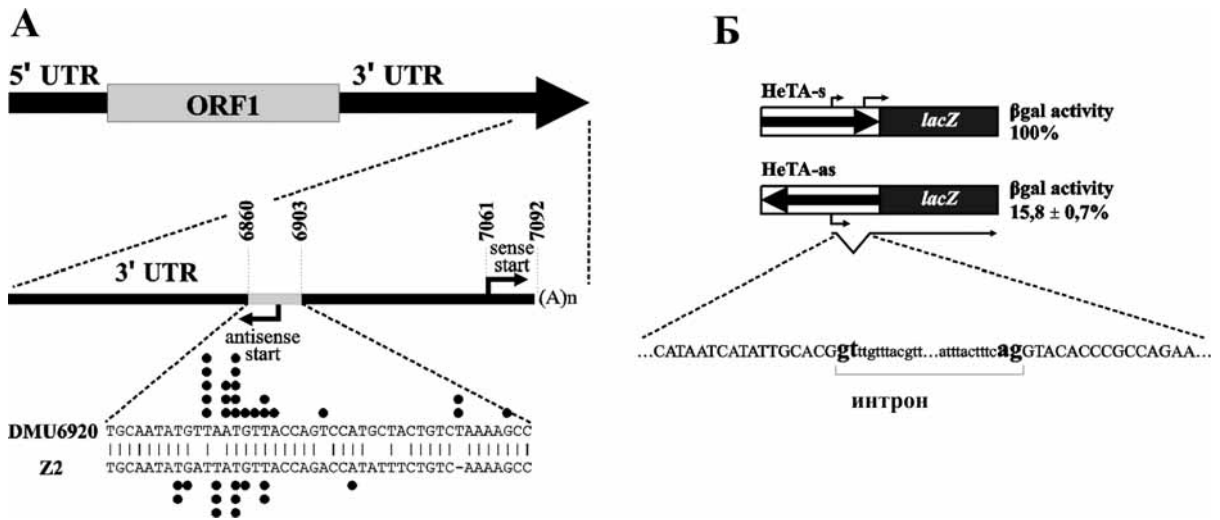
транскрипта не меняется. Эти данные предполагают посттранскрипционный механизм деградации слитного транскрипта *HeT-A/yellow*, хотя мы не можем полностью исключить то, что компоненты «кэпирующего» или транскрипционного комплекса, собирающегося на промоторе *HeT-A*, могут участвовать в транскрипционном механизме регуляции экспрессии *HeT-A-yellow*.

Интересным является вопрос о том, важна ли для системы РНКи локализация теломерного ретроэлемента в теломерной области, другими словами, насколько важно хроматиновое окружение. Для ответа на этот вопрос мы исследовали экспрессию репортерного гена *lacZ*, находящегося под промотором элемента *HeT-A* в составе трансгенной конструкции, расположенной в эухроматиновых сайтах, в мутантах по генам *piRNA* пути (рис. 12А). Для нескольких независимых линий, содержащих вставку трансгена на разных хромосомах, показано, что репортерный ген активируется в яичниках мутантов по генам *spn-E* и *piwi* (рис. 12Б). Интересно то, что промотор *HeT-A*, находясь вне теломерного окружения, демонстрирует паттерн экспрессии, схожий с таковым для эндогенных теломерных копий; например, одна доза мутантного гена *piwi* приводит к экспрессии *HeT-A* в гермариуме яичника, где также детектируется репортерный белок  $\beta$ -галактозидаза (рис. 12Б). Мы показали, что количество белка  $\beta$ -галактозидазы и РНК слитного транскрипта *HeT-A-lacZ*, меняется примерно в одинаковой степени в яичниках у мутантов *spn-E*. Т.о., эухроматиновое окружение трансгена не мешает считываемым с него транскриптам подвергаться *piRNA*-зависимому сайленсингу. С помощью метода 5' RACE показано, что основной старт транскрипции в трансгенных конструкциях находится в положении -30 пар нуклеотидов от конца фрагмента *HeT-A*. Таким образом, 30 п.н. последовательности *HeT-A* достаточно для того, чтобы транскрипт, считываемый с трансгенной конструкции, был мишенью *piRNA* пути. В данном случае мы опять же не исключаем, что компоненты транскрипционного комплекса, собирающегося на промоторе *HeT-A*, могут участвовать в *piRNA*-зависимом сайленсинге трансгена.

