

ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ.В.А.ЭНГЕЛЬГАРДТА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

КРЕТОВА Ольга Валерьевна

**АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИИ СУФФИКСА -
КОРОТКОГО РЕТРОЭЛЕМЕНТА ИЗ ГЕНОМА
*D.MELANOGASTER***

Специальность 03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



МОСКВА – 2006

Работа выполнена в лаборатории организации генома Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Н.А.Чуриков

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Д.А.Крамеров (Институт молекулярной биологии РАН)

кандидат биологических наук
А.И.Калмыкова (Институт молекулярной генетики РАН)

Ведущая организация : Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН

Защита диссертации состоится "24" октября 2006 г. в 12⁰⁰ на заседании
Диссертационного совета Д 002.235.01 при Институте молекулярной биологии
им.В.А.Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул.Вавилова, 32

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной
биологии им.В.А.Энгельгардта РАН

Автореферат разослан "22" 09 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Кандидат химических наук


А.М.Крицын

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Существует две точки зрения на роль мобильных элементов в геномах эукариот. Одна из них предполагает, что они являются геномными паразитами и клетка вынуждена защищаться от них и их нежелательной экспрессии. Согласно другой, мобильные элементы приносят в геном повторяющиеся последовательности, необходимые для образования гетерохроматиновых областей, а также различные регуляторные последовательности, находящиеся в их составе, такие как промоторы, инсуляторы и другие, которые клетка использует для регуляции своих генов. Обе точки зрения подкреплены фактами. С одной стороны, накопление мобильных элементов может причинить вред хозяйской клетке, а с другой стороны они могут использоваться клеткой для регуляции работы генов и служить материалом и фактором эволюции.

В геноме дрозофилы обнаружено более десяти семейств LINE и только один короткий ретроэлемент (SINE) – *суффикс*. Поэтому исследование свойств *суффикса*, в частности, его транскрипции и возможного происхождения, представляет большой интерес. Ранее по поводу происхождения коротких ретроэлементов в разных геномах было высказано два предположения. Согласно первому из них, ДНК-интермедиаты обратной транскрипции LTR-содержащих ретроэлементов, использующих в качестве праймера тРНК, были внедрены в 3' концевые области LINE (Ohshima et al., 1996). Вторая гипотеза, подкрепленная некоторыми экспериментальными данными, предполагает, что при обратной транскрипции РНК LINE обратная транскриптаза “перепрыгивает” на тРНК или на 5S РНК матрицы (Szafranski et al, 2004). Но полной ясности в этом вопросе пока нет.

Транскрипция мобильных элементов часто осуществляется в двух противоположных направлениях – или из-за присутствия внутренних смысловых и антисмысловых промоторов, как в случае с F-элементом (Minchiotti and Di Nocera, 1991), или в результате инсерции мобильного элемента в различных ориентациях так, что его транскрипция попадает под контроль какого-то внешнего промотора.

Тем самым появляется возможность образования дсРНК и, следовательно, запуска РНК-интерференции.

Сама РНК-интерференция, регулирующая экспрессию многих генов, тоже может регулироваться, что впервые обнаружено в ходе настоящей работы. Недавно обнаружено, что паттерн экспрессии miРНК меняется как в развитии, так и во время физиологических процессов (He and Hannon, 2004). Это согласуется с нашими данными о регуляции РНК-интерференции. В пользу возможности регуляции РНК-интерференции также свидетельствуют недавние данные о ее ингибировании в растениях (Baulcombe and Molnar, 2004). Данные о регуляции РНК-интерференции в животных клетках важны как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения, так как в настоящее время активно ведутся исследования по использованию РНК-интерференции в генотерапии различных болезней человека.

Цель и задачи исследования

F-элемент и *суффикс* – первый известный пример родства LINE/SINE (Tchurikov et al, 1986; Di Nocera and Casari, 1987), 3' область F-элемента соответствует короткому ретроэлементу *суффиксу*. Позже были описаны многочисленные примеры пар LINE/SINE в разных геномах (Okada N. Et al, 1997).

Целью настоящей работы было изучение на разных стадиях развития транскрипции короткого ретроэлемента - *суффикса* – из генома *Drosophila melanogaster*. Были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ транскриптов с обеих цепей *суффикса* на разных стадиях развития дрозофилы и сравнить их с соответствующими паттернами транскрипции F-элемента.

2. Выяснить, имеет ли F-элемент 3'-концевой промотор, с которого мог бы исходно транскрибироваться *суффикс*.

Научная новизна и практическая ценность работы

Обнаружены смысловые и антисмысловые транскрипты *суффикса* и F-элемента на всех стадиях развития дрозофилы. Впервые обнаружено, что РНК-интерференция регулируется в развитии. Обнаружен промотор РНК-полимеразы II на 3'-конце F-элемента, по силе сопоставимый с промотором LTR-содержащего ретроэлемента дрозофилы *burdock*. Впервые показано, что короткие ретроэлементы

(SINE) могут происходить из родственных им длинных элементов (LINE) путем транскрипции их 3'-концевых областей с помощью РНК полимеразы II с внутренних промоторов.

Обнаружено, что *суффикс*-специфическая РНК-интерференция сопровождается деградацией 3'-концевой области мРНК F-элемента, соответствующей *суффиксу* и содержащей последний домен обратной транскриптазы, стоп-кодон, сигнал и сайт полиаденилирования. Таким образом, SINE-специфическая РНК-интерференция приводит к сайленсингу родственного LINE. Известно, что мРНК нередко содержат последовательности SINE в 5'- и 3'-некодирующих областях. На основании этих фактов предложена модель концертной регуляции генов. Согласно данной модели в результате SINE-специфической РНК-интерференции может одновременно выключаться экспрессия разных генов.

Данные о регуляции РНК-интерференции свидетельствуют о том, что при наличии дцРНК не всегда следует ожидать безусловного сайленсинга соответствующих генов. Это необходимо учитывать при использовании РНК-интерференции для целей генной терапии, направленной на сайленсинг генов, вовлеченных в развитие той или иной патологии.

Апробация диссертации

Данные, представленные в работе, докладывались на симпозиуме "Molecular Evolution" (Сорренто, 13-16 июня, 2002), на XIX International Congress of Genetics (Мельбурн, Австралия, 6-11 июля, 2003), на рабочих совещаниях CRDF: "Design of DNA constructs for silencing of HIV-1 genes" (Москва, 16 августа, 2004) и "Use of RNA Interference for Development of Efficient AIDS Therapies" (Москва, 15 ноября, 2004), а также были представлены на 7-ой международной энгельгардтовской конференции по молекулярной биологии (Суздаль, Россия, 28 ноября – 2 декабря, 2004).

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 80 страницах, содержит 20 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения и выводов. Список литературы цитирует 169 работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Паттерны транскрипции *суффикса* и F-элемента различны

Транскрипты с обеих цепей *суффикса* и F-элемента анализировали методом Нозерн-гибридизации на препаратах РНК, полученных на разных стадиях развития дрозофилы, и *in situ* гибридизации на препаратах семенников и яичников. Ниже представлены результаты гибридизации пары идентичных блот последовательно с 32 P-мечеными РНК-зондами, соответствующими смысловым и антисмысловым цепям *суффикса* и F-элемента (рис. 2).

