

УДК 577.2:595.773.4

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ ЛОКУСОВ *FLAMENCO* И *PIWI* У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2013 г. **Ф.А. Урусов, Л.Н. Нефедова, А.Р. Лавренов, Н.И. Романова, А.И. Ким**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, кафедра генетики,  
Москва, Россия, e-mail: aikim57@mail.ru

Поступила в редакцию 27 июня 2013 г. Принята к публикации 8 июля 2013 г.

Считается, что гетерохроматиновый локус *flamenco*, контролирующий у *Drosophila melanogaster* транспозиции ретротранспозона/ретровируса *gypsy*, является одним из источников антисмысловых РНК, взаимодействующих с белком Piwi – важнейшим компонентом системы РНК-интерференции. Мутации *piwi* и *flamenco* имеют одинаковое фенотипическое проявление – повышенный уровень транскрипции и частоты транспозиции ретротранспозона/ретровируса *gypsy*. В настоящей работе обсуждаются результаты комплементационного теста, который заключается в скрещивании линий MS и SS, мутантных по локусу *flamenco*, с линией *piwi*<sup>3</sup>, гетерозиготной по мутации в гене *piwi*, с последующим исследованием уровня транскрипции *gypsy* в яичниках и семенниках гибридов, полученных от данных скрещиваний. Проведен генетический (гибридологический) и молекулярный анализы взаимодействия локусов *flamenco* и *piwi*. Выявлено, что транскрипция *gypsy* по-разному регулируется в тканях семенников и яичников линий SS и MS, что, по-видимому, обусловлено различной активностью кластеров piRNA в этих тканях. Также показано, что гены *piwi* и *flamenco* в тканях семенников взаимодействуют комплементарно.

**Ключевые слова:** *Drosophila melanogaster*, *flamenco*, *piwi*, молекулярный анализ.

### ВВЕДЕНИЕ

Ретротранспозоны – класс мобильных генетических элементов (МГЭ), перемещение которых осуществляется с помощью обратной транскрипции. Среди них различают ретротранспозоны, фланкированные длинными концевыми повторами (ДКП-ретротранспозоны), и LINE – элементы, не содержащие ДКП. ДКП-ретротранспозоны имеют высокую степень сходства с ретровирусами. В структуре как ретротранспозонов, так и ретровирусов различают 3 открытые рамки считывания (ОРС) – *gag*, *pol*, *env*. Если у ДКП-ретротранспозона все 3 ОРС не повреждены и способны полностью выполнять свои функции, то потенциально такой МГЭ способен не только перемещаться по геному в пределах одной клетки, но и заражать другие клетки и, следовательно, являться ретровирусом. Именно это свойство впервые было

показано у ДКП-ретротранспозона *D. melanogaster gypsy* (Kim *et al.*, 1994a), а затем и у элемента *ZAM* (Leblanc *et al.*, 2000).

Показано, что транспозиции ДКП-ретротранспозона-ретровируса *gypsy* контролирует локус *flamenco*, локализованный в районе 20A1-3 X-хромосомы *D. melanogaster* (Pélisson *et al.*, 1994). В том же районе X-хромосомы локализован локус *SOM*, контролирующий родственный *gypsy* ретротранспозон *ZAM* (Desset *et al.*, 2003). Следует отметить, что и локус *flamenco*, и локус *SOM* картированы только генетически, молекулярные механизмы их функционирования изучены недостаточно.

Существенная часть МГЭ присутствует в виде дефектных копий, накопивших в процессе эволюции мутации и в настоящее время не способных к перемещению. Известно, что такие дефектные последовательности МГЭ могут быть вовлечены в процессы контроля их активных

копий. В настоящее время принято считать, что локус *flamenco* является скоплением множества дефектных копий МГЭ и служит источником антисмыслового РНК-предшественника для системы РНК-интерференции (Brennecke *et al.*, 2007; Pélisson *et al.*, 2007; Malone *et al.*, 2009).

У дрозофилы известно несколько биохимических путей РНК-интерференции. Суть каждого из них заключается в подавлении экспрессии гена на посттранскрипционном уровне с помощью антисмысловых РНК, однако в каждом из путей функционируют разные белки (Lee *et al.*, 2004). Источники антисмысловой РНК тоже отличаются для каждого из них. Локус *flamenco* вовлечен в Piwi-зависимый путь. Данный путь предполагает деградацию смысловой РНК-мишени с участием коротких РНК, взаимодействующих с белком Piwi (piRNA, Piwi-interacting RNA), в соматических фолликулярных клетках (Malone *et al.*, 2009). В тканях яичников действует циклический механизм, обеспечивающий амплификацию пула piRNA, имеющий название «пинг-понг» (Brennecke *et al.*, 2007). Для инициации механизма «пинг-понг» необходимы первичные piRNA, имеющие происхождение от локуса *flamenco* (Brennecke *et al.*, 2007). Кроме того, предполагается, что источниками антисмысловых РНК могут являться и другие кластеры piRNA.

