

На правах рукописи

Вагин Василий Владимирович

**Характеристика биогенеза rasiРНК в
герминальной ткани *DROSOPHILA MELANOGASTER***

(03.00.03 – молекулярная биология и 03.00.26 – молекулярная генетика)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА - 2007

Работа выполнена в отделе Молекулярной Генетики Клетки Института
Молекулярной Генетики РАН и отделе биомедицинской фармакологии UMASS
Medical School

Научные руководители:

доктор биологических наук, академик РАН Гвоздев В. А.

доктор биологических наук, профессор Zamore P. D.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Чуриков Н. А.

кандидат биологических наук Головнин А. К.

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии

Защита состоится « 30 » мая 2007 г. в 13 часов на заседании

Диссертационного совета Д002.037.01 при Институте биологии гена РАН по
адресу 119991, г.Москва, ул. Вавилова, 34/5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгарта РАН по адресу 119991 г.Москва, ул. Вавилова,
32

Автореферат разослан « 30 » апреля 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фарм. наук

Л. С. Грабовская

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы.

Последние 8 лет активно изучаются биологические функции и механизм явления РНК-интерференции. В 2006 году открытие РНК-интерференции как бесценного инструмента функциональной геномики, позволяющего специфически выключать активность выбранных генов, было удостоено Нобелевской премии. РНК-интерференция заключается в способности двуцепочечной РНК (дцРНК) специфически подавлять активность генов, нуклеотидная последовательность которых идентична последовательности дцРНК. РНК-интерференция – эволюционно консервативное явление, обнаруженное у многоклеточных и некоторых одноклеточных эукариот. Активное начало РНК-интерференции – короткие РНК дуплексы размером 21-28 нт., образуемые в результате процессинга дцРНК предшественника, осуществляемого РНКазой-III подобными белками семейства Dicer. Одна из цепей дуплекса коротких РНК внедряется в состав эффекторного комплекса, содержащего белки семейства Argonaute. Этот комплекс приобретает способность найти и осуществить трансляционную супрессию или деградацию мРНК-мишени, комплементарной коротким РНК, что приводит к подавлению экспрессии гена на посттранскрипционном уровне в цитоплазме. В ряде случаев короткие РНК могут подавлять транскрипцию генов, содержащих участок гомологичной нуклеотидной последовательности, за счет изменения структуры хроматина. Механизм подавления активности генов, опосредованный короткими РНК, подвергся детальному исследованию у ряда организмов, в том числе и у дрозофилы.

У *Drosophila melanogaster* было обнаружено три класса коротких РНК, участвующих в подавлении экспрессии генов: 21-23 нк. siРНК (small interfering RNA), miРНК (micro RNA) размером 21-23 нк. и rasiРНК (repeat-associated small interfering RNA) длиной 24-29 нк. Природная роль siРНК заключается в защите клетки от вызванной РНК-вирусами инфекции, в ходе которой часто образуются дцРНК вируса, являющаяся предшественником siРНК. miРНК

закодированы в геноме многоклеточных организмов в виде шпилечного предшественника (pre-miРНК), включающего 70 нк., и регулируют активность клеточных генов. Предшественником rasiРНК являются смысловые и антисмысловые транскрипты мобильных элементов и гетерохроматиновых повторов генома, которые потенциально могут образовывать дцРНК. Показано, что rasiРНК подавляют экспрессию идентичных им по нуклеотидной последовательности мобильных элементов, поддерживая тем самым стабильность генома.

Механизм образования и посттранскрипционного действия siРНК и miРНК хорошо изучен на молекулярном уровне у дрозофилы. Биогенез siРНК и miРНК контролируется паралогичными генами: *dicer-2*, *r2d2* (кодирует дцРНК связывающий белок) и *ago2*, кодирующий белок семейства Argonaute, нужны для продукции и функции siРНК, тогда как *dicer-1*, *loqs* (кодирует дцРНК связывающий белок) и *ago1*, кодирующий другой белок семейства Argonaute, участвуют в продукции и функции miРНК. siРНК как и miРНК в составе комплекса с белками Argonaute способны вызывать посттранскрипционное эндонуклеазное разрезание мРНК-мишени, если имеется участок нуклеотидной последовательности, полностью комплементарный коротким РНК. Неполная комплементарность коротких РНК и участка мРНК-мишени приводит к трансляционному подавлению экспрессии гена или к экзонуклеазной деградации.

rasiРНК впервые были открыты при анализе подавления повторов *Stellate* (*Ste*) в X-хромосоме их супрессорами, *Suppressor of Stellate* (*Su(Ste)*), локализованными в Y-хромосоме (Aravin et al., 2001). Было обнаружено, что присутствие rasiРНК *Su(Ste)*, коррелирует с подавлением генов *Stellate*. Предполагалось, что rasiРНК образуются из дцРНК (продукта двунаправленной транскрипции *Su(Ste)*) (Aravin et al., 2004). Были выявлены два гена, необходимые для подавления *Ste* и ряда мобильных элементов в герминальной ткани: *spindle-E*, кодирующий белок семейства DEAD-бок РНК хеликаз, и *aubergine*, кодирующий белок семейства Argonaute. Наличие дцРНК *Su(Ste)* и

участие белка семейства Argonaute в подавлении экспрессии повторяющихся элементов, опосредованном *gasi*РНК, указывало на то, что *gasi*РНК могут процессироваться и функционировать по типу *si*РНК. Однако в дальнейшем нами было показано, что биогенез *gasi*РНК сильно отличается от продукции и функционирования *si*РНК и *mi*РНК, что позволило выделить его как третий независимый путь образования и действия коротких РНК в герминальной ткани.

Задачи исследования.

Целями настоящей работы являлись: 1. Выявление генов, необходимых для продукции, стабильности и функционирования *gasi*РНК; 2. Сравнение закономерностей процессинга *gasi*РНК и *si*РНК *in vivo*; 3. Характеристика особенностей химической структуры *gasi*РНК; 4. Выявление белков, физически взаимодействующих с *gasi*РНК.

Научная новизна результатов исследования.

