


DOI 10.18699/vjgb-24-20

Транскрипционный фактор DREF регулирует экспрессию гена микроРНК *bantam* *Drosophila melanogaster*

М.Б. Шварц, М.М. Прудникова, О.В. Андреенков, Е.И. Волкова, И.Ф. Жимулев, О.В. Антоненко, С.А. Демаков  

Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 demakov@mcb.nsc.ru

Аннотация. Ген *bantam* кодирует жизненно важную микроРНК и имеет сложный паттерн экспрессии в различных тканях на разных стадиях развития дрозофилы. Эта микроРНК обеспечивает нормальное развитие глазных и крыловых имажинальных дисков, центральной нервной системы, а также участвует в поддержании недифференцированного состояния стволовых клеток в яичниках взрослых самок. На клеточном уровне *bantam* стимулирует пролиферацию клеток и препятствует апоптозу. Ген *bantam* является мишенью нескольких консервативных сигнальных каскадов, в частности Hippo. На сегодняшний день известно не менее 10 белков, напрямую регулирующих экспрессию этого гена в разных тканях дрозофилы. В настоящей работе мы обнаружили, что регуляторная область *bantam* содержит мотивы, характерные для сайтов связывания DREF – транскрипционного фактора, который регулирует экспрессию генов каскада Hippo. Используя трансгенные линии, содержащие полноразмерный фрагмент, спасающий летальность делеции *bantam*, и фрагмент с нарушенным сайтом связывания DREF, мы показали, что эти мотивы имеют функциональное значение, поскольку их нарушение в локусе *bantam* снижает уровень экспрессии в личинках и яичниках гомозиготных мух, что коррелирует со сниженной жизнеспособностью и фертильностью. Влияние связывания DREF с промоторной областью гена *bantam* на уровень его экспрессии предполагает дополнительный уровень сложности регуляции экспрессии этой микроРНК. Снижение количества откладываемых яиц и сокращение репродуктивного периода у самок при нарушении сайта связывания DREF в регуляторной области гена *bantam* позволяют предполагать, что через *bantam* DREF также участвует в регуляции оогенеза дрозофилы. Ключевые слова: микроРНК; генетическая регуляция; мутагенез; транскрипция; факторы транскрипции.

Для цитирования: Шварц М.Б., Прудникова М.М., Андреенков О.В., Волкова Е.И., Жимулев И.Ф., Антоненко О.В., Демаков С.А. Транскрипционный фактор DREF регулирует экспрессию гена микроРНК *bantam* *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024;28(2):131-137. DOI 10.18699/vjgb-24-20

Transcription factor DREF regulates expression of the microRNA gene *bantam* in *Drosophila melanogaster*

M.B. Schwartz, M.M. Prudnikova, O.V. Andreenkov, E.I. Volkova, I.F. Zhimulev, O.V. Antonenko, S.A. Demakov  

Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 demakov@mcb.nsc.ru

Abstract. The *bantam* gene encodes a vital microRNA and has a complex expression pattern in various tissues at different stages of *Drosophila* development. This microRNA is involved in the control of normal development of the ocular and wing imaginal discs, the central nervous system, and also in maintaining the undifferentiated state of stem cells in the ovaries of adult females. At the cellular level, *bantam* stimulates cell proliferation and prevents apoptosis. The *bantam* gene is a target of several conserved signaling cascades, in particular, Hippo. At the moment, at least ten proteins are known to directly regulate the expression of this gene in different tissues of *Drosophila*. In this study, we found that the *bantam* regulatory region contains motifs characteristic of binding sites for DREF, a transcription factor that regulates the expression of Hippo cascade genes. Using transgenic lines containing a full-length *bantam* lethality-rescuing deletion fragment and a fragment with a disrupted DREF binding site, we show that these motifs are functionally significant because their disruption at the *bantam* locus reduces expression levels in the larvae and ovaries of homozygous flies, which correlates with reduced vitality and fertility. The effect of DREF binding to the promoter region of the *bantam* gene on its expression level suggests an additional level of complexity in the regulation of expression of this microRNA. A decrease in the number of eggs laid and a shortening of the reproductive period in females when the DREF binding site in the regulatory region of the *bantam* gene is disrupted suggests that, through *bantam*, DREF is also involved in the regulation of *Drosophila* oogenesis.