Очевидно, что белок Piwi играет в вышеописанных процессах крайне важную роль, поскольку именно он осуществляет самый ранний этап – образование первичных piRNA. Мутации в гене *piwi* приводят к стерильности и вызывают повышенную частоту транспозиции МГЭ *gypsy* (Sarot *et al.*, 2004) и *copia* (Kalmykova *et al.*, 2005). Также у мутантов наблюдается повышенный уровень транскриптов многих других МГЭ (Lu, Clark, 2011). Относительно *gypsy* нарушения в обоих генах – *piwi* и *flamenco* – приводят к одинаковому фенотипическому проявлению: повышаются уровень транскрипции и частота транспозиции данного элемента.

Описано несколько мутантных по локусу *flamenco* линий *D. melanogaster*, большинство из которых получено путем инсерции Р-элемента в область данного локуса (Robert *et al.*, 2001; Mevel-Ninio *et al.*, 2007). В нашей лаборатории ранее была исследована линия SS *D. melanogaster*, в которой была обнаружена

мутация в локусе *flamenco*. Она не является инсерционным мутантом, и природа мутации *flamenco* в ней неизвестна (Kim *et al.*, 1994b). Из этой линии путем искусственного введения активной копии МГЭ *gypsy* получена линия MS, характеризующаяся повышенной частотой транспозиции *gypsy* (Kim *et al.*, 1994b).

Методом обратной транскрипции (ПЦР) показано, что в линиях SS и MS наблюдался повышенный уровень транскрипции в области локуса *flamenco*, являющегося источником антисмысловых piRNA (Неопубл. данные). Мы предположили, что повышенный уровень транскрипции *flamenco* в линиях SS и MS может быть обусловлен мутацией в генах системы РНК-интерференции, в первую очередь в гене *piwi*, в результате которой РНК-предшественник piRNA накапливается вследствие нарушения его процессинга. Настоящая работа посвящена экспериментальной проверке этого предположения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Линии *D. melanogaster*

Изогенные линии, мутантные по гену *flamenco*, *w<sup>1</sup>*: SS, MS (содержит активный *gypsy*) (Kim *et al.*, 1994b) и линия Д32 с фенотипом *flamenco*<sup>+</sup> – из коллекции кафедры генетики МГУ. Линия P{PZ}piwi<sup>06843</sup> cn<sup>1</sup>/CyO; ry<sup>506</sup> (предоставлена А.И. Калмыковой, ИМГ РАН, Москва) характеризуется наличием инсерции Р-элемента в первый экзон гена *piwi* (Lin, Spradling, 1997). В тексте линия P{PZ}piwi<sup>06843</sup> cn<sup>1</sup>/CyO; ry<sup>506</sup> обозначена символом piwi<sup>3</sup>, под которым она также фигурирует в базе данных Flybase.

Линии мух культивировали в стандартных условиях: на общепринятой агаризованной питательной среде при температуре 25 °С. Скрещивания осуществлялись в тех же условиях. Для массовых скрещиваний в пробирку диаметром 3 см помещали по 10 особей каждого пола.

### Сбор тканей для последующего выделения РНК

Мух анестезировали с помощью диэтилового эфира и под бинокулярным микроскопом препаровальными иглами производили их вскрытие и отделение яичников или семенников от корпуса.

Для выделения РНК собирали примерно 20 мг тканей. Сбор осуществляли в 1,5 мл пробирки, содержащими 10 мкл деионизованной воды и 40U рибонуклеазного ингибитора Ribolock («Fermentas»). В процессе сбора пробирки с тканями находились в ледяной бане.

### Выделение тотальной РНК

Выделение РНК осуществляли с помощью комплекта реагентов «РИБО-золь-А» фирмы «AmpliSens» (Россия). Биоматериал гомогенизировали в буфере, содержащем гуанидинизотиоцианат. Далее экстракцию проводили по протоколу производителя. Качество выделенной РНК оценивали путем электрофореза в 2 %-м агарозном геле, количество – спектрофотометрически (Nanodrop 1000, «Thermo Fisher Scientific»). Затем 1 мкг РНК инкубировали с 1U ДНКазы I («Fermentas») при 37 °С в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 2,5 мМ, ДНКазу инактивировали прогреванием при 65 °С в течение 10 мин.

### Синтез кДНК

Синтез кДНК осуществляли с помощью набора фирмы «Fermentas» «First Strand cDNA Synthesis Kit» по протоколу производителя, в качестве затравки для синтеза использовали случайные праймеры. Количество матрицы РНК составляло 500 нг на реакцию. Эффективность реакции обратной транскрипции оценивали с помощью серии кратных разведений РНК.

### Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени

Аmplификацию проводили в объеме 25 мкл в течение 40 циклов в амплификаторе Mini-Opticon Real-Time PCR System («Bio-Rad Laboratories»). Была использована реакционная смесь M-428 фирмы «Синтол» (Россия), содержащая флюоресцентный краситель SYBR Green I. Концентрация  $MgCl_2$  – 2,5 мМ, каждого праймера – 0,4 мкМ на реакцию. Параметры цикла: денатурация – 95 °С, 15 с, отжиг праймеров – 55 °С, 45 с, элонгация – 62 °С, 60 с. Для амплификации использовали праймеры к гену *gypsy*:

прямой 5'-gtctgcaccaagcaagta-3', обратный 5'-cacgtcaggaatgcttct-3' и к гену *rp49*: прямой 5'-gtatcgacaacagagtgcgt-3', обратный 5'-gttctgcatgagcaggacct-3'. Эффективность ПЦР оценивали с помощью серии кратных разведений кДНК.