Показано, что подавление экспрессии повторов *Stellate* коррелирует с образованием *gasi*РНК. Обнаружено накопление только антисмысловой цепи *gasi*РНК, комплементарной повторам *Stellate* и мобильным элементам. Показано, что продукция *gasi*РНК не зависит от белков Dicer-1 или Dicer-2, необходимых для продукции и активности *si*РНК и *mi*РНК. Обнаружено, что мутации в генах *aubergine* и *spindle-E* приводят к дерепрессии теломерных мобильных элементов и *I*-элемента. Показано, что накопление *gasi*РНК *Su(Ste)* в семенниках и *gasi*РНК, соответствующим мобильным элементам, в яичниках определяется генами *spindle-E*, *armitage*, *aubergine*, *piwi*. Обнаружено блокирование одной из гидроксильных групп рибозы на 3'-конце *gasi*РНК. Впервые охарактеризован биогенез *gasi*РНК и показано его принципиальное отличие от хорошо изученных механизмов продукции *mi*РНК и *si*РНК.

Практическая ценность

Охарактеризованный в ходе работы биогенез *gas1*РНК напоминает образование недавно открытого класса коротких РНК, длиной 26-30 нк. (*piwi* interacting РНК, *pi*РНК), необходимого, по всей видимости, для сперматогенеза млекопитающих, включая человека. Полученные данные позволяют использовать дрозофилу как модельный объект для изучения механизма продукции и действия *pi*РНК, а также его нарушений при сперматогенезе млекопитающих.

Апробация работы

Работа апробирована на лабораторных семинарах отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК) ИМГ РАН и отдела биохимии и молекулярной фармакологии UMASS Medical School. Данные, представленные в работе, докладывались на конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» в Пушкино (Россия, 14-17 апреля, 2003), Keystone meeting (США, 2005, 2007) 47 конференции по дрозофиле (США, 2006), Regulatory RNA (США, 2006), RNA meeting (США, 2006), а также UMASS Medical School, MIT, New York University, EMBL Heidelberg, FMI Basel.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ. Из них научных статей 7 и тезисов научных конференций 3.

Объем диссертации

Материал диссертации изложен на ___ страницах машинописного текста, содержит ___ рисунков. Список цитированной литературы состоит из ___ работ. Диссертация включает в себя следующие разделы: «Общая характеристика работы», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Литература», «Благодарности».

Материалы и методы

Линии *Drosophila melanogaster*

Линия с делецией большей части повторов *Su(Ste)* на Y хромосоме *cry¹Y* описана в работе Palumbo с соавторами, 1994. Линии, несущие мутации в генах

dicer-1: *eyFLP; FRT82 dcr-1^{Q1147xx}/TM3 Sb* (предоставлена R. Carthew)

loqs: *w¹¹¹⁸; loqs⁰⁰⁷⁹¹/CyO* (предоставлена из коллекции Bloomington)

dicer-2: *y w eyFLP; FRT42D dcr-2^{L811fsX}/CyO* (предоставлена R. Carthew)

r2d2: *y w; r2d2/CyO* (предоставлена Liu Q.)

ago2: *y w; ago2⁴¹⁴/TM6B Tb* и *w; ago2^{51B}/TM6B Tb* (предоставлены Siomi H. и Gao F.-B., соответственно)

piwi: *w; piwi²/CyO* (предоставлена Birchler J.)

aubergine: *aub^{HN2} cn bw/CyO* и *aub^{QC42} cn bw/CyO* (предоставлены P. MacDonald)

spindle-E: *w; spnE^{100.37}/TM3, Sb* (предоставлена R. Lehmann)

armitage: *w; armi^{72.1}/TM3 Sb P[hs-hid]* (предоставлена H. Cook)

Были использованы линии *P[nos-Gal4-VP16]/TM3 Sb* и *P[UAS-GFP-*aub*]/TM3 Sb* для эктопической экспрессии GFP-Aubergine в яичниках. Для эктопической экспрессии рекомбинантного Мус-Piwi в яичниках мы использовали линию *P[hs-мус-piwi]/CyO*. Для продукции яичников, несущих мутацию в гене *dicer-1*, в гомозиготном состоянии, была использована линия *hsFlp; P[neoFRT]82B P[ovoD1-18] 3R/TM3 Sb*. Для исследования механизма процессинга дцРНК к гену *white* siРНК использовали линии *FRT42D dcr-2^{L811fsX}/CyO; P[w-IR]/P[w-IR]* и *P[w-IR]/TM6B Tb*.

Продукция герминальных клонов, гомозиготных по мутации в гене *dicer-1*, с помощью митотической рекомбинации

Получение герминальных «клонов» яичников, гомозиготных по мутации в гене *dicer-1*, проводили согласно работе Chou и Perrimon, 1996.

Молекулярно-биологические методы

Выделение тотальной РНК, Northern-гибридизация, количественный RT-PCR, Western-блот, иммунопреципитация, микрочип и анализ химической структуры коротких РНК проводились согласно стандартным молекулярно-биологическим методикам.

Результаты и обсуждение

Ранее в ОМГК ИМГ РАН было показано, что повторы *Su(Ste)*, супрессора гомологичных повторов *Stellate*, транскрибируется в обоих направлениях, причем антисмысловая транскрипция начинается в теле мобильного элемента *hopfel*, находящегося в конце каждого повтора (рис. 1д). Были выявлены два гена, мутации в которых нарушают подавление экспрессии *Stellate* в семенниках: *spindle-E*, кодирующий белок семейства DEAD-бок РНК хеликаз, и *aubergine*, кодирующий белок семейства Argonaute. Мы показали, что мутации в генах *aubergine* и *spindle-E* приводят к дерепрессии теломерных ретроэлементов и I-элемента в яичниках. Было обнаружено, что мутации в генах *aubergine* и *spindle-E* приводят к исчезновению *gasiРНК Su(Ste)*, но не влияют на накопление *miРНК* в семенниках, что указывало на различия между *miРНК* и *gasiРНК* биогенезом. Данные, полученные в этой части работы (Vagin et al., 2004; Aravin et al., 2004), не приводятся полностью, поскольку они частично перекрываются с полученными позднее в ходе командировки в США, где было проведено детальное сравнение *gasiРНК* биогенеза с механизмами образования и функционирования *miРНК* и *siРНК*.