### **Картирование антисмыслового промотора *HeT-A***

Источником антисмысловых коротких РНК, с помощью которых осуществляется регуляция экспрессии смысловых транскриптов, служат антисмысловые транскрипты. Изучение транскриптомов разных организмов выявило необычайно высокий процент генов, транскрибирующихся двунаправленно. Предполагается, что активность этих генов находится под контролем системы РНКи. Однако метаболизм антисмысловых

транскриптов не изучен. Что касается мобильных элементов, происхождение их антисмысловых транскриптов во многих случаях неясно. Например, только для некоторых ретротранспозонов были выявлены внутренние антисмысловые промоторы. Это *F*-элемент (Minchiotti and Di Nocera 1991) и *micropia* (Lankenau et al.1994) у *Drosophila*, а также L1 у человека (Speek 2001). Теломерный ретротранспозон дрозофилы *TART* также обладает двунаправленной экспрессией (Danilevskaya et al. 1999;



**Рис.13 Картирование антисмыслового промотора *HeT-A* А**

**А** Определение старта антисмысловой транскрипции *HeT-A* с помощью 5' RACE. Схематически представлен ретротранспозон *HeT-A*; позиции старта смысловой, антисмысловой транскрипции и сайта полиаденилирования обозначены в соответствии с последовательностью клона DMU6920, представленном в GenBank. Верхняя строка сиквенса представляет собой фрагмент из этого клона, нижняя - фрагмент элемента *HeT-A* z2, клонированного в составе репортерной конструкции (рис. 13Б). Точками обозначены сайты инициации транскрипции, выявленные с помощью 5' RACE для эндогенных копий (верхняя строка) и для конструкции *HeTA-as* в экспериментах по трансфекции культуры клеток. **Б** Антисмысловая промоторная активность 3' области *HeT-A*, определенная в результате экспериментов по трансфекции культуры клеток дрозофилы Schneider2. Конструкции *HeTA-s* и *HeTA-as* содержат фрагмент 3' области *HeT-A* в прямой и обратной ориентации, соответственно, заклонированный в вектор pCaSpeR-AUG-β-gal. Ферментативная активность β-галактозидазы для *HeTA-as* выражена как % от таковой для *HeTA-s*. Старты транскрипции обозначены короткими стрелками. Транскрипт *HeTA/lacZ* обозначен длинной стрелкой с указанием позиции интрона. Сиквенс отражает экзон-интронную структуру *HeT-A* в составе конструкции, определенную в результате секвенирования продуктов 5' RACE (последовательность экзонов и интрона обозначена большими и малыми буквами, соответственно, консервативные последовательности на границах интрона обозначены жирным шрифтом).

Maxwell et al. 2006). Попытки выявить антисмысловые транскрипты ретроэлемента *HeT-A* до сих пор были безуспешными (Danilevskaya et al. 1999; Walter and Biessmann 2004), хотя антисмысловые короткие РНК *HeT-A* детектируются в библиотеках коротких РНК у *Drosophila* (Aravin et al. 2003; Brennecke et al. 2007). Нозерн-блот анализ был применен