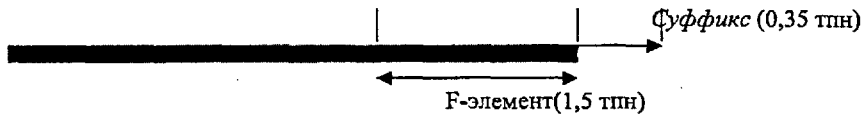


Рис.1. Области F-элемента, клонированные в составе pGEM-векторов для синтеза 32 P-меченых РНК-зондов

Зонды синтезировали с помощью РНК-полимеразы Т7 на субклонированных в pGEM-векторах соседствующих областей F-элемента, содержащих область *суффикса* или рядом расположенную 1,5 тпн область F-элемента (рис.1). Гибридизацию и отмывку проводили в жестких условиях. В предварительных экспериментах было выяснено, что в данных условиях сигнал от дивергированных копий *суффикса* (например, в Дос-элементе) не замечается.

Сначала проводили гибридизацию с *суффикс*-мечеными пробами (смысловыми и антисмысловыми, рис.2, левая половина).

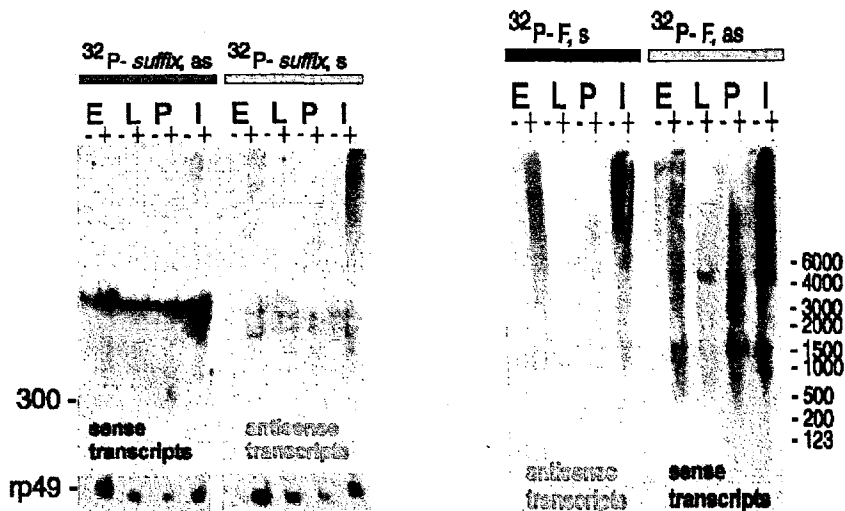


Рис.2. Гибридизация с ^{32}P -мечеными суффикс-специфическими и F-элемент-специфическими РНК-пробами. Количества РНК на дорожках оценены с помощью гибридизации с gr49 -зондом. s-смысловая РНК, as – антисмысловая РНК. Препараты поли(A)⁻ и поли(A)⁺РНК ("-" и "+" – на старте дорожек) выделяли из эмбрионов, личинок, куколок и имаго (E, L, P, I, соответственно). Указан транскрипт длиной около 300 н. Справа нанесены позиции РНК-маркеров ("Regulab") в нуклеотидах.

Суффикс-специфическая антисмысловая РНК-проба (asРНК) выявляет яркую полосу длиной около 3000 нуклеотидов как в поли(A)⁺, так и в поли(A)⁻ препаратах РНК, полученных на разных стадиях развития дрозофилы. Суффикс-специфическая смысловая РНК-проба (sРНК) выявляет в основном полиаденилированные транскрипты, что, видимо, отражает наличие суффикса в некоторых генах и(или) синтез антисмысловых транскриптов F-элемента.

Те же блоты гибридизовали повторно. Перед этим меченую РНК после первой гибридизации полностью удаляли (кипячением в 0,05% SDS), что контролировали с помощью радиоавтографии. Вторую гибридизацию проводили в прежних условиях, но с пробами, соответствующими F-элементу. Результаты гибридизации приведены на рис.2 (правая половина).

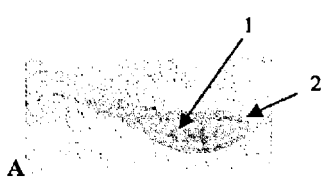
При сравнении результатов гибридизаций с суффикс- и F-специфическими asРНК-пробами хорошо видно, насколько различны паттерны гибридизации последовательностей, расположенных в соседствующих фрагментах F-элемента.

Одно яркое отличие заключается в том, что смысловые транскрипты F-элемента в основном полиаденилированы. Другое отличие состоит в том, что только слабая полоса длиной около 4700 пн, заметная на оригинальных радиоавтографах и соответствующая полноразмерной мРНК F-элемента, обнаруживается суффикс-специфической ^{32}P -меченой асРНК. Эта полоса является самой яркой на блоте, гибридизованной с F-специфической асРНК (рис.2).

Заметно различаются и паттерны гибридизаций смысловых суффикс- и F-элемент-специфических РНК-проб, детектирующих антисмысловые транскрипты.

Паттерны экспрессии обоих элементов также анализировали методом гибридизации *in situ* на препаратах герминативных органов дрозофилы. Для этого яичники и семенники, полученные из взрослых мух той же линии, что использовалась для анализа транскрипции методом Нозерн-гибридизации, гибридизовали с DIG-мечеными смысловыми и антисмысловыми суффикс- и F-элемент специфическими РНК-пробами – теми же последовательностями, что были взяты в качестве зондов для Нозерн-гибридизации (рис.1).

Яичники



Семенники

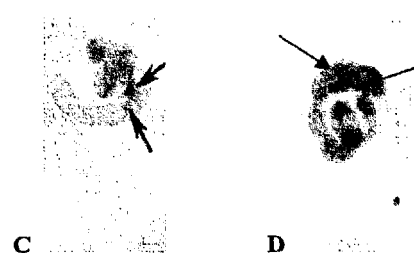
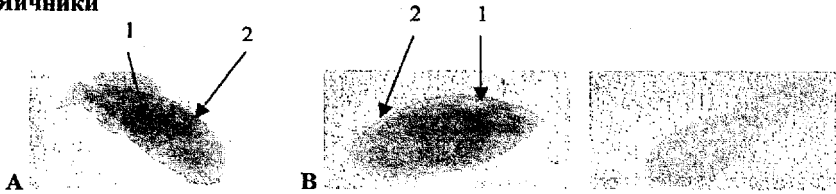


Рис.3. F-элемент-содержащие транскрипты в яичниках и семенниках. А,С и В, D – гибридизация с антисмысловой и смысловой F-элемент специфической РНК-пробой, соответственно. 1 – соответственно. 1 – локализация транскриптов в цитоплазме пита-

ющих клеток; 2 – транскрипция в соматических фолликулярных клетках, покрывающих ооцит. С и D – стрелками показана локализация транскриптов в цистах, образованных первичными сперматоцитами.

Яичники



Семенники

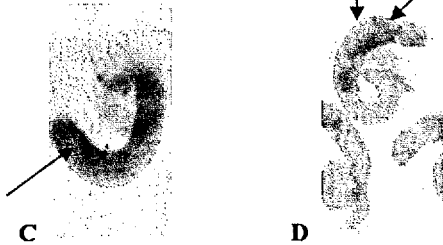


Рис.4. Суффикс-содержащие транскрипты в яичниках и семенниках. А,С и В,Д – гибридизация с антисмысловой и смысловой суффикс-специфической РНК-пробой, соответственно. Обозначения такие же, как на рис.3.