Сравнение закономерностей процессинга *gasiРНК* и *siРНК in vivo*

Наличие двунаправленной транскрипции *Su(Ste)* подразумевало образование длинной дцРНК, которая может процессироваться с образованием *gasiРНК* по типу *siРНК* белком Dicer-2. Однако, размеры *gasiРНК Su(Ste)* (24-27 нк.) превышали размеры канонических коротких РНК, что указывало на возможные особенности в процессинге *gasiРНК* (Aravin et al. 2004). Возможность участия Dicer-2 в процессинге *gasiРНК* следовало проверить.

Чтобы выявить участие Dicer-2 в процессинге дцРНК *Su(Ste)*, сравнивали характер процессинга *in vivo* канонических *siРНК* из длинной шпилечной дцРНК с процессингом *gasiРНК Su(Ste)*. Была использована известная трансгенная конструкция для подавления экспрессии гена *white*, с помощью длинной дцРНК, образующейся, в ходе экспрессии трансгена, содержащего инвертированный повтор третьего экзона *white* (линия получена от R. Carthew).

Dicer-2 процессирует дцРНК шпильку с образованием *white* siРНК, которые вызывают деградацию *white* мРНК, что приводит к белой окраске глаза. На фоне мутаций по одному из генов, необходимого для продукции и функции siРНК (*dicer-2*, *r2d2*, *ago2*) глаза, как известно, сохраняют красную окраску (рис. 1а). С помощью «микрочипа», содержащего 22 нк. пробы ко всем потенциально возможным siРНК, соответствующим смысловой и антисмысловой цепи дцРНК *white* (рис. 1б), было выявлено образование обеих цепей siРНК (рис. 1в). Мутация в гене *dicer-2* приводила к исчезновению сигналов гибридизации. Математический анализ распределения интенсивности сигналов позволил выявить пики гибридизации, отражающие процессинг дцРНК с одного конца с «шагом» в 22 нуклеотида (рис. 1г), что было известно из результатов исследований процессинга с помощью Dicer-2 *in vitro*.

Для выявления все возможных rasiРНК *Su(Ste)* использовали микрочипы, содержащие последовательности одной из копий повторов *Su(Ste)*. Обнаружили накопление только антисмысловых, но не смысловых *Su(Ste)* rasiРНК в семенниках (рис. 1д). rasiРНК накапливались неслучайным образом, для некоторых участков последовательности *Su(Ste)* обнаруживали пики гибридизации, однако не было выявлено накопления антисмысловых rasiРНК с «шагом» 22 или 24-29 нк. (рис. 1е). С помощью программы M-Fold не было обнаружено шпилечных структур, которые мог образовывать антисмысловый транскрипт *Su(Ste)*. Характеристика с помощью «микрочипа» rasiРНК, происходящих из транскриптов экспрессирующегося в яичниках LTR-содержащего ретротранспозона *roo*, дала сходные результаты (рис. 1ж, з). Следовательно, преимущественное накопление антисмысловых rasiРНК при отсутствии 22 нк. «шага», образуемого Dicer, характерно для биогенеза rasiРНК как в семенниках, так и в яичниках.