для исследования смысловых и антисмысловых рiРНК *HeT-A* в яичниках у мутантов рiРНК пути. рiРНК обеих полярностей выявляются в яичниках гетерозигот *spn-E/+*, *piwi/+*, *aub/+*, в то время как и те и другие рiРНК отсутствуют в яичниках гомозигот *spn-E/spn-E* и *piwi/piwi* (рис. 14А). В яичниках *aub/aub* количество рiРНК снижено. В данном опыте использовался зонд, соответствующий 3' концу *HeT-A*, где расположен его прямой промотор (Danilevskaya et al. 1997). Т.к. этот зонд эффективно выявляет антисмысловые рiРНК *HeT-A*, было предположено, что экспрессия антисмысловых транскриптов *HeT-A* осуществляется с промотора, расположенного в 3' области элемента или в прилегающей последовательности. Например, фрагменты теломерных ретротранспозонов выявляются в прицентромерном гетерохроматине, где они могут транскрибироваться с прилегающих промоторов. Для определения старта антисмысловой транскрипции *HeT-A* в яичниках был применен метод 5' RACE с использованием праймеров, специфичных к 3' области *HeT-A*. РНК выделялась из яичников линии *D. melanogaster* *y<sup>1</sup>; cn<sup>1</sup> bw<sup>1</sup> sp<sup>1</sup>*, использованной для секвенирования генома, что облегчило анализ последовательностей 5'RACE продуктов. В результате секвенирования 25 5' RACE клонов было обнаружено, что антисмысловая транскрипция *HeT-A* инициируется в районе, расположенном на 190 п.н. раньше, чем старт смысловой транскрипции (рис.13А). Несмотря на наличие гетерогенности в сайтах инициации антисмысловой транскрипции, есть наиболее часто встречающиеся положения. Секвенирование полученных клонов показывает, что антисмысловые транскрипты образуются с различных полиморфных копий *HeT-A*. Выявлены также транскрипты, начинающиеся в укороченной копии *HeT-A* и продолжающиеся в следующую копию, причем последовательности таких клонов четко соответствуют теломерному району 4 хромосомы. Это говорит о том, что в образовании антисмысловых транскриптов принимают участие теломерные копии *HeT-A*. Антисмысловые транскрипты *HeT-A* содержат множественные интроны; для большинства интронов выявлено соответствие консервативным последовательностям сайтов сплайсинга. В различных копиях *HeT-A* используются альтернативные пути сплайсинга. Протяженных ОРС в этих транскриптах не выявлено. Ранее было показано, что антисмысловые транскрипты теломерного ретротранспозона *TART* также сплайсируются. Роль сплайсинга в некодирующих транскриптах ретроэлементов остается загадкой. Показано, что антисмысловые транскрипты *TART* полиаденилированы, т.к. они присутствуют в поли(А)-содержащей фракции РНК из яичников.

Промоторная активность 3'-области *HeT-A* была исследована в экспериментах по трансфекции культуры клеток. Для этого фрагмент *HeT-A* размером 434 п.н.,

расположенный перед сайтом полиаденилирования, был заклонирован в прямой и обратной ориентациях в вектор, содержащий репортерный ген *lacZ* (конструкции HeT-A<sub>s</sub> и HeT-A<sub>as</sub>). Активность антисмысловой конструкции составила около 15% от активности смысловой конструкции (рис. 13Б). Для определения старта транскрипции конструкции HeT-A<sub>as</sub> был проведен также 5' RACE анализ. Показано, что старт антисмысловой транскрипции *HeT-A* для этой конструкции совпал с таковым, определенным для эндогенных копий (рис. 13А). Более того, транскрипт, считываемый с конструкции HeT-A<sub>as</sub>, также как и эндогенные транскрипты, подвергался сплайсингу (рис. 13Б). Т.о., *HeT-A* обладает двунаправленным промотором, расположенном в его 3' области. Исследование такого двунаправленного промотора представляет собой отдельный интерес с точки зрения понимания механизмов регуляции транскрипции.