При анализе *in situ* гибридизаций (рис. 3 и 4) видно, что смысловые и антисмысловые транскрипты каждого элемента в герминативных органах мух имеют сходную локализацию: в яичниках они обнаруживаются в цитоплазме питающих клеток (nurse cells) и в соматических фолликулярных клетках; в семенниках видны в виде цист, образованных первичными сперматоцитами, в апикальной части семенников, содержащей стволовые герминативные клетки, они отсутствуют. Если сравнивать между собой *in situ* паттерны как смысловых, так и антисмысловых транскриптов суффикса и F-элемента в яичниках, то можно заметить некоторые различия, хотя и не так ярко выраженные, как в случае Нозерн-гибридизации. Видно, что обе цепи суффикса активнее экспрессируются в цитоплазме питающих клеток, чем в соматических фолликулярных клетках, а обе цепи F-элемента – наоборот (части А и В рис. 3 и 4).

2. Обнаружен короткий транскрипт суффикса в куколках

На рис. 2. виден короткий поли(А)+ смысловой транскрипт суффикса длиной около 300 н. Он соответствует ожидаемой длине полноразмерной РНК, синтезируемой на транскрипционно активной копии суффикса, и обнаруживается только в куколках. Интересно, что он обнаружен только в одной из нескольких

лабораторных линий, исследованных нами. На рис. 7 (см. ниже) 300 н транскрипт (как в поли(А)⁺, так и в поли(А)⁻ препаратах РНК) виден еще в мухах, и в культуре клеток Schneider 2.

3. Обе цепи *суффикса* и F-элемента транскрибируются

На рис. 2. видно, что гибридизуются обе *суффикс*-специфические ³²P-РНК-пробы. Это свидетельствует о том, что на всех стадиях развития дрозофилы присутствуют смысловые и антисмысловые *суффикс*-специфические РНК.

Гибридизация *in situ* с DIG-мечеными *суффикс*- и F-элемент-специфическими РНК-пробами подтверждает данные, полученные с помощью Нозерн-анализа — смысловые и антисмысловые транскрипты этих элементов распределены сходно (рис. 3 и 4).

4. *Суффикс*-специфические siРНК обнаружены только в куколках

Таким образом, в клетке могут образовываться дцРНК, способные запускать механизм специфической деградации родственных последовательностей с помощью РНК-интерференции. Для проверки возможности запуска РНК-интерференции мы провели поиск продуктов РНК-интерференции с помощью Нозерн-блот-гибридизации. Препараты тотальных РНК дрозофилы, соответствующие разным стадиям ее развития, фракционировали в 15% акриламидных денатурирующих гелях и переносили на фильтр HybondN+ с помощью электроблоттинга. В качестве маркеров длины использовали 25- и 14-нуклеотидные ³²P-меченые *gup-off* транскрипты, синтезированные на pGEM-1 векторе, переваренном рестриктазами SmaI или EcoRI, с помощью РНК-полимеразы T7.

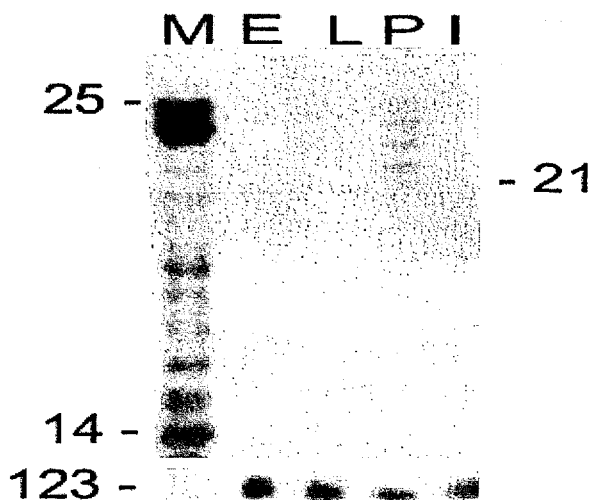


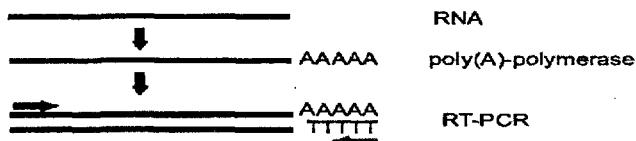
Рис. 5 Анализ миРНК. В качестве маркера (М) использовали ^{32}P -меченные 25- и 14-нуклеотидные РНК. На дорожке М представлено фракционирование смеси исходных меченых РНК с деградированной 25-нуклеотидной РНК. Указаны размеры РНК в нуклеотидах. Количество РНК на дорожках оценено с помощью гибридизации с 5,8S РНК, имеющей длину 123 нуклеотида

На рис. 5. представлены результаты блот-анализа. Гибридизацию проводили с тотальной РНК, полученной на разных стадиях развития дрозофилы. В качестве зонда использовали ^{32}P -меченую *суффикс*-специфическую антисмысловую РНК. Видно, что только на стадии куколок обнаружены siРНК (малые интерферирующие РНК) длиной 21-25 нуклеотидов, что характерно для РНК-интерференции. Причем это не связано с тем, что препарата РНК куколок было нанесено больше. Как следует из рис. 5, количества РНК, оцененные гибридизацией с 5,8S рибосомной РНК, примерно одинаковы на всех дорожках. Эти результаты были получены в экспериментах с различными препаратами тотальной РНК. Хотя sРНК и asРНК присутствуют на всех стадиях развития дрозофилы, продукты РНК-интерференции обнаружены только на одной из них – на стадии куколок.

Так как *суффикс* локализован на 3'-конце F-элемента, то можно предположить, что в результате *суффикс*-специфической РНК-интерференции в куколках могут существовать транскрипты F-элемента, лишенные 3'-концевой области.

5. Обнаружены транскрипты F-элемента без области *суффикса*

Для проверки вышеуказанного предположения был использован 3'-RACE-подход. Для клонирования 3'-концов транскриптов F-элемента, не имеющих *суффикса* и лишенных поли(А)-хвоста, поли(А)-последовательность была добавлена на 3'-конец поли(А)⁺ РНК куколок с использованием поли(А)-полимеразы из дрожжей (рис. 6, А)



В

F+suffix

GAGCACAATCAAA...AGCAAGCTTCACACGCAACCAACCTAGCGCGA..

3'cDNA-3

GAGCACAATCAAA...AGCAaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

3'cDNA-5

GAGCACAATCAAA...AGCAAGCAaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

3'cDNA-16

GAGCACAATCAAA...AGCAAGCTTCACACGCAaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa..

Рис. 6. Схематически представлена процедура 3'-RACE (А) и клоны, гибридизующиеся с F-элемент-специфической пробой (В). До многоточия приведена последовательность F-элемента, после многоточия – *суффикса*. Курсивом показан HindIII-сайт на 5'-конце *суффикса*, строчными буквами - добавленная с помощью поли(А)-полимеразы поли(А)-последовательность.

Специфический праймер для обратной транскрипции (5' GAGCACAATCAAAGATTCTGAGAACCATCA 3') соответствовал области 120 пн выше от последовательности *суффикса* в F-элементе. Клонирование ПЦР-продуктов проводили в pUC12 векторе по EcoRI-SmaI сайтам. Для colony-гибридизации в качестве зондов использовали меченые F-элемент-специфические олигонуклеотиды, соответствующие области 80 пн выше от последовательности *суффикса* в F-

элементе, и *суффикс*-специфические пробы. Отбирали клоны, гибридизующиеся только с F-элемент специфической пробой.

В результате были отобраны 3 клон, в которых отсутствует *суффикс*. Найдено, что последовательность *суффикса* отсекается в трех разных, но близкорасположенных местах в самом начале его последовательности в мРНК F-элемента (рис. 6, В).