Анализ результатов ПЦР проводили с помощью пакета программ Bio-Rad CFX Manager (версия 1.6.541.1028). Вычисление экспрессии *gypsy* данным программным обеспечением производилось  $\Delta\Delta C(t)$  методом. В качестве референсного гена был использован *rp49*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Молекулярная природа мутации в локусе *flamenco*, контролирующем транспозиции МГЭ *gypsy* в линии MS, изогенной линии SS, до сих пор неизвестна. Поскольку в линии MS уровень транскрипции РНК в области локуса *flamenco* был выше, чем в линии дикого типа, мы предположили, что в линии MS механизм РНК-интерференции не работает эффективно либо в результате нарушения процессинга РНК-предшественника (мутация в гене *piwi*), либо из-за структурных особенностей самого локуса *flamenco*. Чтобы ответить на вопрос, являются ли наблюдаемые особенности процессинга РНК-предшественника следствием нарушения нормального функционирования белка *Piwi*, мы провели функциональный тест на аллелизм, или тест на комплементацию. Его суть сводится к скрещиванию линии MS с линией *piwi*<sup>3</sup>, гетерозиготной по рецессивной мутации *piwi*, и последующему анализу уровня транскрипции ретротранспозона *gypsy* в яичниках и семенниках (где функционируют *Piwi*-зависимые механизмы подавления МГЭ) потомства относительно родительских линий.

Скрещивания осуществляли в обоих направлениях (прямое – ♀♀MS × ♂♂*piwi*<sup>3</sup>, обратное – ♀♀*piwi*<sup>3</sup> × ♂♂MS). Поскольку гены *flamenco* и *piwi* характеризуются как гены с материнским эффектом (Pélisson *et al.*, 1994; Megosh *et al.*, 2006; Brennecke *et al.*, 2007), прямое и обратное скрещивания, теоретически, могут демонстрировать разные результаты.

Кроме линии MS, аналогичные скрещивания были осуществлены с использованием другой линии – SS (прямое – ♀♀SS × ♂♂*piwi*<sup>3</sup>, обратное – ♀♀*piwi*<sup>3</sup> × ♂♂SS). MS и SS являются

изогенными линиями. В геноме линии SS нет активного *gypsy*, способного к перемещению. Линия MS получена на основе SS путем ее трансформации активной копией *gypsy*. Следовательно, скрещивания с линией SS можно считать контрольными для данного эксперимента.

Схема скрещиваний представлена на рис. 1. Балансрная хромосома *CyO* линии *piwi*<sup>3</sup> маркирована доминантной мутацией *Cy* (загнутые крылья), летальной в гомозиготном состоянии. В результате скрещивания появляются потомки двух фенотипических классов: с загнутыми (*Cy*) и нормальными (*N*) крыльями. Исходя из схемы скрещивания получается, что только особи с нормальными крыльями (*N*) наследуют от линии *piwi*<sup>3</sup> ту хромосому, в которой аллель данного гена присутствует в нефункциональном мутантном состоянии. Другую хромосому особи *N* наследуют от линий MS или SS; при этом аллельное состояние гена *piwi* в этой хромосоме нам неизвестно.

Следует отметить, что определенные мутации в гене *piwi* в гомозиготе могут приводить к резкому снижению жизнеспособности и стерильности таких особей (Cox *et al.*, 1998). Белок *Piwi* необходим для поддержания герминальных стволовых клеток (Cox *et al.*, 2000). Гомозигот-

ные мухи имеют недоразвитые яичники сильно уменьшенного размера и, как следствие, стерильны. Значит, если в линиях MS и SS имеется летальный аллель гена *piwi*, то при массовом скрещивании MS или SS с линией *piwi*<sup>3</sup> мы получим потомство *N*, часть которого унаследует оба нефункциональных аллеля *piwi* (один от MS или SS, другой от линии *piwi*<sup>3</sup>). Жизнеспособность таких гибридов может оказаться низкой, вследствие чего они не попадут в поле нашего зрения. В такой ситуации результаты теста могут быть интерпретированы неправильно.