### **Анализ антисмысловой экспрессии теломерных ретротранспозонов**

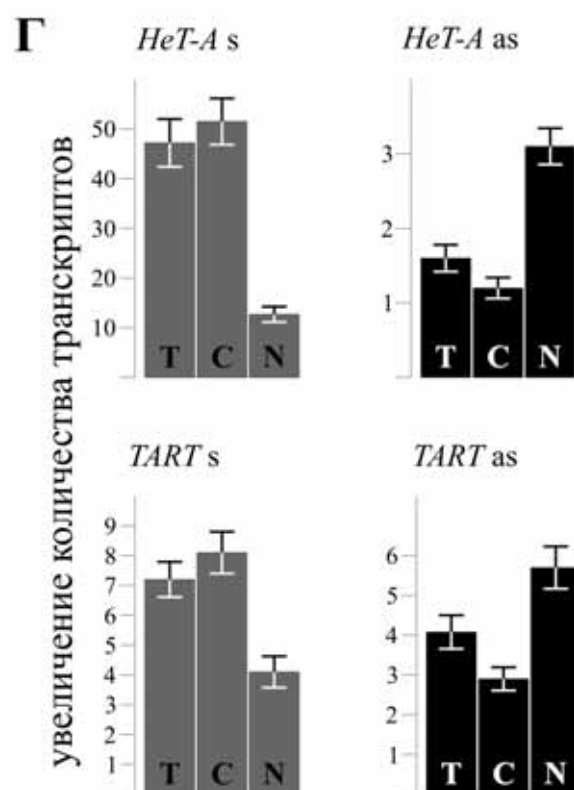
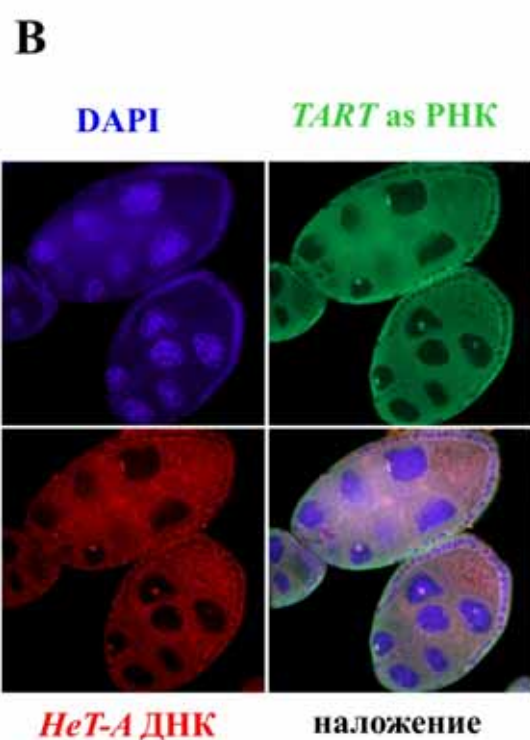
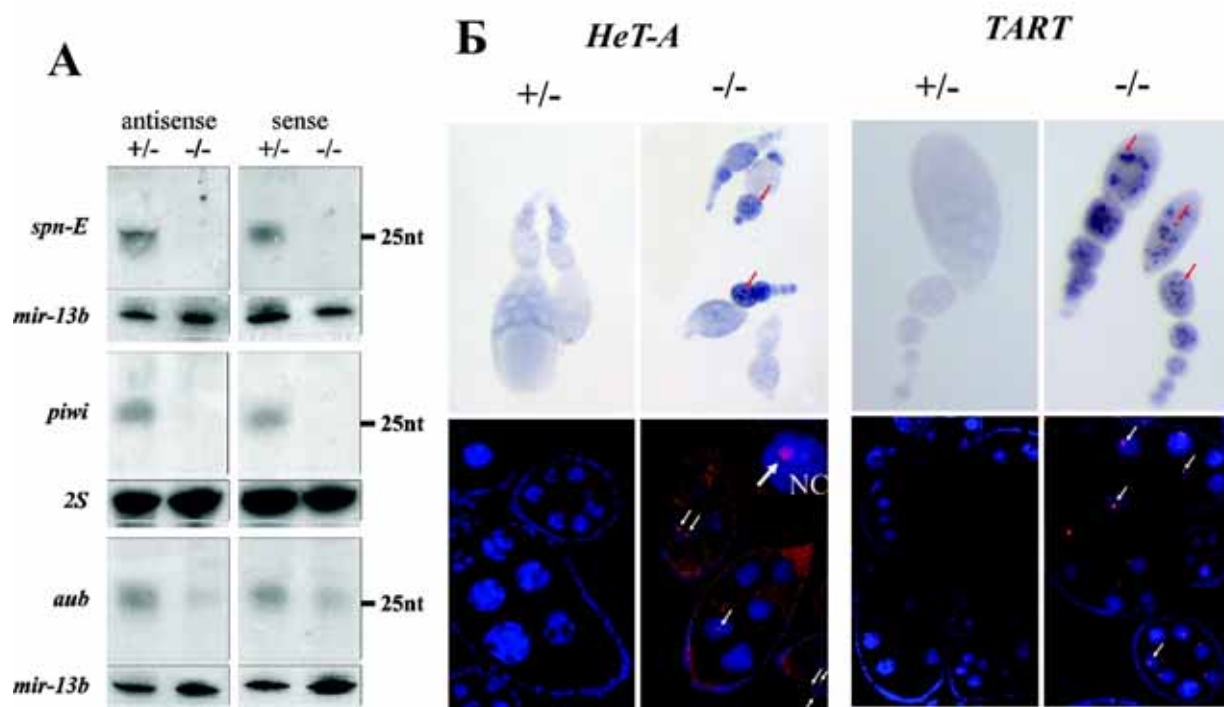
Исследования роли РНКи в сайленсинге ретротранспозонов в основном фокусируется на поведении смысловых кодирующих транскриптов, являющихся интермедиатами транспозиций в геноме. Однако смысловые короткие РНК также присутствуют в клетке (рис. 14А), что ставит вопрос о том, не являются ли длинные антисмысловые транскрипты ретротранспозонов также мишенью системы РНКи. Поведение антисмысловых транскриптов *HeT-A* и *TART* исследовалось с помощью метода РНК *in situ* гибридизации однонитевых зондов с яичниками мутантов piРНК пути. Антисмысловые транскрипты теломерных ретротранспозонов накапливаются в виде дискретных точек в ядрах питающих клеток мух *spn-E/spn-E* (рис.14Б). Показано также накопление антисмысловых транскриптов *TART* в ядрах питающих клеток у мутантов по гену *aub* и локусу *vasa*. Эти данные указывают на то, что piРНК путь участвует в регуляции экспрессии антисмысловых транскриптов ретроэлементов. Интересен тот факт, что смысловые транскрипты *HeT-A* и *TART* накапливаются не только в цитоплазме герминальных клеток, но и в ядрах. Аналогичные данные по накоплению антисмысловых транскриптов в ядрах питающих клеток мутантов по гену *spn-E* получены для нетеломерного ретротранспозона дрозофилы *I*-элемента. Накопление как смысловых, так и антисмысловых транскриптов ретротранспозонов в ядрах у мутантов по piРНК пути указывает на то, что этот путь работает не только в цитоплазме, но и в ядре. Методом RT-PCR анализа было проведено сравнение количества смысловых и антисмысловых транскриптов *HeT-A* и *TART* в цитоплазматической и ядерной фракциях яичников мутантов *spn-E* (рис.14Г).