Тот же самый подход был применен к поли(A)⁺ препаратам РНК, выделенными из эмбрионов, личинок и взрослых мух. Но в этих случаях были получены только те транскрипты F-элемента, которые содержали полную *суффикс*-последовательность и поли(A)-хвост. Эти данные заставили вернуться к результатам Нозерн-гибридизации, представленным на рис. 2. При гибридизации с антисмысловой F-специфической РНК при длительной экспозиции замечен полноразмерный смысловой транскрипт F-элемента на дорожке, содержащей поли(A)⁺ РНК куколок. Вместе с результатами 3'RACE анализа это свидетельствует о том, что РНК-интерференция запускается на стадии куколок и в результате образуются 3'-усеченные копии F-элемента.

6. Паттерн транскрипции *суффикса* изменился в ходе длительного ведения изучаемой линии дрозофилы

Линию Oregon, на которой изучали транскрипцию *суффикса* и F-элемента (Oregon 01), продолжали вести, и спустя 5 лет после получения первых паттернов экспрессии (рис. 2) снова был проведен Нозерн-блот анализ транскриптов *суффикса* в куколках и имаго. Кроме того, исследовали транскрипцию *суффикса* в культуральных клетках дрозофилы Schneider 2. На рис. 7 показаны результаты этого эксперимента. Электрофорез проводили в 6% полиакриламидном геле. После электроблоттинга блоту гибридизовали со смысловой и антисмысловой ³²P-мечеными *суффикс*-специфическими РНК-пробами. Прежде всего обращает на себя внимание полоса размером около 300 н, присутствующая теперь как в поли (A)⁺, так и в поли(A)⁻ препаратах РНК во всех исследуемых образцах – в куколках, имаго и культуре клеток, соответствующая по длине полноразмерной копии *суффикса*. Она очень яркая в смысловых транскриптах и менее выражена в антисмысловых. На Нозернах, представленных на рис. 2 (левая половина), в этой области видна “смазанная” вниз

полоса, так как гибридизация проводилась после электрофореза в агарозном геле. Тогда она была обнаружена только в полиаденилированных транскриптах и только на стадии куколок. В поли(A)⁺ препаратах РНК куколок и поли(A)⁻ мух видна

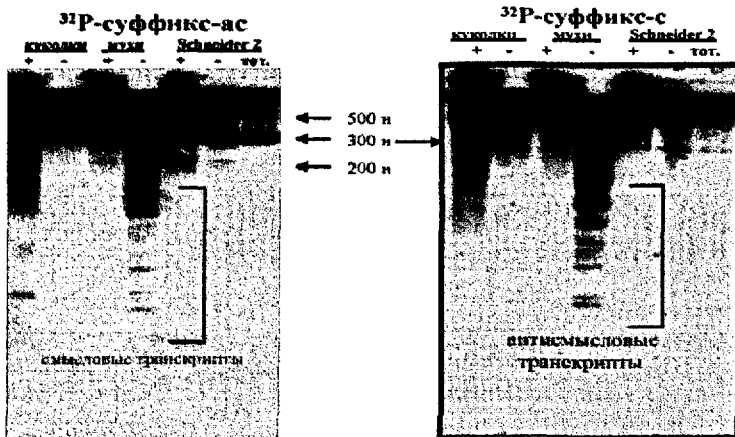


Рис. 7. Гибридизация двух идентичных половин одной 6% ПААГ-блоты с ³²P-мечеными суффикс-специфическими РНК-пробами (смысловой и антисмысловой, с и ас). Препараты поли(A)- и поли(A)⁺ РНК выделялись из куколок и мух линии Oregon 01 (обозначения “-” и “+” на старте дорожек), а также из культуры клеток дрозодилы Schneider 2 (нанесена также и тотальная РНК – тот. на старте). Показаны позиции РНК-маркеров (“Reqlab”). Красная стрелка указывает на 300 н транскрипт. Рамкой выделена “лестница” из низкомолекулярных транскриптов.

“лестница” из низкомолекулярных транскриптов (ниже 200 н) – как в смысловых, так и в антисмысловых транскриптах. Предполагается, что эти полосы соответствуют промежуточным продуктам деградации мРНК в процессе РНК-интерференции, которые, по-сравнению с данными, полученными ранее для этой же линии (рис. 5), теперь обнаруживаются и в имаго. Хотя паттерны экспрессии изменялись с течением времени, нельзя не заметить симметрию в распределении смысловых и антисмысловых транскриптов – также, как и на “старых” Нозернах.

7. F-элемент имеет 3'-концевой внутренний промотор

Для того, чтобы выяснить, имеет ли F-элемент 3'-концевой промотор, с которого мог бы исходно транскрибироваться суффикс, мы предприняли поиск промоторной

активности во фрагментах ДНК, расположенных на границе F-элемента и *суффикса*. На рис. 8 показаны фрагменты ДНК, которые были выбраны для поиска в них промоторной активности.

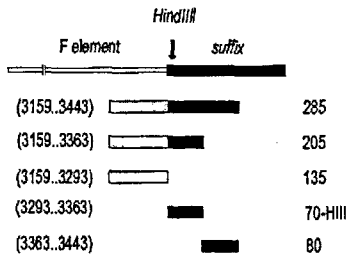


Рис. 8. Фрагменты ДНК F-элемента, выбранные для поиска промоторной активности. Стрелка показывает позицию *HindIII* сайта, расположенного в 5' концевой области *суффикса*. Слева указаны границы фрагментов ДНК согласно нумерации копии F-элемента Fw (AC#M17214). Справа приведены обозначения фрагментов (цифры указывают длины фрагментов в пн). Белые прямоугольники соответствуют областям F-элемента, а зачерненные – областям *суффикса*

Эти фрагменты клонировали в векторе, содержащем репортерный ген люциферазы.

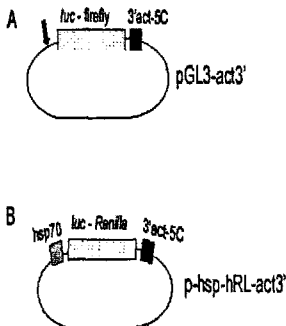


Рис. 9. Векторы, сконструированные для поиска промотора: А – вектор, содержащий ген люциферазы светлячка (Fire fly), создан на базе вектора pGL3-Enhancer (Promega), в который была вставлена область 3'-трейлера и поли(A)-сайта из гена актина 5C дрозофилы (3'act-5C) в достроенный до тупого сайт *XbaI* исходного вектора. Полученный вектор, названный pGL3-act-3', использовался для клонирования фрагментов, указанных на рис. 8. Плюс цепи фрагментов вставляли перед геном *luc* (позиции вставок указаны стрелкой) по сайтам *KpnI*-*BglIII* вектора. Для сравнительной оценки силы промоторов в одной из конструкций перед геном *luc* вставили промотор *hsp70* дрозофилы. В - вектор для контроля трансфекции, создан на базе вектора phRL-null (Promega), содержащий ген люциферазы коралла (*Renilla reniformis*). В данный вектор были вставлены промотор *hsp70* дрозофилы и область 3'act-5C. Данный вектор был назван phsp-hRL-act3'.

Данный вектор (рис. 9, А) позволяет заметить даже слабые промоторы, поскольку он практически не имеет фоновой активности люциферазы. В нем в качестве

репортерного гена использовался ген люциферазы светлячка (Fire fly). Для контроля эффективности трансфекции культуральных клеток дрозофилы Schneider 2 был сконструирован другой вектор, содержащий ген люциферазы из коралла (Renilla), находящийся под контролем промотора hsp70 дрозофилы (рис. 9, В). В оба вектора были вставлены фрагменты, содержащие сигналы и сайты полиаденилирования дрозофилы из гена act-5C. Длины волн биолуминесценции, наблюдаемой при экспрессии данных люцифераз, различаются. Поэтому в одной пробе можно количественно, с высокой чувствительностью и воспроизводимостью оценить экспрессию конструкций.