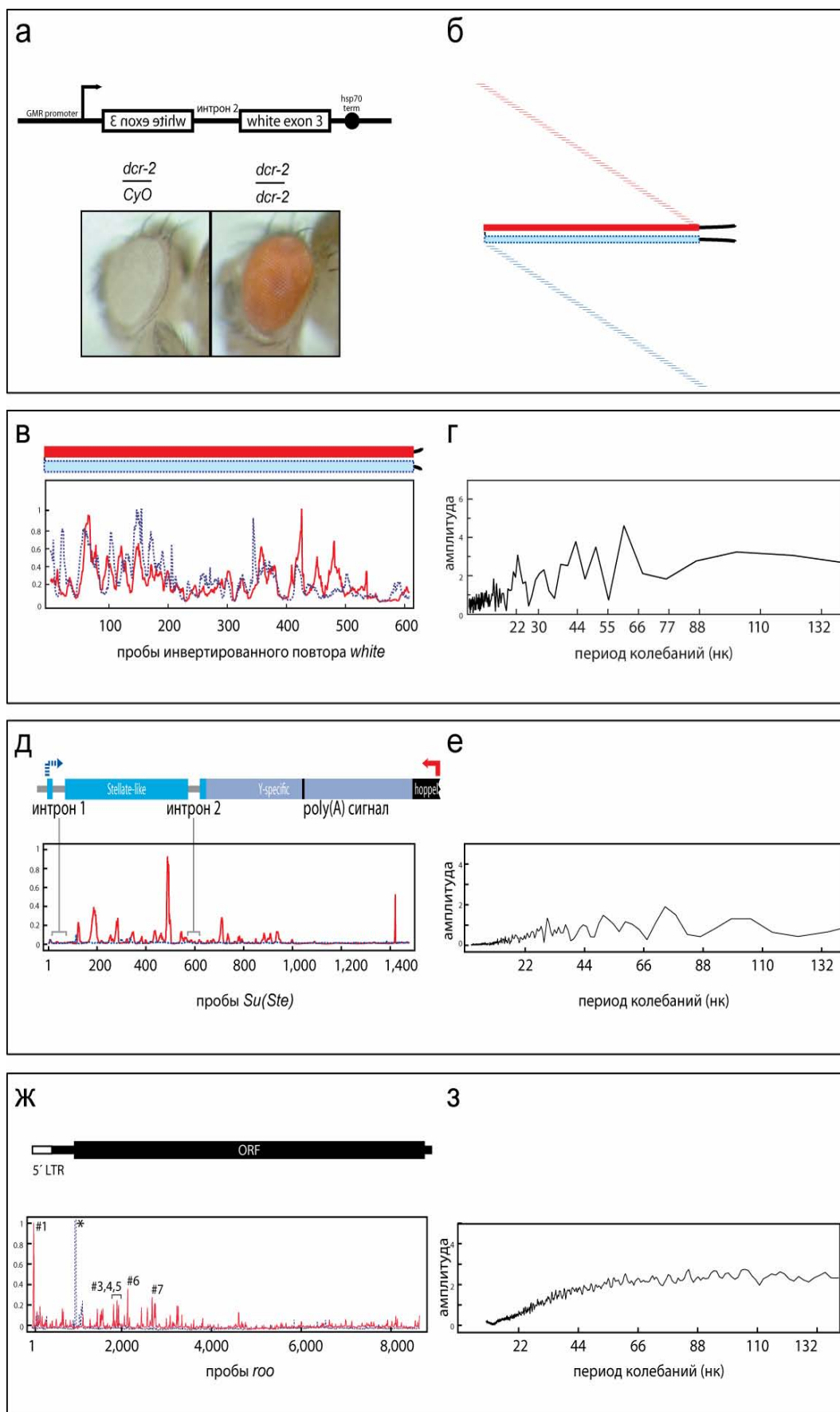


Рис. 1. Преимущественное накопление антисмысловых rasiРНК.

а. Схема трансгенной шпилечной конструкции, использованной для изучения биогенеза siРНК *in vivo*. Показаны старт транскрипции, инвертированный повтор и интрон гена *white*. Показана дерепрессия гена *white* в глазах мух, несущих мутацию в гене *dicer-2* в гомозиготе (*dcr-2/dcr-2*), тогда как у гетерозигот *dicer-2* экспрессия *white* подавлена (*dcr-2/CyO*).

б. Пробы с однонуклеотидным шагом, использованные для приготовления «микрочипа», для смысловой и антисмысловой цепи *white*-шпильки изображены в виде отрезков, формирующих наклонные линии сверху и снизу. Черный прямоугольник – антисмысловая цепь, серый прямоугольник – смысловая цепь.

в. Распределение сигналов гибридизации по длине последовательности *white*-шпильки. Ось x – положение проб, ось y – относительная интенсивность сигналов. Сплошной линией обозначены сигналы для антисмысловой цепи, пунктирной линией – для смысловой. Показано накопление обеих цепей siРНК *white*.

г. Преобразование Фурье (Bracewell 1986) для суммы смысловых и антисмысловых *white* siРНК сигналов, полученных при анализе микрочипа. Показано преимущественное накопление siРНК с «фазой» кратной 22 нуклеотидам.

д. Распределение сигналов гибридизации по длине повтора *Su(Ste)*. Представлены старты смысловой (пунктирная стрелка) и антисмысловой транскрипции (сплошная стрелка). Показано преимущественное накопление только антисмысловых rasiРНК *Su(Ste)*.

е и з. Преобразование Фурье для суммы смысловых и антисмысловых сигналов rasiРНК *Su(Ste)* и *roo*, полученных при анализе микрочипа. Показано отсутствие «фазы» в накоплении rasiРНК *Su(Ste)* и *roo*.

ж. Распределение сигналов гибридизации по длине повтора ретротранспозона *roo*. # 1, 3, 4, 5, 6, 7 - rasiРНК пики подтвержденные Northern-анализом как индивидуальные rasiРНК, * - неспецифический сигнал поли-А богатой последовательности. Показано преимущественное накопление только антисмысловых rasiРНК *roo*.

Гены, необходимые для биогенеза и функционирования rasiРНК

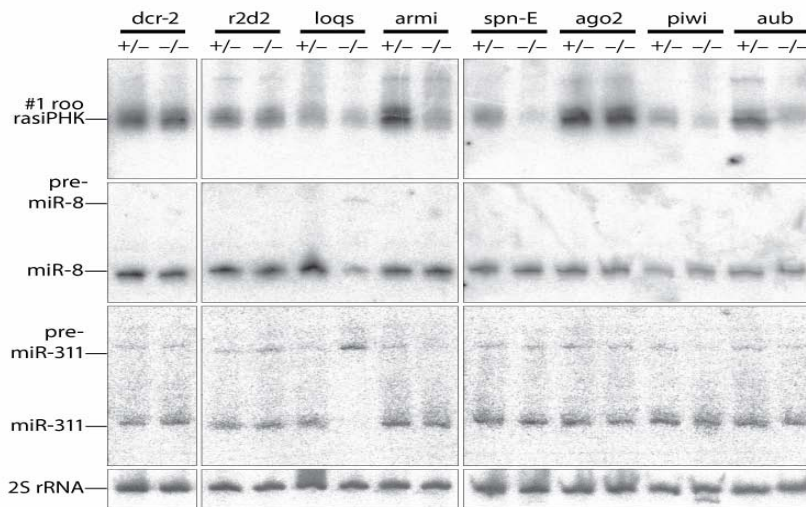
Ранее было показано, что мутации в генах *spindle-E* (*spn-E*), *armitage* (*armi*) и *aubergine* (*aub*) приводили к дерепрессии тандемных повторов *Stellate* в семенниках (Aravin et al., 2001; Tomari et al., 2004) и ретротранспозонов *HeT-A* и *I-element* в яичниках (Vagin et al., 2004). Так же было обнаружено, что ген *piwi* необходим для подавления экспрессии мобильных элементов в яичниках и семенниках (Sarot et al., 2004; Kalmykova et al., 2005). Гены *aubergine* и *piwi* кодируют PIWI подсемейство белков Argonaute. Гены *spindle-E* и *armitage*, кодируют семейство DEAD-box РНК-хеликаз.

На примере ретротранспозона *roo* методом Northern-анализа исследовали образование rasiРНК в яичниках на фоне мутаций в генах, необходимых для функции siРНК, miРНК или rasiРНК. Мутации в генах, кодирующих РНК-

хеликазы: *spindle-E* и *armitage*, а также PIWI подсемейство белков Argonaute (*piwi* и *aubergine*) приводят к значительному снижению *roo* rasiРНК, но не miРНК. В тоже время, мутации в генах, необходимых для биогенеза siРНК (*dicer-2*, *r2d2*, *ago2*) или miРНК (*loqs*), не влияют на накопление rasiРНК в яичниках (рис. 2а).