Накопление антисмысловых транскриптов *HeT-A* и *TART* в ядерной фракции яичников мутантов *spn-E/spn-E* подтверждает данные, полученные с помощью РНК *in situ* гибридизации. Видна заметная разница в поведении смысловых и антисмысловых транскриптов. Смысловые транскрипты накапливаются в большей степени в цитоплазме, чем в ядре, в то время как накопление антисмысловых транскриптов происходит в основном в ядрах. Можно предположить, что некодирующие антисмысловые транскрипты способны выходить в цитоплазму, где они являются мишенью деградационной машины, распознающей абберрантные транскрипты, например, NMD (nonsense codon mediated decay).

Итак, показано, что эндогенные длинные антисмысловые транскрипты ретротранспозонов, так же как и смысловые, являются мишенями механизма сайленсинга с участием рiРНК. Длинные транскрипты необходимы для образования коротких РНК обеих полярностей, которые, в свою очередь, контролируют количество этих транскриптов. Такое сложное взаимодействие с участием рiРНК обеспечивает регуляцию экспрессии ретротранспозонов в герминальных тканях.

Нас заинтересовал характер накопления транскриптов *HeT-A* и *TART* в ядре в виде дискретных точек. Сочетание методов иммуноокрашивания, РНК FISH и ДНК FISH показывает, что накопление транскриптов теломерных ретроэлементов в ядре, как смысловых так и антисмысловых, происходит в районе геномного локуса, соответствующего теломере. На рис. 14В приведены результаты гибридизации с антисмысловой РНК *TART* в сочетании с окрашиванием теломеры с помощью зонда к *HeT-A*. Эти данные указывают на то, что регуляция экспрессии теломерных ретроэлементов в ядре с помощью коротких РНК происходит на транскрипционном или ко-транскрипционном уровне, однако, хроматиновые компоненты этого пути пока остаются неизвестными. По-видимому, если говорить о механизме рiРНК-зависимого сайленсинга ретротранспозонов, важны оба пути, как пост-транскрипционный, работающий в цитоплазме на уровне деградации мишени, так и транскрипционный, работающий на уровне изменения структуры хроматина.