Чтобы убедиться в том, что в наших линиях отсутствует летальная мутация в гене *piwi*, нами было поставлено 100 индивидуальных скрещиваний самок линии SS с самцами линии *piwi*<sup>3</sup>. Очевидно, что из всех трех возможных генотипов (*piwi*<sup>+</sup>/*piwi*<sup>+</sup>, *piwi*<sup>+</sup>/*piwi*, *piwi*/*piwi*) плодовитыми будут только гетерозиготные особи и гомозиготные мухи дикого типа. Если в индивидуальном скрещивании от линии SS будет участвовать гомозиготная особь дикого типа или гетерозиготная по мутантному аллелю, то будет наблюдаться расщепление фенотипических классов *Cy* к *N*, равное 1 : 1, при условии, что мутация в *piwi* не летальна. В случае же ее летальности соотношение изменится в пользу

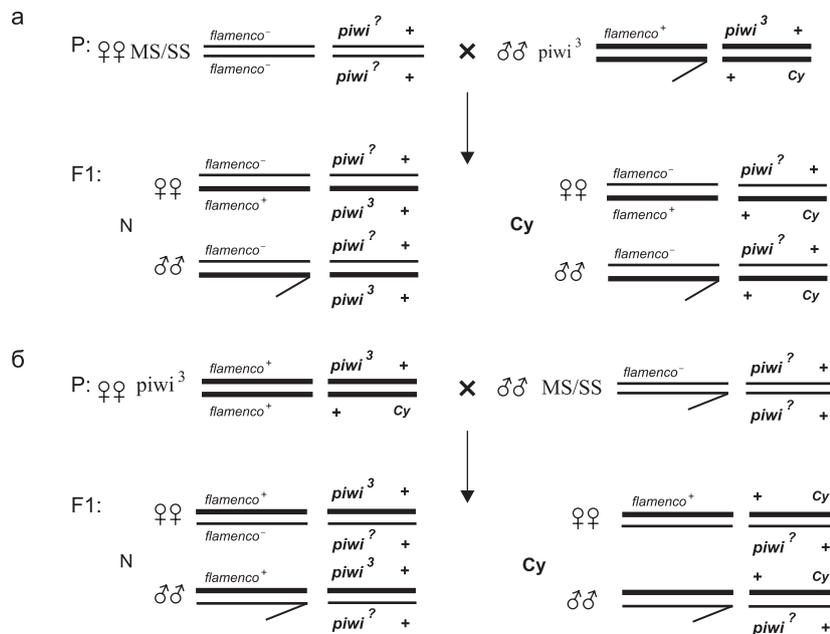


Рис. 1. Схема скрещиваний линий SS и MS с линией *piwi*<sup>3</sup>.

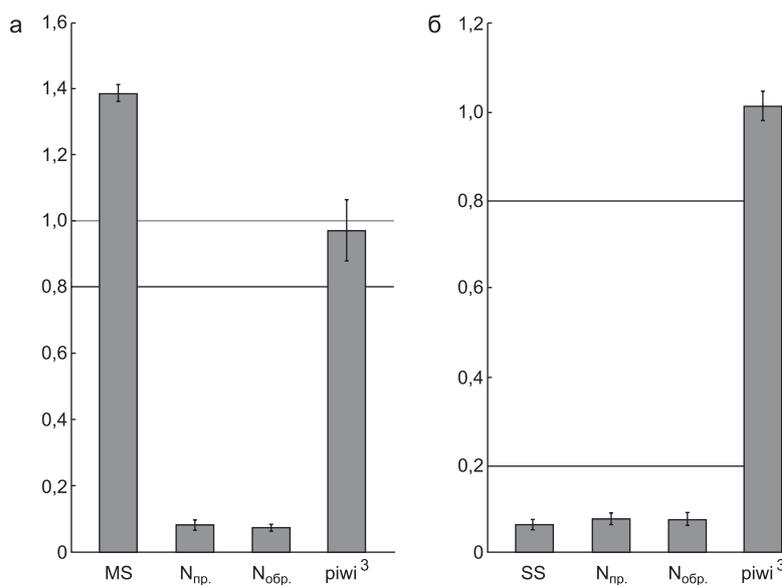
а – прямое скрещивание; б – обратное. Фенотипические классы: *N* – мухи с прямыми крыльями, *Cy* – мухи с загнутыми крыльями. Объяснения в тексте.

Су, т. е. 2 : 1. В результате проведенного анализа было выявлено, что лишь в одном случае из 100 скрещиваний расщепление 2 : 1 было достоверным, что, безусловно, является случайным событием. Во всех остальных индивидуальных скрещиваниях наблюдалось расщепление 1 : 1. Таким образом, даже если в наших линиях имеется мутация в гене *piwi*, то она не является летальной, а значит, потомство N будет относительно однородным, поскольку не происходит гибели особей с определенным генотипом. В связи с этим дальнейший анализ не будет искажен вышеизложенными факторами.

Еще одно подтверждение того, что серьезных нарушений в гене *piwi* в линиях MS и SS нет, было получено при сборе тканей для последующей экстракции РНК. Было проанализировано не менее 100 гонад каждого генотипа N и обнаружено, что у всех потомков N яичники имели нормальную морфологию.

Тем не менее это не исключает наличия полиморфных вариантов гена *piwi*, которые могут не оказывать существенного влияния на жизнеспособность и плодовитость мух, но при этом они могут быть не способны обеспечивать посттранскрипционный сайленсинг ретро-транспозонов в полной мере. В связи с этим функциональный тест на данном этапе работы являлся актуальным.