Key words: microRNA; genetic regulation; mutagenesis; transcription; transcription factors.

For citation: Schwartz M.B., Prudnikova M.M., Andreenkov O.V., Volkova E.I., Zhimulev I.F., Antonenko O.V., Demakov S.A. Transcription factor DREF regulates expression of the microRNA gene *bantam* in *Drosophila melanogaster*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(2):131-137. DOI 10.18699/vjgb-24-20

Введение

Ген *bantam* кодирует жизненно важную микроРНК, которая экспрессируется во многих тканях на всем протяжении жизненного цикла дрозофилы. На клеточном уровне *bantam* стимулирует пролиферацию клеток и препятствует апоптозу (Brennecke et al., 2003). Эта микроРНК обеспечивает нормальное развитие глазных и крыловых имагинальных дисков, центральной нервной системы, а также участвует в поддержании недифференцированного состояния стволовых клеток в яичниках взрослых самок (Shcherbata et al., 2007; Peng et al., 2009; Reddy, Irvine, 2011; Slattery et al., 2013; Weng, Cohen, 2015).

Экспрессия гена *bantam* контролируется с помощью широкого набора транскрипционных факторов, формирующих ансамбли в разных тканях и на разных стадиях развития. В регуляции экспрессии гена *bantam* участвуют такие консервативные морфогены, как *Notch*, *Wingless*, *Dpp* (Herranz et al., 2008; Oh, Irvine, 2010; Ku, Sun, 2017). Нарушение регуляции *bantam* приводит к неправильному развитию многих имагинальных органов, проблемам с жизнеспособностью и фертильностью (Hipfner et al., 2002; Brennecke et al., 2003; Shcherbata et al., 2007).

Один из ключевых регуляторов экспрессии *bantam* – транскрипционный коактиватор Yorkie (Yki), который, связываясь с тканеспецифичными транскрипционными факторами, обеспечивает нужный уровень экспрессии *bantam* (Peng et al., 2009; Slattery et al., 2013; Nagata et al., 2022). Коактиватор Yki является частью высококонсервативного сигнального каскада Hippo (Oh, Irvine, 2010). У дрозофилы этот каскад подавляет процесс клеточного деления, индуцируя арест клеточного цикла и апоптоз. Каскад начинается с киназы Hippo (Hpo), которая запускает последовательное фосфорилирование ряда белков и в конечном итоге приводит к инактивации Yki (Huang et al., 2005; Reddy, Irvine, 2011). Показано, что промотор гена *hpo* содержит мотивы DRE (DREF responding element). Мотивы DRE содержат и промотор гена *warts* (*wts*) – второй ключевой киназы каскада Hippo. С этими мотивами связывается транскрипционный фактор DREF, усиливая экспрессию *hpo* и *wts* в глазных имагинальных дисках (Fujiwara et al., 2012; Vo et al., 2014). Таким образом, DREF позитивно регулирует каскад Hippo и, соответственно, снижает уровень экспрессии *bantam*.

В нашей работе мы обнаружили, что регуляторная область *bantam* содержит мотивы, характерные для сайтов связывания DREF, и проверили, к чему приводит их нарушение на уровне организма. Мы исследовали, как нарушение сайтов связывания DREF с локусом *bantam* отразилось на жизнеспособности и фертильности мух.