#### Рис. 14 Антисмысловые транскрипты теломерных ретротранспозонов

**А** *HeT-A*-специфичные рiРНК, как смысловые (s), так и антисмысловые (as), выявляются с помощью Нозерн-анализа с односторонними зондами в яичниках гетерозигот (+/-) *spn-E/+*, *piwi/+* и *aub/+* и отсутствуют или убывают у гомозигот (-/-) *spn-E/spn-E*<sup>7</sup>, *piwi/piwi* и *aub/aub*. Гибридизация с олигонуклеотидами, комплементарными микроРНК *mir13b* или 2S РНК сделана в качестве контроля нагрузки. Обозначена позиция РНК маркера размером 25 н. **Б** Антисмысловые РНК *HeT-A* и *TART* накапливаются в ядрах питающих клеток (nc) у гомозиготных мутантов *spn-E* (-/-) (обозначено стрелками). *In situ* РНК гибридизация с использованием односторонних смысловых зондов и антители, конъюгированных со щелочной фосфатазой (верхняя панель) или родамином (нижняя панель). **В** Антисмысловые транскрипты *TART* (зеленый) колокализуются с ДНК зондом *HeT-A* (красный), детектирующим теломеру. ДНК окрашена DAPI. **Г** Сравнение количества смысловых (s) и антисмысловых (as) транскриптов *HeT-A* и *TART* в тотальной РНК (Т), цитоплазматической (С) и ядерной (N) фракциях яичников *spn-E/+* (+/-) и *spn-E/spn-E* (-/-) с помощью RT-PCR с использованием цепь-специфичных праймеров. Высота столбцов гистограммы отражает отношение количества транскриптов ретротранспозонов *HeT-A/TART* к количеству транскриптов конститутивного гена *rp49* в яичниках мух *spn-E/spn-E* (-/-), нормированное на такое соотношение для мух *spn-E/+* (+/-).

## **Выводы:**

1. Установлены эволюционные взаимоотношения семейства родственных генов, участвующих в сперматогенезе. Впервые показано эволюционное происхождение в геноме протяженных участков конститутивного гетерохроматина дрозофилы в результате амплификации функционального эухроматического гена. Обнаружен новый функциональный ген, кодирующий семенник-специфичную регуляторную субъединицу казеин-киназы 2 (*βCK2tes*). Являясь функциональной ретрокопией гена *βCK2*, этот ген, в свою очередь, является предком семейств тандемно-повторяющихся генов X и Y хромосом (*Ste* и *Su(Ste)*).

2. Показано существование в одном геноме нескольких структурно-функциональных вариантов ретротранспозона *1731*. Исследованы структурные варианты регуляторной и кодирующей областей ретротранспозона *1731*. Выявлено наличие двух типов копий, различающихся изменениями в области трансляционного сдвига рамки считывания, а также исследован полиморфизм регуляторной области длинного концевого повтора. Показано, что недавно возникшие копии этого элемента, обладающие широким спектром экспрессии, вытеснили более древний вариант.

3. Гены, кодирующие компоненты РНК интерференции, участвуют в контроле экспрессии и частоты перемещений ретротранспозонов в герминальных тканях. Показано, что компоненты РНКи подавляют экспрессию широкого спектра ретротранспозонов в герминальных клетках яичников. Белок Piwi участвует в регуляции экспрессии и частоты транспозиций ретротранспозонов в семенниках.

4. Экспрессия и частота перемещений теломерных ретротранспозонов в яичниках дрозофилы регулируется с помощью коротких РНК, т.о., система РНКи осуществляет негативную регуляцию длины теломер у дрозофилы.

5. Экспрессия репортерных генов, находящихся под контролем промотора теломерного ретротранспозона *HeT-A*, регулируется по механизму РНКи в герминальных тканях самок дрозофилы независимо от положения репортерных конструкций в геноме.

6. Ретротранспозон *TAHRE* способен перемещаться на конец хромосомы, и, следовательно, этот элемент является полноправным участником поддержания теломер у дрозофилы. Установлено, что промотор ретротранспозона *TAHRE*, так же как у *HeT-A*, находится в 3'-конце нетранслируемой области данного элемента.

7. Изучено происхождение и биогенез антисмысловых транскриптов теломерных ретротранспозонов, необходимых для образования коротких РНК. Картирован

антисмысловой промотор теломерного ретротранспозона *HeT-A*. Показано, что некодирующие антисмысловые транскрипты процессируются и полиаденилируются. Антисмысловые транскрипты теломерных ретроэлементов *HeT-A* и *TART* являются мишенями РНКи, так же как и смысловые транскрипты, и накапливаются в ядрах герминальных клеток у мутантов по генам РНКи в области теломеры, что указывает на транскрипционный механизм сайленсинга теломерных повторов.