Линия SS не содержит активно транскрибируемых копий *gypsy*; линии MS и *piwi*<sup>3</sup> содержат активные копии *gypsy*, транскрибируемые на высоком уровне за счет нарушения генетического контроля со стороны локуса *flamenco* (или гена *piwi*?) и гена *piwi* соответственно (рис. 2). Поэтому уровень экспрессии *gypsy* служил индикатором наличия/отсутствия нарушений в гене *piwi* линий SS и MS. При положительном результате теста мы ожидали, что особи N продемонстрируют высокий уровень экспрессии *gypsy*, причем значительно превышающий экспрессию в тканях родительских линий, поскольку ранее было показано, что мутации в гене *piwi* в гомозиготном состоянии могут приводить к 150-кратному увеличению экспрессии *gypsy* в яичниках по сравнению с гетерозиготными особями (Brennecke *et al.*, 2007). При отрицательном же результате особи N должны демонстрировать заниженный уровень экспрессии *gypsy* либо такой же, как и у родительских линий. В результате экспериментов было обнаружено, что в яичниках гибридов фенотипического класса N, полученных как от прямого скрещивания ♀MS × ♂*piwi*<sup>3</sup> (рис. 2, а, N<sub>пр.</sub>), так и от обратного скрещивания ♀*piwi*<sup>3</sup> × ♂MS (рис. 2, а, N<sub>обр.</sub>), наблюдается примерно 17-кратное снижение экспрессии по сравнению с яичниками линии MS и 12-кратное снижение



**Рис. 2.** Уровень транскрипции *gypsy* в яичниках линий MS, *piwi*<sup>3</sup> и их гибридов от прямого (N<sub>пр.</sub>) и обратного (N<sub>обр.</sub>) скрещиваний (а) и линий SS, *piwi*<sup>3</sup> и их гибридов от прямого (N<sub>пр.</sub>) и обратного (N<sub>обр.</sub>) скрещиваний (б).

относительно яичников другой родительской линии –  $piwi^3$ .

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что результат теста отрицательный. Мутаций в гене  $piwi$ , приводящих к нарушению его функции, связанной с контролем ретротранспозиции  $gypsy$ , в изогенных линиях MS и SS не имеется.

Следует отметить, что для решения поставленной задачи мы учитывали экспрессию  $gypsy$  только у потомков с фенотипом N. Гибриды другого фенотипического класса, Су, наследуют хромосому с нормальным аллелем  $piwi$  от линии  $piwi^3$ , в связи с чем это потомство является неполне информативным. Однако в случае отрицательного результата функционального теста данный класс мух можно было использовать в качестве дополнительного контроля, ожидая сходный характер транскрипции  $gypsy$  у гибридов N и Су.

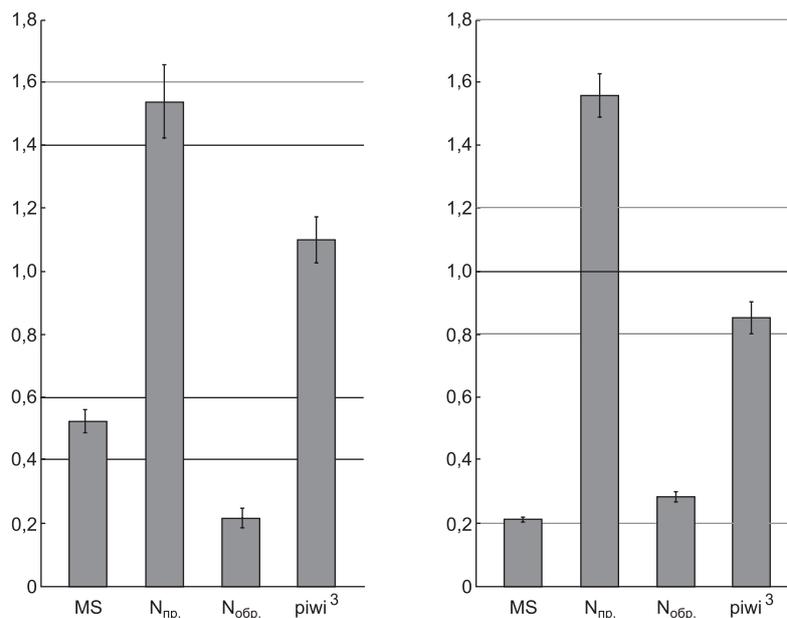
Неожиданно было обнаружено, что уровень транскрипции  $gypsy$  во всех тканях фенотипического класса Су оказался значительно выше, чем у особей N. При этом ни в одном случае он не превысил значений, по крайней мере, одной из родительских линий –  $piwi^3$ . Такая закономерность была выявлена во всех исследованных нами тканях, что позволило сделать вывод о достоверности опыта в целом. По-видимому, наблюдаемое различие между классами мух N и Су связано с наличием у мух линии Су соответствующей мутации, представляющей собой перичентрическую инверсию второй хромосомы, которую гибриды Су наследуют вместе с балансерной хромосомой СуО. Аналогичный эффект (когда в фенотипическом классе Су экспрессия  $gypsy$  выше, чем в классе N) мы обнаружили после анализа потомков от скрещивания SS и MS с другими лабораторными линиями, также сбалансированными хромосомой СуО (данные не представлены).