Исчезновение rasiРНК на фоне мутаций в генах *spindle-E*, *armitage*, *aubergine* и *piwi* коррелирует с резким увеличением транскриптов трех LTR-содержащих ретротранспозонов (*mdg-1*, *roo*, *gypsy*), ретротранспозона типа LINE (*I-element*) и тандемных повторов *mst40* (рис. 2б). Мутации в генах, нарушающих биогенез siРНК и miРНК, не влияют на экспрессию транспозонов (рис. 2б). Таким образом, был идентифицирован набор генов, необходимых для биогенеза и функции rasiРНК. Полученные данные позволяют предположить, что пути образования и функции rasiРНК и miРНК/siРНК различны.

а



б

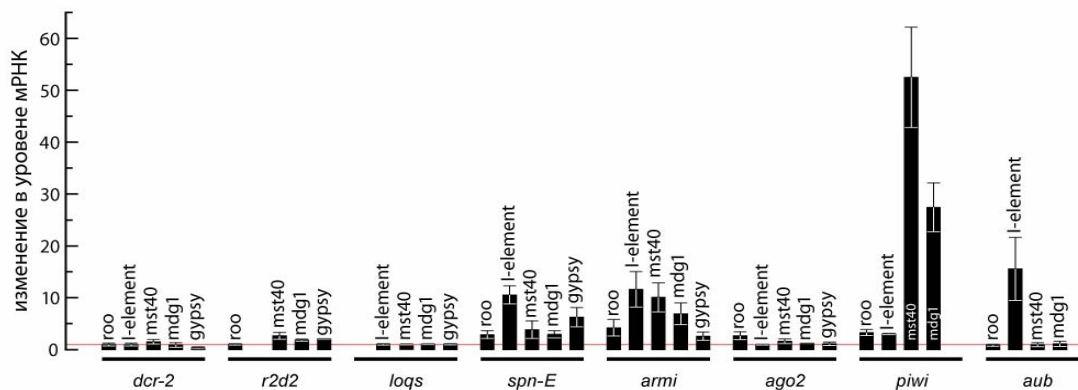


Рис. 2. Биогенез miРНК, siРНК и rasiРНК контролируется разными генами.

а. Northern-анализ экспрессии *gasi*РНК *roo*, соответствующей пику #1 (рис. 1ж), *mi*РНК-311, *mi*РНК-8 и 2S RNA (рибосомальная РНК, использованная в качестве контроля загрузки) на фоне мутации в генах, необходимых для функции *mi*РНК, *si*РНК или *gasi*РНК, где гетеро (+/-) и гомозиготы (-/-) по мутациям в соответствующих генах.

б. Увеличение количества транскриптов повторов у гомозигот по сравнению с гетерозиготами по мутациям в соответствующих генах. Оценка методом количественного RT-PCR. *roo*, *mdg1*, *gypsy* – LTR-содержащие ретротранспозоны *I-element* – не содержащий LTR ретротранспозон, *mst40* – тандемный повтор на второй хромосоме.

Продукция *gasi*РНК не зависит от активности белков Dicer

Мутация в гене *dicer-2* (*dcr-2*) не приводила ни к исчезновению *roo* *gasi*РНК (рис. 2а), ни к увеличению количества транскриптов повторов (рис. 2б). Таким образом, *dicer-2* не участвует в процессинге и функции *gasi*РНК. Мутация в гене *dicer-1* (*dcr-1*) в гомозиготе - летальна, поэтому использовали технику митотической рекомбинации, чтобы получить гомозиготных по мутации в гене *dicer-1* «клональные яичники» в гетерозиготных взрослых мухах. Полученные «герминальные клоны», как и ожидалось, имели нарушения в процессинге *mi*РНК (накапливался предшественник *mi*РНК-311), но не в продукции *roo* *gasi*РНК (рис. 3а). Также не было обнаружено увеличения количества транскриптов четырех мобильных элементов (рис. 3б). Таким образом, продукция и функция *gasi*РНК не зависят от активности белков Dicer.

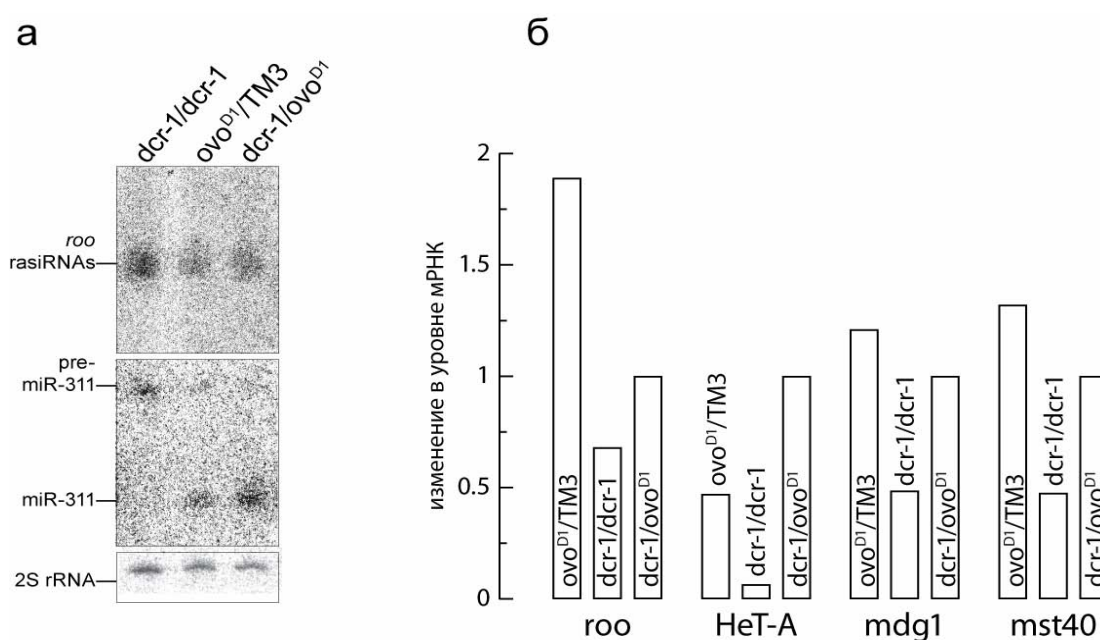


Рис. 3. Продукция и функция *gasi*РНК не зависит от активности белка Dicer-1.