В экспериментах по котрансфекции в семи независимых экспериментах выявили минимальный промотор длиной 205 пн, расположенный на стыке F элемента и *суффикса*. Он содержит 124 пн из F элемента и 81 пн из 5' концевой области *суффикса* (рис. 8) и способен запускать экспрессию люциферазы светлячка.

Сравнительную силу данного промотора оценивали по активности неиндуцированного теплом промотора hsp70 в том же векторе. Оказалось, что выявленный промотор имеет около 3% активности промотора hsp70. Ни один из фрагментов, соответствующих только *суффиксу* или F элементу, не обладает способностью транскрибировать репортерный ген (рис. 10).

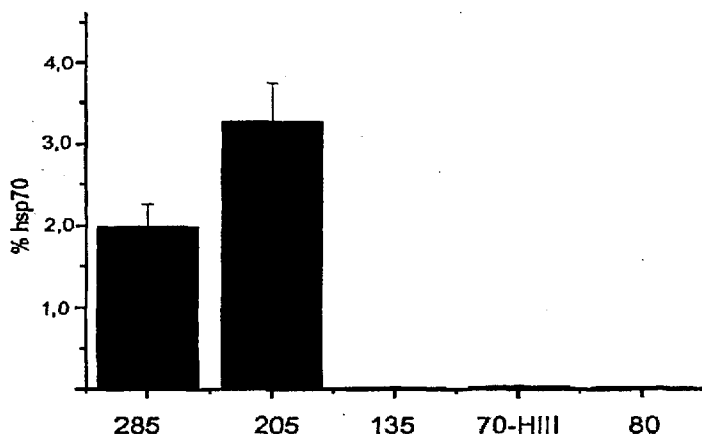


Рис. 10. Результаты экспериментов по котрансфекции. Приведены данные относительной активности в % к активности неиндуцированного промотора hsp70. Числа на оси абсцисс соответствуют фрагментам, выбранным для поиска промоторной активности (рис. 8).

Таким образом, на стыке F-элемента и *суффикса* имеется внутренний промотор, с которого может происходить синтез *суффикс*-специфических коротких транскриптов.

Так как F-элемент в данной области не имеет мотивов, характерных для промотора РНК-полимеразы III, было предположено, что с этого промотора работает РНК-полимераза II.

Известно, что промоторы РНК-полимеразы II активизируются энхансерами. Поэтому было решено проверить, усиливает ли какой-либо *цис*-действующий энхансер транскрипцию с обнаруженного нами промотора. Для этого мы вставили энхансер из LTR-содержащего ретротранспозона дрозофилы *scopia*, *enh(scopia)*, в конструкцию, содержащую минимальный 205 ппн промотор (рис. 11).

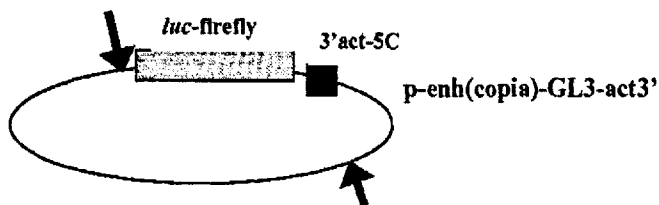


Рис. 11 Конструкции, созданные для оценки влияния энхансера из мобильного элемента *scopia* на уровень транскрипции с 3'-концевого промотора F-элемента. Стрелкой вплотную к гену *luc-firefly* показано положение тестируемого промотора (рис. 9, А). Вторая стрелка указывает на место инсерции энхансера из *scopia* – данный фрагмент был вставлен в сайт *Bam*HI вектора p-205-GL3-act3', а также векторов p-135-GL3-act3' и p-70-ННН-GL3-act3' (рис. 8).

В экспериментах по трансфекции культуры клеток дрозофилы Schneider 2 конструкциями *enh(scopia)*-205 мы обнаружили 3-кратное усиление экспрессии гена люциферазы светлячка (рис. 12).

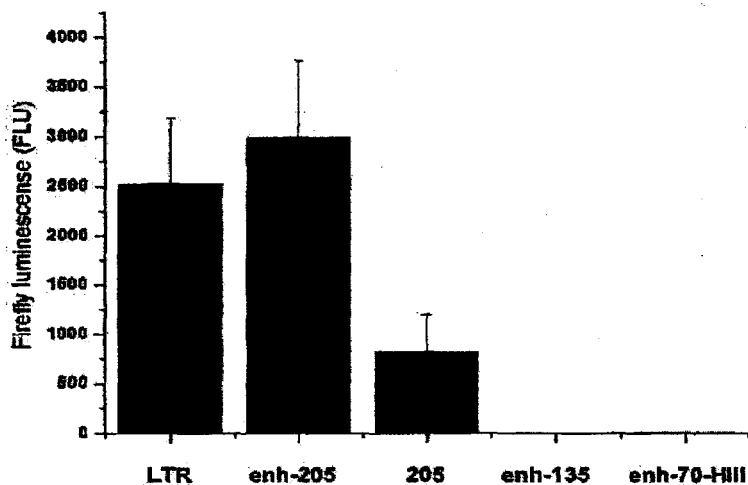


Рис. 12. Влияние энхансера из мобильного элемента *coria* на уровень транскрипции с 3'-концевого внутреннего промотора F-элемента 205 пн. Для сравнения приведены результаты экспериментов по трансфекции конструкциями, в которых действие этого же энхансера было направлено на 5'- и 3'-части промотора (соответственно, enh-135 и enh-70-НIII). Для сравнительной оценки силы 205 пн промотора использовали конструкцию с промотором из ретротранспозона *burdock* (LTR).

Уровень транскрипции с данного внутреннего 3'-концевого промотора низок, но усиленный энхансером из *coria*, он сопоставим с уровнем транскрипции промотора из LTR-ретротранспозона дрозофилы *burdock* (репейник). Конструкция, содержащая LTR *burdock*, была использована в аналогичных экспериментах для оценки силы обнаруженного нами промотора. Как и ожидалось, экспрессия гена люциферазы светлячка не была обнаружена в экспериментах по трансфекции конструкциями *enh(coria)*-135 или *enh(coria)*-70-НIII, содержащими 5' или 3' участки обнаруженного промотора. Только конструкция, содержащая минимальный (205 пн) промотор, отвечает на воздействие энхансера.

Предположение об участии РНК-полимеразы II в работе данного промотора было независимо подтверждено в экспериментах с α -аманитином (рис. 13). Видно, что при добавлении α -аманитина до концентрации 5-10 мкг/мл наблюдается существенное ингибирование синтеза транскриптов репортерного гена с минимального промотора.

Вместе с предыдущими результатами эти данные убедительно свидетельствуют о том, что F-элемент действительно обладает внутренним 3'-концевым промотором РНК-полимеразы II, и что этот промотор может обеспечивать синтез коротких транскриптов *суффикса* и, как возможное следствие, интеграцию новых его копий в геном дрозофилы.