Поскольку транскрипция  $gypsy$  в линии  $piwi^3$  много ниже, чем в линии, гомозиготной по гену  $piwi$  (Brennecke *et al.*, 2007), можно сделать вывод о том, что инверсия если и влияет на экспрессию гена  $piwi$ , то незначительно. Известно, что помимо гена  $piwi$  вторая хромосома содержит два крупных кластера piRNA (Brennecke *et al.*, 2007). По-видимому, инверсия может нарушать экспрессию кластеров piRNA в балансерной хромосоме.

В яичниках гибридов N, полученных от другой пары скрещиваний,  $\text{♀}SS \times \text{♂}piwi^3$ ,  $\text{♀}piwi^3 \times \text{♂}SS$  – наблюдалась практически та же самая картина экспрессии  $gypsy$  (рис. 2, б). Уровень транскрипции  $gypsy$  в яичниках гибридов N и яичниках SS оказался одинаковым. Это связано с тем, что в SS отсутствуют активные копии данного МГЭ, способные к перемещению.

В семенниках снижение транскрипции  $gypsy$  в гибридах N относительно экспрессии в тканях родительских линий наблюдалось только в обратном скрещивании (рис. 3, а, б  $N_{обр.}$ ). В прямом же скрещивании было обнаружено, что уровень экспрессии  $gypsy$  в таких гибридах оказался незначительно выше, чем в семенниках родительской линии  $piwi^3$ , и в несколько раз выше, чем в линиях SS и MS (рис. 3, а, б,  $N_{пр.}$ ). Различное проявление признака (экспрессия  $gypsy$ ) у гибридов прямого и обратного скрещиваний означает, что локус, контролирующий данный признак, сцеплен с X-хромосомой. Действительно, только самцы от прямого скрещивания наследуют свою единственную X-хромосому от линий SS или MS (рис. 1), которая, как предполагается, несет мутантный аллель *flamenco*. Гибридные самцы, полученные от обратного скрещивания, наследуют X-хромосому от линии  $piwi^3$  и не демонстрируют повышенной экспрессии  $gypsy$ .

Обращает на себя внимание тот факт, что в семенниках родительских линий MS и SS уровень транскрипции  $gypsy$  различается не в 20 раз, как в яичниках, а только в 2; при этом уровень транскрипции  $gypsy$  и в семенниках, и в яичниках мутантов по гену  $piwi$  остается примерно одинаковым. По-видимому, в семенниках и яичниках регуляция активности ретротранспозона  $gypsy$  осуществляется по-разному. Возникает также вопрос, почему в семенниках SS и MS, которые, как и гибриды N, имеют мутантный аллель *flamenco*, количество РНК ниже, чем в гибридах. Это можно объяснить тем, что у гибридов N повышение транскрипции  $gypsy$  происходит за счет нарушенной активности одного из аллелей  $piwi$  (чего нет в линии MS) и отсутствия нормального аллеля *flamenco*. Таким образом, в гибридах N мы наблюдаем комплементарное взаимодействие генов  $piwi$  и *flamenco* у самцов. Следует учитывать то, что локус *flamenco* – это источник антисмысло-



**Рис. 3.** Уровень транскрипции *gypsy* в семенниках линий MS, *piwi*<sup>3</sup> и их гибридов от прямого (N<sub>пр.</sub>) и обратного (N<sub>обр.</sub>) скрещиваний (слева) и линий SS, *piwi*<sup>3</sup> и их гибридов от прямого (N<sub>пр.</sub>) и обратного (N<sub>обр.</sub>) скрещиваний (справа).

вых РНК для гена *piwi*. Поэтому в линии MS транскрипция *gypsy* может быть ослаблена по сравнению с гибридами N за счет других альтернативных источников антисмысловых РНК, которые существуют помимо локуса *flamenco* (Brennecke *et al.*, 2007) и активнее работают в семенниках. При этом очевидно, что локус *flamenco* является основным.

Контрольные эксперименты по измерению уровня транскрипции *gypsy* в семенниках были выполнены на гибридах N пр. и N обр. от скрещивания *piwi*<sup>3</sup> с линией Д32, которая охарактеризована как линия с фенотипом *flamenco*<sup>+</sup>. В данных опытах различия в экспрессии *gypsy* между N<sub>пр.</sub> и N<sub>обр.</sub> не обнаружены (результаты не представлены). Полученные результаты являются подтверждением того, что ген *piwi* в линиях SS и MS находится в функциональном состоянии.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Основной целью данной работы являлась экспериментальная проверка линий MS и SS на наличие мутаций в гене *piwi*, продукт которого принимает непосредственное участие в процессинге длинного РНК-предшественника до