а. Northern-анализ экспрессии *gasi*РНК *roo* и *mi*РНК-311 в герминальных клонах, несущих мутацию в гене *dicer-1* в гомозиготном состоянии (*dcr-1/dcr-1*). *dcr-1/ovo^{D1}*, *ovo^{D1}/TM3* – гетерозиготные положительные контроли.

б. Методом количественного RT-PCR сравнивали изменение количества транскриптов повторов в «герминальных клонах», несущих мутацию в гене *dicer-1* в гомозиготном состоянии (*dcr-1/dcr-1*). *dcr-1/ovo^{D1}*, *ovo^{D1}/TM3* – гетерозиготные положительные контроли. *roo*, *mdg1* – LTR-содержащие ретротранспозоны, *HeTA* – не содержащий LTR ретротранспозон, *mst40* – тандемный повтор на второй хромосоме.

Характеристика химической структуры *gasi*РНК

Характерным продуктом процессинга с помощью РНКазы-III подобных белков Dicer является *mi*РНК или *si*РНК, содержащие 5'-монофосфат и две свободные гидроксильные группы на 3' конце. *gasi*РНК как и *mi*РНК могут быть лигированы своим 5' концом с синтетическим нефосфорилированным олигонуклеотидом. Следовательно, *gasi*РНК содержат монофосфатную группу на 5' конце, как и *mi*РНК (рис. 4а). Присутствие монофосфатной группы на 5' конце было независимо подтверждено обработкой тотальной РНК щелочной фосфатазой с последующей инкубацией образца РНК с T4 полинуклеотид киназой. *gasi*РНК после обработки образца фосфатазой с последующей инкубацией с полинуклеотид киназой не изменяли своей подвижности (рис. 4б). Если бы на 5' конце находился дифосфат, то подвижность РНК после обработок была бы замедленной. Таким образом, независимым методом мы подтвердили, что *gasi*РНК содержат монофосфат на 5' конце.

Наличие двух свободных гидроксильных групп на 3' конце *mi*РНК позволяет удалить последний нуклеотид с помощью периодатного окисления (β -элиминирование). При обработке периодатом натрия тотальной РНК, выделенной из яичников, *mi*РНК укорачивалась на один нуклеотид, однако *gasi*РНК не подвергалась β -элиминированию (рис. 4б), что указывает на модификацию одной или двух гидроксильных групп на 3' конце, блокирующих β -элиминирование.

Оказалось, что *gasi*РНК имеют одну модифицированную и одну свободную гидроксильную группу на 3' конце, поскольку их удается лигировать с 5'-

фосфорилированным синтетическим олигонуклеотидом. (рис. 4 а). Следовательно у животных химическая структура rasiPHK отличается от miPHK тем, что rasiPHK несут модификацию на 3' конце. Обнаруженное отличие еще раз подчеркивает разницу между биогенезом rasiPHK и miPHK на химическом уровне у животных. Интересно, что у растений все классы коротких РНК, включая miPHK, несут 2'- метокси группу на 3' конце.

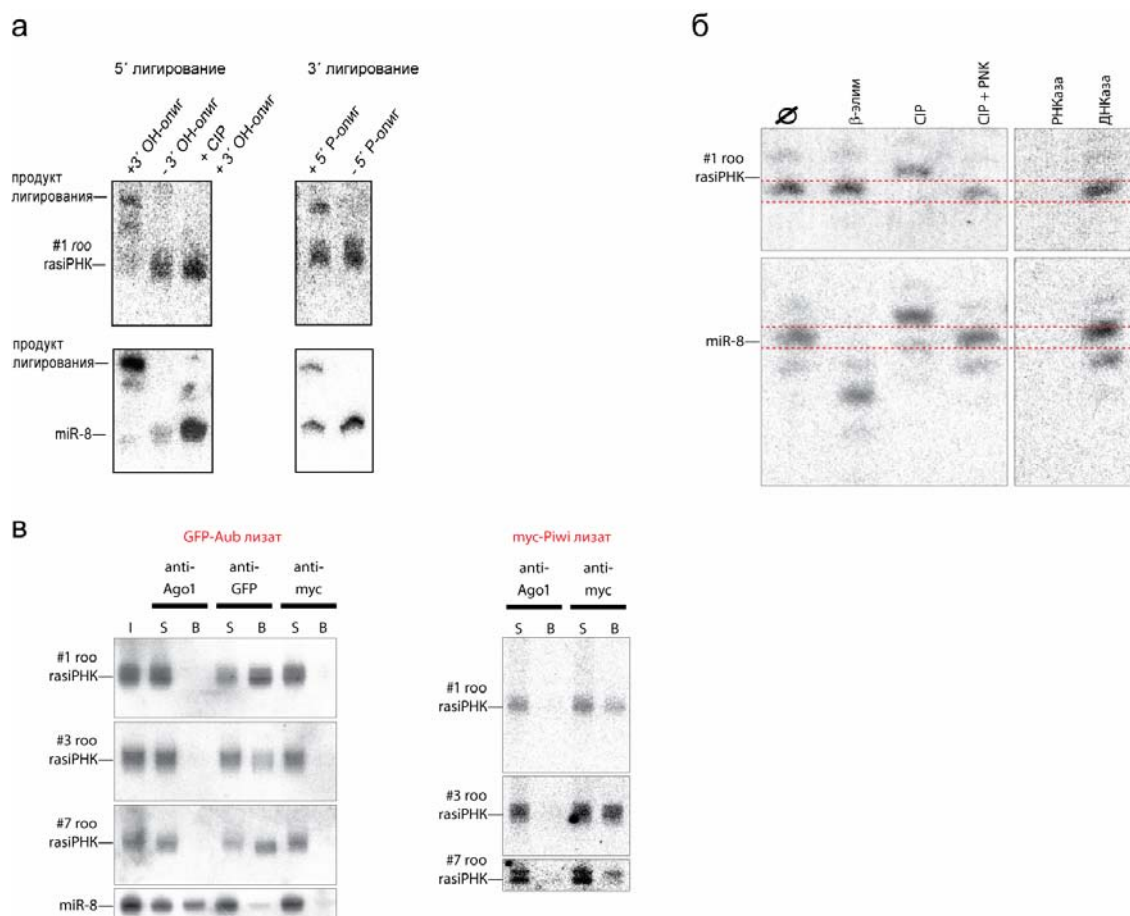


Рис. 4. *roo* rasiPHK имеют модификацию на 3' конце и взаимодействуют с PIWI подсемейством белков Argonaute.