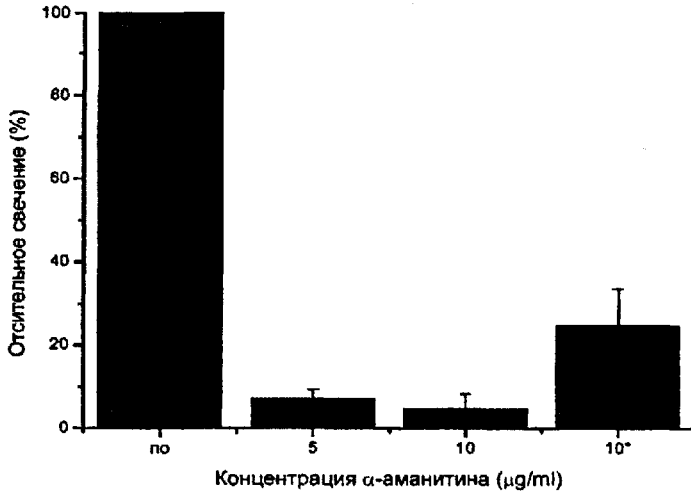


Рис. 13. Результаты эксперимента по влиянию α-аманитина на экспрессию конструкции *enh(soria)-205* в культуре клеток Schneider 2. После добавления полной среды в ходе трансфекции к клеткам был добавлен α-аманитин (водный раствор, фирмы Boehringer) до концентрации 5 мкг/мл и 10 мкг/мл. 10* означает, что α-аманитин (до концентрации 10 мкг/мл) был добавлен не сразу, а спустя 16 час инкубации при 25°C. Интенсивность свечения во всех четырех случаях измерялась через 48 час после трансфекции.

8. Старт транскрипции *суффикса* с 3'-концевого промотора в F-элементе совпадает с началом *суффикса*

Для поиска возможного старта транскрипции *суффикса* были проведены эксперименты по удлинению *суффикс*-специфического праймера на матрице поли(А)-содержащей РНК, выделенной из куколок, где ранее были обнаружены короткие транскрипты *суффикса* (рис. 2).

На рис. 14 приведены результаты такого эксперимента. Согласно этим данным, имеются основной и минорный старты транскрипции. Они находятся в пределах

обнаруженного нами внутреннего промотора. Позиция основного старта соответствует ранее описанной границе отдельных копий *суффикса* (Tchurikov et al., 1986).

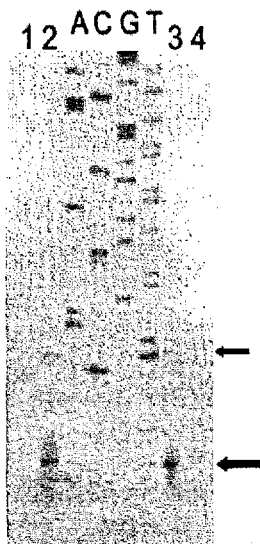


Рис. 14. Определение старта транскрипции суффикса с 3'-концевого промотора в F-элементе. Праймер.

комплементарный плюс цепи
суффикса (5'
CGTAGGTTGGTGGGGTGC
3'), метили по 5'концу
Т4-полинуклеотид-киназой,
отжигали с препаратами РНК,
выделенными из куколок, и
удлиняли в реакции с обратной
транскриптазой M-MLV
(Promega). Приведены

результаты двух
экспериментов: с препаратами
поли(А)+РНК (дорожки 2 и 3) и
поли(А)-РНК (дорожки 1 и 4,
негативный контроль). Рядом
представлен сиквенс 3'
концевой области 5'-элемента с
этого же праймера. Основной и
минорный старт-сайты указаны
стрелками. Ниже представлен
текст минимального промотора
длиной 205 пп.

Последовательность *суффикса* показаны заглавными буквами. Основной старт транскрипции находится на 11 пн выше *HindIII* сайта, соответствуя началу *суффикса*.

[illegible]

Рамки показывают два блока, напоминающие последовательности TATA - в положении -29 и -40 от основного старта транскрипции, а также тетрауклеотид CAAT - в положении -123.

Этот факт также свидетельствует о возможном происхождении *суффикса* из активной копии F-элемента, с 3' концевой внутреннего промотора последнего, обнаруженного в данной работе. Этот промотор не имеет типичных TATA и CAAT элементов, часто встречающихся перед эукариотическими стартами транскрипции в положении от -25 до -30 и от -60 до -80, соответственно.

8. Суффикс – представитель семейства SINE, а не 5'-усеченная копия F-элемента

8.1. Обратная транскриптаза F-элемента обладает высокой процессивностью

Известно, что обратная транскрипция LINE может обрываться в случайных местах, что приводит к образованию так называемых “усеченных” с 5'-конца копий (5'-truncated copies). Но частота, с которой в геноме встречаются 5'-усеченные копии, для разных не-содержащих LTR ретроэлементов (LINE) весьма различна – это связано, скорее всего, с разной процессивностью обратных транскриптаз этих элементов. Например, полноразмерными являются только треть всех копий многочисленного семейства L1 в геноме человека (Kazazian and Moran, 1998) и только половина R2-элементов из генома дрозофилы (Jakubczak et al., 1992). Что же касается R2-элемента из *B. mori*, то для него, наоборот, вообще не найдено 5'-truncated копий (Burke et al., 1999).

Для анализа процессивности обратной транскриптазы F-элемента в секвенированном геноме дрозофилы с помощью программы BLAST мы провели поиск гомологий к разным областям полноразмерного F-элемента. Были обнаружены 124 полноразмерные копии. Поиск гомологий к 3'-области, расположенной сразу выше области *суффикса* (рис. 1), выявляет 168 копий, а к самому концу F-элемента, т.е. к *суффиксу* – 180 копий. Таким образом, около 70% от общего числа копий F-элемента по результатам анализа эухроматической порции генома *D. melanogaster* являются полными. Если верно предположение, что частота 5'-усеченных копий LINE непосредственно коррелирует с процессивностью их обратной транскриптазы, то 70% полноразмерных копий от общего числа копий F-элемента свидетельствуют о довольно высокой процессивности обратной транскриптазы F-элемента.

8.2. Инсерции *суффикса* могут сопровождаться образованием дупликаций сайтов-мишеней

Ранее (Tchurikov et al., 1986) при клонировании первых пяти практически идентичных копий элемента дупликации сайта-мишени по флангам выявлены не были. Такие примеры - отсутствие дупликаций сайтов-мишеней по краям инсерций коротких ретроэлементов –известны (Kajikawa and Okada, 2002). При анализе нуклеотидных баз данных нам удалось обнаружить (рис. 15) пример инсерции *суффикса* с образованием дупликации длиной 11 пн.

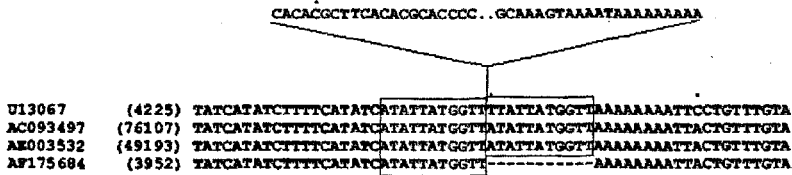


Рис. 15. Последовательность одной и той же области генома в составе разных клонированных фрагментов. Слева приведены номера обнаруженных в базах данных последовательностей. В скобках указаны номера нуклеотидов в данных фрагментах. В трех первых случаях последовательность содержит консервативную копию *суффикса* (выделена как вставка). HindIII-сайт затенен, точкой обозначена замена А на С, дубликации сайта-мишени выделены прямоугольниками. В последнем случае показана та же геномная последовательность, но без *суффикса*.

Возможно, что в геноме дрозофилы преобладают инсерции *суффикса* без дубликаций сайтов-мишеней, хотя встречаются и классические “кососрезанные” примеры.