### **Список публикаций:**

1. А.И.Калмыкова, А.А.Добрица, В.А.Гвоздев. Экспрессия гена Y-хромосомы *Drosophila melanogaster*, кодирующего изоформу регуляторной  $\beta$ -субъединицы казеинкиназы 2. *Молекулярная биология*, 31, 462-468, 1997.
2. А.И. Калмыкова, А.А. Добрица, В.А. Гвоздев Ген  $\beta$ СК2tes кодирует образование тканеспецифичной регуляторной  $\beta$ -субъединицы казеинкиназы 2 у *Drosophila melanogaster*, *Биохимия*, 62, 535-540, 1997.
3. A. I. Kalmykova, Y. Y. Shevelyov, A. A. Dobritsa, and V. A. Gvozdev. Acquisition and amplification of a testis expressed autosomal gene, SSL, by the *Drosophila* Y chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6297-6302, 1997.
4. A. I. Kalmykova, A. A. Dobritsa, V. A. Gvozdev. The Su(Ste) repeat in the Y-chromosome and betaCK2tes gene encode predicted isophorms of regulatory beta-subunit of protein kinase CK2 in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Let.*, 416, 164-166, 1997.
5. A. I. Kalmykova, A. A. Dobritsa, V. A. Gvozdev. Su(Ste) diverged tandem repeats in a Y-chromosome of *Drosophila melanogaster* are transcribed and variously processed. *Genetics*, 148, 243-249, 1998.
6. A. Kalmykova, C. Maisonhaute & V. Gvozdev. Retrotransposon 1731 in *Drosophila melanogaster* changes retrovirus-like expression strategy in host genome. *Genetica*, 107: 73-79, 1999.
7. A. I. Kalmykova, Y. Y. Shevelyov, O. O. Poleskaya, A. A. Dobritsa, A. G. Evstafieva, B. Boldyreff, O-G. Issinger, V. A. Gvozdev. 2002. CK2 $\beta$ tes gene encodes a testis-specific isoform of the regulatory subunit of casein kinase 2 in *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.*, 269, 1418-1427, 2002.
8. G.L. Kogan, A.V. Tulin, A.A. Aravin, Y.A. Abramov, A.I. Kalmykova, C. Maisonhaute, V.A. Gvozdev. The GATE retrotransposon in *Drosophila melanogaster*: mobility in heterochromatin and aspects of its expression in germline tissues. *Mol Genet Genomics* 269: 234-242, 2003.
9. V.V. Vagin, M.S. Klenov, A.I. Kalmykova, A.D. Stolyarenko, R.N. Kotelnikov, and V.A. Gvozdev. 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, 2004.
10. A.I. Kalmykova, D.A. Kwon, Ya.M. Rozovsky, N. Hueber, P. Capy, C. Maisonhaute, and V.A. Gvozdev. Selective expansion of the newly evolved genomic variants of retrotransposon 1731 in the *Drosophila* genomes. *Mol. Biol. Evol.* 21: 2281-2289, 2004.
11. A.I. Kalmykova, M.S. Klenov, and V.A. Gvozdev. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germ line. *Nucl. Acids Res.* 33: 2052-2059, 2005.

12. M. Savitsky, D. Kwon, P. Georgiev, A. Kalmykova, V. Gvozdev Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline. *Genes Dev.* 20: 345-354, 2006.
13. Р.Н. Котельников, С.Г. Шпиз, А.И. Калмыкова, В.А. Гвоздев. Белки, связывающие РНК, в процессах РНК-интерференции. *Молекулярная биология.* 40:595-608, 2006.
14. С.Г. Шпиз, А.И. Калмыкова. Структура теломерного хроматина у *Drosophila*. *Биохимия* 70: 759-773, 2007.
15. S. Shpiz , D. Kwon, A. Uneva, M. Kim, M. Klenov, Y. Rozovsky, P.. Georgiev , M. Savitsky , A. Kalmykova Characterization of *Drosophila* telomeric retroelement *TAHRE*: transcription, transpositions and RNAi-based regulation of expression.. *Mol. Biol. Evol.* 24:2535-45, 2007.
16. S. Shpiz , D. Kwon, Y. Rozovsky, A. Kalmykova rasiRNA pathway controls antisense expression of *Drosophila* telomeric retrotransposons in the nucleus *Nucl. Acids Res.* 37: 268-278, 2009.
17. S. Shpiz and A. Kalmykova Epigenetic transmission of piRNAs through the female germline *Genome Biology* 10: 208, 2009.