а. Northern-анализ продуктов 3' или 5' лигирования rasiPHK *roo* с олигонуклеотидами. miR-8 приведена как положительный контроль лигирования РНК. CIP – щелочная фосфатаза. 5' лигирование: показано, что rasiPHK имеют 5' монофосфат, необходимый для лигирования с 3'-ОН РНК олигонуклеотидом (3'-ОН олиг), обработка щелочной фосфатазой тотальной РНК ингибирует лигирование rasiPHK (+CIP+3'-ОН олиг). 3' лигирование с олигонуклеотидом, содержащим 5' монофосфат (5'-P олиг), указывает на то, что rasiPHK имеют гидроксильную группу на 3' конце.

б. Northern-анализ продуктов периодатного окисления и дефосфорилирования *gasiRNK roo* и *miR-8*.

∅ - контрольный РНК образец, до периодатного окисления, β-элим - β-элиминирование (периодатное окисление), СР - фосфатазная обработка, СР+РНК - фосфатазная обработка с последующей инкубацией с полинуклеотид киназой (РНК). ДНКазы и РНКазы - ДНКазная и РНКазная обработка, соответственно. *gasiRNK* имеют блокированную гидроксильную группу на 3' конце - периодатное окисление невозможно.

в. Northern-анализ коротких РНК, ассоциированных с белками подсемейства PIWI или Argonaute. Коиммунопреципитированные с GFP-Aubergine, мус-PIWI или Ago1 короткие РНК - anti-GFP, anti-мус, anti-Ago1, соответственно. I - тотальная РНК, выделенная из экстрактов, B - РНК, выделенная из комплекса с иммунопреципитированными белками, S - РНК, оставшаяся в супернатанте после иммунопреципитации. anti-мус - отрицательный контроль, использованный для иммунопреципитации из GFP-Aub лизатов. #1, 3, 7 *gasiRNK roo* соответствуют пикам приведенным на рис. 1ж. Показано, что *gasiRNK* специфически взаимодействуют с белками подсемейства PIWI: PIWI и Aubergine, но не с Argonaute - Ago1

***gasiRNK* специфически взаимодействуют с PIWI подсемейством белков Argonaute**

Эффекторный комплекс подавления экспрессии генов с помощью siРНК или miРНК, содержит белок семейства Argonaute и соответствующую короткую РНК. Семейство белков Argonaute консервативно в эволюции многоклеточных организмов и подразделяется на два подсемейства: PIWI и Argonaute. Подсемейство белков Argonaute физически взаимодействует с siРНК и miРНК. У дрозофилы Ago2 взаимодействует с siРНК (Saito et al., 2006), тогда как Ago1 - с miРНК (Okamura et al., 2004). Оставалось невыясненным, с какими короткими РНК связано PIWI подсемейство Argonaute.

Мутации в генах подсемейства PIWI: *aubergine* и *piwi* приводили к исчезновению *gasiRNK*, тогда как мутация в гене подсемейства Argonaute, *ago2*, не влияла на накопление *gasiRNK* (рис. 2а). Для доказательства физического взаимодействия белков подсемейства PIWI с *gasiRNK* были использованы трансгенные мухи, экспрессирующие рекомбинантные Мус-PIWI или GFP-Aubergine белки в яичниках (линии мух предоставлены Н. Lin и Р. Macdonald,

соответственно). Данные трансгенные конструкции восстанавливали стерильность мух, вызванную мутациями в генах *piwi* или *aubergine*, соответственно. Следовательно, рекомбинантные Мус-PIWI или GFP-Aubergine сохраняют функцию эндогенных белков и могут быть использованы для изучения биогенеза rasiРНК *in vivo*.

Используя антитела к эпитопам Мус и GFP, иммунопреципитировали Мус-PIWI или GFP-Aubergine из экстрактов яичников. Northern-анализ РНК, ассоциированной с Мус-PIWI или GFP-Aubergine, показал, что rasiРНК специфически взаимодействуют с PIWI подсемейством белков Argonaute. Напротив, Ago1, принадлежащий к подсемейству Argonaute, специфически взаимодействует с miРНК, но не с rasiРНК (рис. 3в). Следовательно, rasiРНК специфически взаимодействуют с PIWI подсемейством белков Argonaute, формируя, по всей видимости, эффекторный комплекс, подавляющий экспрессию повторяющихся элементов генома в герминальной ткани.

Мутация в генах *aubergine* приводила к увеличению количества транскриптов *I-элемента*, но не *roo*, *mst-40*, *mdg-1*. Мутация в гене *piwi* не сопровождалась увеличением количества транскриптов *I-элемента*, но приводила к увеличению количества транскриптов *roo*, *mst-40*, *mdg-1*. Мутации в генах *armitage* и *spindle-E* приводили к значительному увеличению количества транскриптов всех исследованных повторов: *roo*, *mdg-1*, *I-элемента* и *mst-40* (рис. 2б). По всей видимости, Spindle-E и Armitage отвечают за связывание многих rasiРНК с эффекторными комплексами, содержащими PIWI или Aubergine, которые подавляют накопление транскриптов тех или иных повторяющихся последовательностей.

Биогенез rasiРНК в герминальной ткани

Полученные данные позволили впервые охарактеризовать биогенез rasiРНК, который принципиально отличается от хорошо изученных механизмов образования и функционирования miРНК или siРНК. Краткая сравнительная

характеристика трех путей подавления экспрессии генов, опосредованного короткими РНК, приведена в таблице 1.