Таким образом, обнаружение в разных линиях дрозофилы копий *суффикса*, имеющих одинаковую длину (Tchurikov et al., 1986; Кротова и др., 2002), его коротких транскриптов, внутреннего промотора на стыке F-элемента и *суффикса*, а также того, что *суффикс* более транскрипционно активен, чем F-элемент, убедительно свидетельствуют в пользу того, что большая часть копий *суффикса* в геноме дрозофилы соответствует копиям SINE, а не “усеченным” копиям F-элемента. Тот факт, что паттерны транскриптов *суффикса* и F-элемента отличны друг от друга, также подтверждает эту точку зрения, свидетельствуя о транскрипционной самостоятельности *суффикса*.

9. Суффикс участвует в РНК-интерференции

При анализе результатов Нозерн-гибридизации виден сложный паттерн довольно длинных транскриптов, как смысловых, так и антисмысловых, соответствующих *суффиксу* и F-элементу (рис. 2.). Следовательно, *суффикс* активно транскрибируется и его транскрипция регулируется в развитии. Только в куколках изучаемой нами линии удалось обнаружить короткий полиаденилированный транскрипт, который, как мы предполагаем, может являться транскриптом с мастер-копии, т.е. с

транскрипционно-активной копии элемента. Все другие *суффикс*-содержащие транскрипты длиннее. Таким образом, *суффикс* в основном транскрибируется в различных местах генома в составе более протяженных последовательностей РНК, и только незначительная часть транскриптов *суффикса* соответствует F-элементу. Как смысловые, так и антисмысловые транскрипты *суффикса* присутствуют в препаратах РНК, полученных на разных стадиях развития дрозофилы. Как следует из данных *in situ* гибридизации в герминативных тканях мух, паттерны смысловых и антисмысловых транскриптов обоих элементов практически совпадают. Эти данные не позволяют точно сказать, находятся ли смысловые и антисмысловые транскрипты элементов в клетке в одном и том же компартменте. Только в этом случае могут образоваться двухцепочечные РНК. Ответ на этот вопрос можно получить с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии, используя меченные разными флуоресцентными метками смысловые и антисмысловые РНК-пробы элементов. Обнаруженные нами *суффикс*-специфические siРНК и 3' RACE-клоны F-элемента, лишенные 3'-конца, свидетельствуют о том, что по крайней мере в некоторых клетках куколок РНК, содержащие *суффикс*, подвергаются деградации с помощью РНК-интерференции. Следовательно, в этих клетках *суффикс*-содержащие транскрипты формируют дцРНК, запускающие РНК-интерференцию. Деградация 3'-концевой области транскрипта F-элемента, точно соответствующая *суффиксу*, приводила бы к потере этим транскриптом части кодирующей области, сигнала и сайта полиаденилирования, то есть вызывала бы сайленсинг F-элемента. Таким образом, *суффикс* может играть роль в регуляции экспрессии F-элемента в некоторых тканях и органах куколок, т.е. он может служить инструментом, позволяющим клетке осуществлять сайленсинг F-элемента, в состав которого *суффикс* входит. На этом основании можно предположить, что и экспрессия других генов, содержащих *суффикс* в 5' или 3' некодирующих областях, как описано ранее (Tchurikov et al., 1982; Tchurikov et al., 1986), может регулироваться сходным образом.

10. РНК-интерференция регулируется в развитии

Как транскрипция каждой цепи *суффикса*, так и деградация этих транскриптов с помощью РНК-интерференции регулируется в развитии. Первый тип регуляции

приводит к разным транскрипционным паттернам элемента на разных стадиях развития. Второй – к характерному паттерну *суффикс*-специфических siРНК, которые обнаруживаются только на стадии куколок, несмотря на то, что смысловые и антисмысловые РНК элемента присутствуют также в эмбрионах, личинках и в имаго, причем в эмбрионах и имаго даже в больших, чем в куколках, количествах. Можно предположить, что в эмбрионах и у взрослых мух в каких-то органах и тканях существует негативная регуляция механизма РНК-интерференции с помощью неизвестных пока еще факторов. С другой стороны, смысловые и антисмысловые транскрипты на этих стадиях развития дрозофилы могут находиться или в разных клетках, или в разных компартментах одной и той же клетки и поэтому неспособны образовывать диРНК. Аргументом в пользу регуляции РНК-интерференции служит найденный на стадии куколок короткий полиаденилированный транскрипт *суффикса*. Он обнаруживается, хотя в куколках имеются продукты РНК-интерференции - *суффикс*-специфические siРНК, свидетельствующие о протекании РНК-интерференции. То же касается и других транскриптов *суффикса*, наблюдаемых на рис. 2. Можно предположить, что существуют некие факторы, которые защищают РНК-мишень от деградации, направляемой комплементарной siРНК посредством РНК-интерференции. В результате некоторые транскрипты-мишени выживают. Однако не исключено, что активно транскрибируемая “source copy” и *суффикс*-специфические siРНК находятся в разных клетках или разных компартментах одной клетки.

11. Модель концертной регуляции работы генов с помощью SINE

Возможно, что обнаруженные нами продукты *суффикс*-специфической РНК-интерференции – siРНК и транскрипты F-элемента, лишенные области *суффикса*, - есть результат защиты клетки от РНК-ретроэлементов.

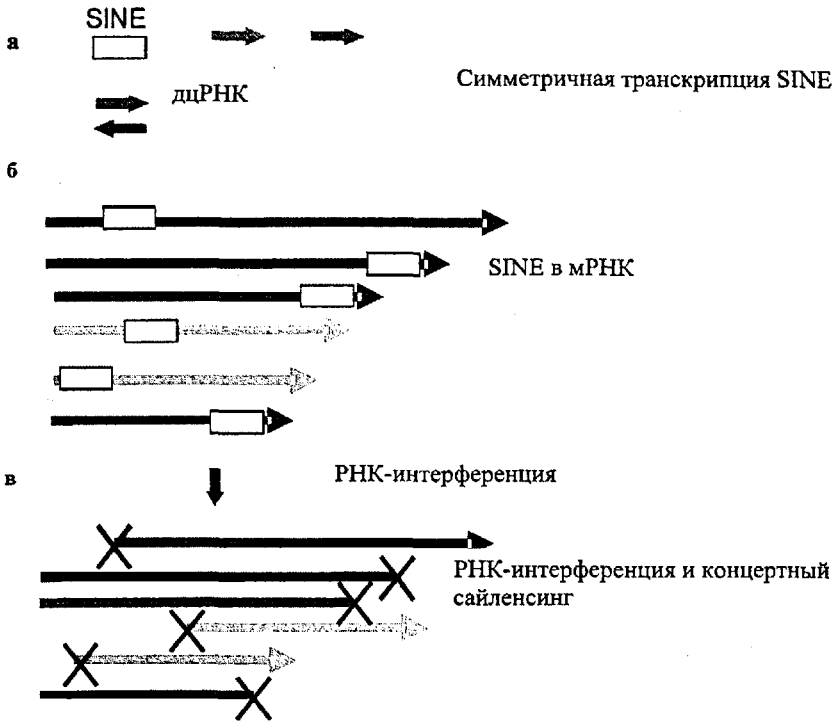


Рис. 16. Схема, иллюстрирующая концертную регуляцию экспрессии генов, содержащих в 5'- или 3'-некодирующих областях последовательность одного и того же SINE. *а* – транскрипты обеих цепей SINE могут образовывать дцРНК, запускающую РНК-интерференцию; *б* – последовательности SINE в разных мРНК являются мишенями РНК-интерференции. *в* – в результате РНК-интерференции последовательности мРНК теряют функционально важные области и способность транслироваться, что приводит к одновременному сайленсингу всех генов, помеченных данным SINE.