коротких piRNA, необходимых для посттранскрипционной регуляции ретротранспозонов. В результате скрещивания мух линий MS и SS с генотипом *flamenco* с мухами линии *piwi*<sup>3</sup> и последующего анализа уровня РНК *gypsy* у гибридного потомства было обнаружено, что мутации в гене *piwi* в тестируемых линиях нет. Уровень экспрессии *gypsy* у гибридов не превысил значений у родительских форм почти во всех исследованных нами тканях (кроме семенников прямого скрещивания). Также в пользу отсутствия мутации в гене *piwi* в наших линиях свидетельствуют данные о расщеплении в потомстве индивидуальных скрещиваний SS и *piwi*<sup>3</sup> на фенотипические классы N и Су в соотношении 1 : 1 и тот факт, что у всех гибридов яичники имели нормальную морфологию. Тем не менее линии SS и MS можно рассматривать как хорошую модельную систему для изучения фундаментального процесса РНК-интерференции, в особенности вопроса происхождения эндогенных антисмысловых РНК. Следует отметить, что эта проблема изучена недостаточно, поскольку охарактеризованы не все факторы, участвующие в процессинге РНК-предшественника.

Следующий факт, на который стоит обратить внимание, это отсутствие в наших экспери-

ментах материнского эффекта генов *flamenco* и *piwi*. Наличие материнского эффекта для гена *flamenco* было обнаружено с момента его описания. Было показано, что активные транспозиции *gypsy* происходят у потомков, полученных от гомозиготных мутантных самок, даже в том случае, когда они наследуют нормальный аллель *flamenco* от отца (Pélisson *et al.*, 1994). По аналогии в наших экспериментах мы могли бы детектировать высокий уровень транскрипции у потомства, полученного от гомозиготных по *flamenco* самок (рис. 1). В результате оказалось, что у самок N уровень транскрипции был одинаково низким независимо от статуса *flamenco* у самок-родителей (рис. 2, а, б). Однако следует учитывать, что в наших экспериментах «нормальные» по *flamenco* самки были мутантными по *piwi*. Таким образом, самки-родители в прямом и обратном скрещивании имели одинаковый фенотип – повышенный уровень экспрессии *gypsy*, и материнский эффект нивелировался.

Детекция транспозиционных событий – относительно трудоемкая процедура, осложняющая генетический анализ. Один из таких способов – Ovo<sup>D</sup> тест, предполагающий анализ инсерций в «горячую точку» транспозиций *gypsy in vivo* – в ген Ovo<sup>D</sup> (Prud'homme *et al.*, 1995). Однако он трудоемок, и его не всегда можно применять в полном объеме, так как не всегда удастся создать необходимые комбинации генов (результат зависит от дизайна эксперимента и направления скрещивания), кроме того, он позволяет только зарегистрировать транспозицию МГЭ, но не позволяет изучать молекулярные механизмы ее контроля. Вот почему новый подход, базирующийся на анализе экспрессии *gypsy* в семенниках гибридов, может быть успешно применен для решения вопроса о том, какие же на самом деле механизмы контроля *gypsy* нарушены в линиях MS и SS.

Следует также отметить, что локус *flamenco* имеет высокую степень гетерогенности в своей структуре. В разных линиях и природных популяциях могут существовать разные аллели этого гена. Причина фенотипа *flamenco*<sup>-</sup> в каждом случае может быть разной. Функционально аллели *flamenco* также могут различаться по их тканеспецифичному контролю ретротранспозонов. Чаще обсуждается контроль ретротранспозонов со стороны этого гена в яичниках

(Pélisson *et al.*, 1994; Mevel-Ninio *et al.*, 2007). Наши результаты показывают, что такие же процессы происходят и в семенниках. В литературе также имеются сведения об участии РНК-интерференции, в частности гена *piwi*, в контроле ретротранспозонов в мужских половых тканях (Kalmykova *et al.*, 2005).

В настоящее время РНК-интерференция и процессы, ею регулируемые, интенсивно изучаются. Идентифицируются новые гены, отвечающие за контроль МГЭ с помощью посттранскрипционного сайленсинга (Handler *et al.*, 2011; Anand, Kai, 2012). Расширяются представления о роли piRNA-пути в регуляции не только активности транспозонов, но и структуры хроматина, фундаментальных процессов, обеспечивающих целостность генома (Mani, Juliano, 2013). По этой причине наши линии можно эффективно использовать для дальнейших исследований генетических механизмов контроля не только ретротранспозона *gypsy*, но и других родственных ему МГЭ.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 11-04-00403-а).

## ЛИТЕРАТУРА

- Anand A., Kai T. The tudor domain protein kumo is required to assemble the nuage and to generate germline piRNAs in *Drosophila* // EMBO J. 2012. V. 31. No. 4. P. 870–882.
- Brennecke J., Aravin A.A., Stark A. *et al.* Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila* // Cell. 2007. V. 128. No. 6. P. 1089–1103.
- Cox D.N., Chao A., Baker J. *et al.* Novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal // Genes Dev. 1998. V. 12. No. 23. P. 3715–3727.
- Cox D.N., Chao A., Lin H. *Piwi* encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells // Development. 2000. V. 127. No. 3. P. 503–514.
- Desset S., Meignin C., Dastugue B., Vaury C. COM, a heterochromatic locus governing the control of independent endogenous retroviruses from *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2003. V. 164. No. 2. P. 501–509.
- Handler D., Olivieri D., Novatchkova M. *et al.* A systematic analysis of *Drosophila* TUDOR domain-containing proteins identifies Vreteno and the Tdrd12 family as essential primary piRNA pathway factors // EMBO J. 2011. V. 30. No. 19. P. 3977–3993.
- Kalmykova A.I., Klenov M.S., Gvozdev V.A. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the