Материалы и методы

Получение мутации сайта связывания DREF. Для получения мутации использовали фрагмент ДНК из локуса *bantam* длиной 4709 п. н. (3L:637635-642343, release=r6.23), включающий мотивы DRE и DRE-like. Мотивы DRE и DRE-like изолировали друг от друга с помощью уникального сайта рестрикции EcoRV, расположенного между ними. Для мутирования каждого из этих мотивов проводили рестрикцию эндонуклеазой ClaI (AT|CG|AT), а затем встраивали выступающие 5'-концы с применением

фрагмента Кленова. При этом происходило встраивание двух нуклеотидов CG в ключевой части каждого мотива. Затем обе части фрагмента ДНК 4709 п. н. с мутированными мотивами DRE и DRE-like лигировали и полученный фрагмент ДНК DREF встраивали по сайтам рестрикции KpnI и NotI в вектор pUni-mod, содержащий сайт рекомбинации attB (Андреевков и др., 2016). Для получения трансгенной линии «DREF» использовали систему attP/attB специфической интеграции с линией, содержащей attP-сайт в районе 10A1-2 X-хромосомы (Андреевков и др., 2016).

Линии мух. Трансгенная линия «4.7» имела генотип $y^1, Df(1)w^{67c23}, 10A1-2-«4.7»$; *ban^{Δ1}/TM6B*. Она содержала встройку трансгена с полноразмерным фрагментом ДНК из локуса *bantam* длиной 4709 п. н. в район 10A1-2 (Schwartz et al., 2019).

Трансгенная линия «DREF» имела генотип $y^1, Df(1)w^{67c23}, 10A1-2-«DREs_mut»$; *ban^{Δ1}/TM6B* и содержала встройку трансгена с модифицированным фрагментом 4.7 в район 10A1-2. Модификация фрагмента 4.7 заключалась в мутировании потенциальных сайтов связывания белка DREF. Во всех проведенных экспериментах исследовали гомозиготы по встройке трансгена.

Линия «уи» имела генотип $y^1 Df(1)w^{67c23}$; линия «*ban+*» – $y^1, Df(1)w^{67c23}; +/TM6B$, где *TM6B* – балансерная хромосома с фенотипом *Tb* – короткое тело личинок и имаго; линия «*Δban*» – генотип $y^1, Df(1)w^{67c23}; ban^{Δ1}/TM6B$.

Линии мух содержали при +23 °C на стандартном корме с добавлением сухих дрожжей.

Иммуноокрашивание. Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание политенных хромосом выполняли согласно описанному ранее протоколу (Kolesnikova et al., 2013) мышиными моноклональными антителами к белку DREF (получены от С.М. Hart, США), разведение 1:200, с последующей окраской goat-anti-mouse-Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, # A28175), разведение 1:600.

Определение жизнеспособности мух. Для определения жизнеспособности мух трансгенных линий в одну пробирку сажали 5 самок и 5 самцов одной линии. Раз в пять дней мух переводили на свежий корм и продолжали эксперимент в течение месяца. В качестве контроля использовали мух линии «*TM6*». По результатам трех повторов за время эксперимента в каждой линии в среднем было следующее количество потомков: «4.7» – 454 ± 92 ; «DREF» – 287 ± 112 ; «*TM6*» – 756 ± 289 .

Жизнеспособность гомозигот по делеции *ban^{Δ1}* в трансгенных линиях определяли как отношение количества мух, имеющих тело нормальной длины (*Tb+*), к общему количеству вылетевших потомков. Так как фенотип *Tb* идентифицируется на стадии личинки, куколки и имаго, можно на разных стадиях развития отличить мух без балансера – гомозигот по делеции *ban^{Δ1}* – от гетерозиготных мух. Жизнеспособность мух на разных стадиях развития в трансгенных линиях сравнивали с жизнеспособностью контрольных мух с помощью критерия Стьюдента, с предварительной проверкой нормальности распределения по критерию Шапиро–Уилка.