Аналогично можно предположить, что наличие коротких ретроэлементов в 3' некодирующих областях различных мРНК, что было показано для Alu-последовательностей из генома человека (Rubin et al., 1980), дает возможность клетке одновременно выключать определенные группы генов с помощью SINE-специфической РНК-интерференции (рис. 16). В этом случае SINE не должны рассматриваться как эгоистический компонент генома, но как биологически значимый, используемый на уровне РНК в качестве инструмента РНК-интерференции.

12. Гипотеза о происхождении SINE с помощью РНК полимеразы II, стартовой с внутреннего промотора на 3' конце LINE

Для объяснения происхождения тРНК-гомологических SINE из 3' концевых областей LINE были предложены две гипотезы. По одной из них тРНК-гомологичный участок, содержащий промотор РНК-полимеразы III и происходящий из промежуточной стадии обратной транскрипции ретровирусов или LTR-содержащих ретротранспозонов (strong-stop ДНК-продукт), каким-то образом интегрирует в область 3' конца LINE (Ohshima et al., 1996).

Другая гипотеза предполагает, что последовательности тРНК или малой рРНК, также содержащей промотор РНК-полимеразы III, могли появиться в результате того, что обратная транскриптаза, синтезировав некую часть кДНК на матрице РНК LINE, затем "перепрыгнула" на другой транскрипт, синтезированный РНК полимеразой III – на тРНК или малую рРНК (Szafranski, 2004).

Полученные нами данные позволяют предполагать, что может существовать и третий механизм происхождения SINE – с помощью РНК полимеразы II, стартовой с внутреннего промотора на 3' конце LINE. Известно, что транскрипты SINE, образующиеся с помощью РНК-полимеразы хозяина, внедряются в различные места его генома, используя при этом эндонуклеазу и обратную транскриптазу родственного LINE. Возможно, что транскрипция копий SINE с внутреннего промотора осуществляется не всегда, а зависит от места внедрения (Ullu et al., 1985). Поэтому лишь небольшая часть копий данного элемента – или даже одна активная копия ("копия-источник" – "source copy") может транскрибироваться и давать новые транскрипты для возможных ретропозиций. Неактивные в ретропозициях копии дивергируют, и наличие таких в разной степени измененных копий данного элемента – "ископаемых реликтов" – отражает прошлые волны его ретропозиций. (Matera et al., 1990; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome, 2001). Ранее изучение копий *суффикса*, расположенных в секвенированной хроматической части генома дрозофилы, позволило выявить около 13 волн его ретропозиций (Кретьева и др., 2002).

До сих пор имелись данные, согласно которым только РНК полимеразы III хозяина ответственна за транскрипцию активных копий SINE. Представленные в настоящей работе данные позволяют считать, что хозяйская РНК полимеразы II также может транскрибировать короткие ретроэлементы – но в этом случае матрицей служит не сама копия SINE, а активная копия родственного ему LINE, содержащая внутренний промотор в 3' концевой области. Известно, что LINE, равно как и LTR-содержащие элементы, транскрибируются РНК полимеразой II хозяина, а также содержат элементы, регулирующие ее активность. Т.е. для РНК полимеразы II и аппарата ее регуляции LINE являются “узнаваемыми” элементами генома. Наши данные свидетельствуют о том, что внутренние промоторы LINE могут располагаться и в их 3' частях. Поэтому в клетке могут появляться короткие транскрипты для возможных ретропозиций, т.е. может происходить синтез *de novo* коротких ретроэлементов. Интересно, что область обнаруженного нами внутреннего промотора F-элемента своей большей частью соответствует последовательности, кодирующей два последних консервативных домена обратной транскриптазы (Кретьева и др., 2002; Xiong, 1990). Это еще один пример функциональной пластичности ДНК.

Таким образом, F-элемент может являться первичным источником образования транскриптов *суффикса* и обеспечивать *суффикс* необходимыми для его транспозиции ферментами, а *суффикс*, в свою очередь, может вызывать сайленсинг F-элемента в куколках. Вероятно, такое сотрудничество позволяет данной паре LINE/SINE поддерживать себя в геноме, не вызывая гибель хозяина.

Выводы

1. Смысловые и бессмысловые транскрипты *суффикса* и F-элемента выявляются на всех стадиях развития дрозофилы
2. Паттерны транскрипции F-элемента и *суффикса* резко различаются. *Суффикс* экспрессируется гораздо активнее F-элемента. Основная часть транскриптов *суффикса* происходит с его отдельных (не в составе F-элемента) копий.

3. В герминативных тканях дрозофилы – семенниках и яичниках – паттерны смысловых и антисмысловых транскриптов *суффикса* совпадают. Следовательно, имеется потенциальная возможность образования 2х-цепочечных молекул РНК и запуска РНК-интерференции на всех стадиях развития дрозофилы.
4. *Суффикс*-специфические siРНК обнаружены только в куколках, несмотря на то, что смысловые и антисмысловые транскрипты *суффикса* обнаружены на всех стадиях развития. Обнаруженный паттерн *суффикс*-специфических siРНК свидетельствует о том, что РНК-интерференция регулируется в развитии.
5. На стадии куколок обнаружены транскрипты F-элемента, лишённые области *суффикса*. Предполагается, что *суффикс*-специфическая РНК-интерференция приводит к деградации области *суффикса*, содержащей часть открытой рамки считывания, сигнал и сайт полиаденилирования, и, следовательно, к сайленсингу F-элемента в некоторых тканях и органах куколок.
6. Обнаружен внутренний промотор РНК-полимеразы II в 3'-концевой области F-элемента. Транскрипция с этого промотора усиливается под действием энхансера и ингибируется α -аманинином. Предположено, что исходно короткий ретроэлемент *суффикс* мог быть образован путем транскрипции с 3'-концевого внутреннего промотора F-элемента.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Кретьова О.В., Соколова М.А., Чуриков Н.А. Анализ копий *суффикса* – короткого ретроэлемента дрозофилы – и кодируемого им белкового домена. Генетика. 2002; 38(8): с. 1090-1096.
2. Кретьова О.В., Чуриков Н.А. РНК-интерференция регулируется в развитии: анализ экспрессии *суффикса* – короткого ретроэлемента дрозофилы. Генетика. 2003; 39(2): с. 300-304.

3. Tchurikov NA, Chernov BK, Golova YB, Zhimulev IF, Zykov IA. SuUR protein binds to the boundary regions separating forum domains in *Drosophila melanogaster*. J Biol Chem. 2004; 279(12): p. 11705-10.
4. Кретьова О.В., Чуриков Н.А. О возможности происхождения короткого ретроэлемента дрозофилы – *суффикса* – от родственного длинного ретроэлемента – F-элемента. ДАН, 2005; 403(6): с. 824 – 828.
5. Tchurikov N.A., Sokolova M.A., Kretova O.V. Analysis of a short retroelement – *suffix* – and its role in evolution. Symposium on Molecular Evolution, Sorrento, Italy, June 13-16, 2002; p. 92.
6. Tchurikov N.A., Kretova O.V. RNA interference is developmentally regulated: analysis of expression of *suffix* – a short *Drosophila* retroelement. XIX Int.Congress of Genetics, Melbourne, July 4-11, 2003; p. 57.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 24.08.2006 г.

Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л. 1,75. Тираж 70 экз. Заказ 572.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к.

Тел. 939-3890, 939-3891. Тел./Факс 939-3891.