- Drosophila* male germline // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. No. 6. P. 2052–2059.
- Kim A., Terzian C., Santamaria P. *et al.* Retroviruses in invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994a. V. 91. No. 4. P. 1285–1289.
- Kim A.I., Lyubomirskaya N.V., Belyaeva E.S. *et al.* The introduction of a transpositionally active copy of retrotransposon *gypsy* into the Stable Strain of *Drosophila melanogaster* causes genetic instability // Mol. Gen. Genet. 1994b. V. 242. No. 4. P. 472–477.
- Leblanc P., Desset S., Giorgi F. *et al.* Life cycle of an endogenous retrovirus, ZAM, in *Drosophila melanogaster* // J. Virol. 2000. V. 22. P. 10658–10669.
- Lee Y.S., Nakahara K., Pham J.W. *et al.* Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways // Cell. 2004. V. 117. P. 69–81.
- Lin H., Spradling A.C. A novel group of *pumilio* mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary // Development. 1997. V. 124. No. 12. P. 2463–2476.
- Lu J., Clark A.G. Population dynamics of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) and their targets in *Drosophila* // Genome Res. 2010. V. 20. No. 2. P. 212–227.
- Malone C.D., Brennecke J., Dus M. *et al.* Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary // Cell. 2009. V. 137. No. 3. P. 522–535.
- Mani S.R., Juliano C.E. Untangling the web: The diverse functions of the PIWI/piRNA pathway // Mol. Reprod. Dev. 2013. DOI 10.1002/mrd.22195.
- Megosh H.B., Cox D.N., Campbell C., Lin H. The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination // Curr. Biol. 2006. V. 16. No. 19. P. 1884–1894.
- Mevel-Ninio M., Pelisson A., Kinder J. *et al.* The *flamenco* locus controls the *gypsy* and ZAM retroviruses and is required for *Drosophila* oogenesis // Genetics. 2007. V. 175. No. 4. P. 1615–1624.
- Péligsson A., Sarot E., Payen-Groschne G., Bucheton A. A novel repeat-associated small interfering RNA-mediated silencing pathway downregulates complementary sense *gypsy* transcripts in somatic cells of the *Drosophila* ovary // J. Virol. 2007. V. 81. No. 4. P. 1951–1960.
- Péligsson A., Song S.U., Prud'homme N. *et al.* *Gypsy* transposition correlates with the production of a retroviral envelope-like protein under the tissue-specific control of the *Drosophila flamenco* gene // EMBO J. 1994. V. 13. No. 18. P. 4401–4411.
- Prud'homme N., Gans M., Masson M. *et al.* *Flamenco*, a gene controlling the *gypsy* retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1995. V. 139. No. 2. P. 697–711.
- Robert V., Prud'homme N., Kim A. *et al.* Characterization of the *flamenco* region of the *Drosophila melanogaster* genome // Genetics. 2001. V. 158. No. 2. P. 701–713.
- Sarot E., Payen-Groschne G., Bucheton A., Péligsson A. Evidence for a *piwi*-dependent RNA silencing of the *gypsy* endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster flamenco* gene // Genetics. 2004. V. 166. No. 3. P. 1313–1321.

## GENETIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF COMPLEMENTATION OF THE *FLAMENCO* AND *PIWI* LOCI IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

F.A. Urusov, L.N. Nefedova, A.R. Lavrenov, N.I. Romanova, A.I. Kim

M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Genetics, Moscow, Russia,  
e-mail: aikim57@mail.ru

It is believed that the heterochromatic locus *flamenco*, controlling transposition of retrotransposon/retrovirus *gypsy* in *Drosophila melanogaster*, is a source of Piwi-interacting RNA. Piwi is the primary component of the RNA interference machinery. Mutations in *piwi* and *flamenco* have the same phenotype – an enhanced transcription and frequency of transposition of the retrotransposon/retrovirus *gypsy*. This paper discusses the results of the complementation test, which involves crossing strains MS and SS, mutant for the *flamenco* locus, with the *piwi* strain<sup>3</sup>, heterozygous for a mutation in the *piwi* gene, followed by study of the transcription level of *gypsy* in the ovaries and testes of hybrids derived from these crosses. Genetic (hybridological) and molecular analysis of the interaction of the *flamenco* and *piwi* loci has been conducted. It has been revealed that transcription of *gypsy* is differently regulated in testis and ovaries of strains SS and MS, apparently owing to the different activity of piRNA clusters in these tissues. It has been also shown that the *piwi* and *flamenco* genes interact complementarily in testis tissue.

**Key words:** *Drosophila melanogaster*, *flamenco*, *piwi*, molecular analysis.