Продукция *gasi*РНК не зависит от активности Dicer-1 или Dicer-2, РНКаза-III подобных белков. Биогенез *gasi*РНК происходит с преимущественным накоплением только антисмысловых коротких РНК. Таким образом, *gasi*РНК, по всей видимости, могут происходить из одноцепочечного РНК предшественника. Действительно, недавно было показано, что образование 5' конца *gasi*РНК из одноцепочечного предшественника могут осуществлять белки подсемейства PIWI (Brennecke et al., 2007). Однако, детальный механизм процессинга 5' конца *gasi*РНК и белки, отвечающие за продукцию 3' конца *gasi*РНК, остаются неизученными.

Таблица 1. Сравнительная характеристика трех известных путей подавления экспрессии генов, опосредованного короткими РНК у *Drosophila melanogaster*.

характеристики	siРНК	miРНК	gasiРНК
• предшественник	дцРНК	70 нк. шпилька	одноцепочечная РНК?
• накапливаются	обе цепи	обе цепи	одна цепь
• белки, участвующие в биогенезе	Dicer-2	Dicer-1	независит от Dicer
• для функции необходимы белки	Dcr-2, R2D2, Ago2	Dcr-1, Loqs, Ago1	Armi, Spn-E, PIWI
• ассоциированы с белками	Ago2	Ago1	PIWI
• 3' конец	2',3' свободные ОН группы?	2',3' свободные ОН группы	блокирован

Вероятно, после процессинга *gasi*РНК подвергаются модификации одной из двух гидроксильных групп на 3' конце. Наличие модификации *gasi*РНК также было подтверждено в других работах (Gunawardane et al., 2007). Остается неисследованным, несет ли модификация *gasi*РНК какую-либо

функциональную роль. Можно предположить, что модификация определяет специфическое взаимодействие *gasiРНК* с подсемейством PIWI белков Argonaute, хотя полученных в настоящий момент данных пока недостаточно для такого заключения.

По всей видимости, Spindle-E и Armitage загружают *gasiРНК* в эффекторный комплекс, содержащий белок PIWI подсемейства Argonaute, который за счет комплементарных взаимодействий *gasiРНК* с мишенью узнает транскрипты повторов и подавляет их экспрессию. Механизм этого подавления в настоящее время практически не изучен. Предварительные данные, полученные нами, указывают, что супрессия повторяющихся последовательностей происходит на посттранскрипционном уровне в результате деградации мРНК.

Таким образом, охарактеризован биогенез *gasiРНК* как новый, отличный от *miРНК* или *siРНК* путей, механизм подавления повторяющихся последовательностей генома, опосредованный короткими РНК в герминальной ткани.

Выводы

Исследован процесс биогенеза rasiРНК (repeat-associated small interfering RNA), отвечающих за подавление экспрессии повторяющихся элементов генома, представленных тандемными повторами *Stellate* и копиями мобильных элементов.

1. Показано, что биогенез rasiРНК, соответствующих повторам *Stellate* и мобильным элементам, сопровождается преимущественным накоплением антисмысловой цепи РНК.
2. Продукция rasiРНК не зависит от активности белков Dicer-1 или Dicer-2.
3. Гены, участвующие в образовании и функционировании miРНК (*dicer-1*, *logs*) или siРНК (*dicer-2*, *r2d2*, *ago2*), не нужны для опосредованного rasiРНК подавления экспрессии повторяющихся элементов генома.
4. Впервые выявлены 4 гена, необходимые для стабильности и функции rasiРНК:
aubergine и *piwi*, кодирующие PIWI белки семейства Argonaute;
armitage и *spindle-E*, кодирующие РНК-хеликазы семейства DEAD-box.
5. Показано, что PIWI белки семейства Argonaute специфически взаимодействуют с rasiРНК, несущими блокированный 3' конец, но не с miРНК.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. Аравин А.А., **Вагин В.В.**, Розовский Я.М., Гвоздев В.А. Подавление экспрессии генов введением гомологичной двуцепочечной РНК в культуре клеток *Drosophila melanogaster*. Генетика. 2001, 37(6):779-83
2. Аравин А.А., **Вагин В.В.**, Наумова Н.М., Розовский Я.М., Кленов М.С., Гвоздев В.А. Явление РНК-интерференции и развитие организмов. Онтогенез (Москва) 2002, 33(5): 349-60
3. Аравин А.А., Кленов М.С., **Вагин В.В.**, Розовский Я.М., Гвоздев В.А. Роль двухцепочечной РНК в подавлении генов эукариот. Мол. Биол. (Москва). 2002, 36(2): 240-51
4. **V. Vagin**, M. Klenov, A. Kalmykova, A. Stolyarenko, R. Kotelnikov and V. Gvozdev. The RNA Interference Proteins and Vasa Locus are Involved in the Silencing of Retrotransposons in the Female Germline of *Drosophila melanogaster*. RNA Biology 2004, May/June: 54-58
5. Aravin A., Klenov M., **Vagin V.**, Bantignies F., Cavalli G. and Gvozdev V.A. Dissection of natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line. Mol. Cell Biol. 2004, 24(15): 6742-50
6. Forstermann K., Tomari Y., Du T., **Vagin V.**, Denli A., Bratu D., Klatenhoff C., Theurkauf W. and Zamore P.D. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. PLoS Biol. 2005, 3(7): e236

7. **Vagin V.**, Sigova A., Li C., Seitz H., Gvozdev V., Zamore P.D. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germ line. *Science* 2006, 313(5785): 320-324

Доклады на научных конференциях:

8. Кленов М., **Вагин В.**, Аравин А. Подавление экспрессии генов, опосредованное эндогенной двуцепочечной РНК. 7-ая Пушкинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА», Пушкино, 14-17 апреля, 2003. Тезисы докладов стр. 341
9. **V.Vagin**, O. Olenkina, S. Ryasansky, A. Popkova, R. Kotelnikov, A. Kalmykova, T. Du, V. Gvozdev and P.D. Zamore “Production and function of rasiRNAs” Keystone symposia, 2005, Breckenbridge, USA
10. **V.Vagin**, A. Sigova, C. Li, V. Gvozdev and P.D. Zamore “rasiRNA biogenesis in the *Drosophila* germline”, 47th Annual *Drosophila* research conference, 2006, Houston, USA