Определение фертильности самок. Для определения фертильности самок трансгенных линий скрещивали с самцами линии «уи». В качестве контроля использовали

ли самок линии «уи». В каждом скрещивании брали по 5 самок и 5 самцов. Каждые сутки мух пересаживали на свежий корм и считали количество отложенных яиц. Эксперимент продолжался до гибели последней трансгенной самки в пробирке. Количество яиц за все время эксперимента нормировалось на количество самок. Эксперимент повторяли три раза. При построении кривой динамики фертильности количество яиц, отложенное самками каждый день, нормировалось на актуальное количество живых самок. Различия в уровне фертильности между линиями оценивали с помощью критерия Стьюдента, а также критерия χ^2 .

Определение уровня экспрессии зрелой микроРНК *bantam*. Уровень экспрессии зрелой микроРНК *bantam* определяли количественной ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции (qRT-PCR), адаптированной для исследования микроРНК за счет применения удлиненного stem-loop праймера (Chen et al., 2005; Kramer, 2011). В качестве референсного гена мы использовали мРНК *U6* (Zhang et al., 2017). Для получения кДНК брали 5 мкг тотальной РНК, а также М-MuLV-РН ревертазу и сопутствующие реактивы, согласно инструкции производителя (Biolabmix). Относительную экспрессию гена *bantam* определяли, применяя метод $\Delta\Delta Ct$. Реакцию обратной транскрипции проводили на амплификаторе BioRad C-1000 (США).

Эксперимент был сделан в двух биологических повторях. При этом использовали 30 мкл следующих реакционных смесей: для детекции *bantam* – по 3 мкл 5 мкМ праймеров *ban-F* и *ban-R*, 3 мкл 2.5 мкМ зонда TaqMan-*ban*, 3 мкл 10xAS буфера, 3 мкл 4 мкМ dNTP, 1 ед. активности Taq-полимеразы; для детекции *U6* – по 3 мкл 10 мкМ праймеров *U6-F* и *U6-R*, 3 мкл 2.5 мкМ зонда TaqMan

U6, 3 мкл 10xAS буфер, 3 мкл 4 мкМ dNTP, 1 ед. активности Taq-полимеразы, 3 мкл 10 мМ $MgCl_2$ до конечной концентрации Mg^{2+} 2.5 мМ на реакцию. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованных в экспериментах, даны в 5'→3' ориентации: *ban-SL* – gt cgtaccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatcgcagacaatcag, *ban-F* – gcgccgggatgagatcattttg, *ban-R* – cagtgcagggtccgaggt, TaqMan-*ban* – cgcactggatcgcagacaatcagcttt, *U6-SL* – gtcgta tccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatcgcagcgccatgc, *U6-F* – gccgcatacagagaagatta, *U6-R* – agtgcagggtccgaggt, TaqMan-*U6* – ttcgcactggatcgcagcgccatgc.

Результаты и обсуждение

В регуляторной области *bantam* расположены сайты связывания DREF

Для исследования роли DREF в регуляции экспрессии гена *bantam* мы использовали линии трансгенных мух. Линия мух «4.7» содержала вставку трансгена с фрагментом ДНК длиной 4709 п.н. из локуса *bantam* (рис. 1, а) в район 10A1-2 X-хромосомы. Этот фрагмент, далее обозначенный как фрагмент 4.7 (см. рис. 1, б), содержит последовательность, кодирующую «шпильку» микроРНК *bantam*, а также два предполагаемых промотора гена *bantam* (Brennecke et al., 2003; Qian et al., 2011). Ранее было показано, что фрагмент 4.7 спасает летальную делецию *ban^{Δ1}*, удаляющую около 21 т.п.н. из локуса *bantam* (Schwartz et al., 2019). В составе фрагмента 4.7, в 1.2 т.п.н. выше «шпильки» *bantam* мы обнаружили мотивы TATCGATA и TATCGATG, соответствующие DRE и DRE-like элементам соответственно (Ohler et al., 2002). Оба мотива характерны для сайтов связывания транскрипционного фактора DREF (см. рис. 1, в).

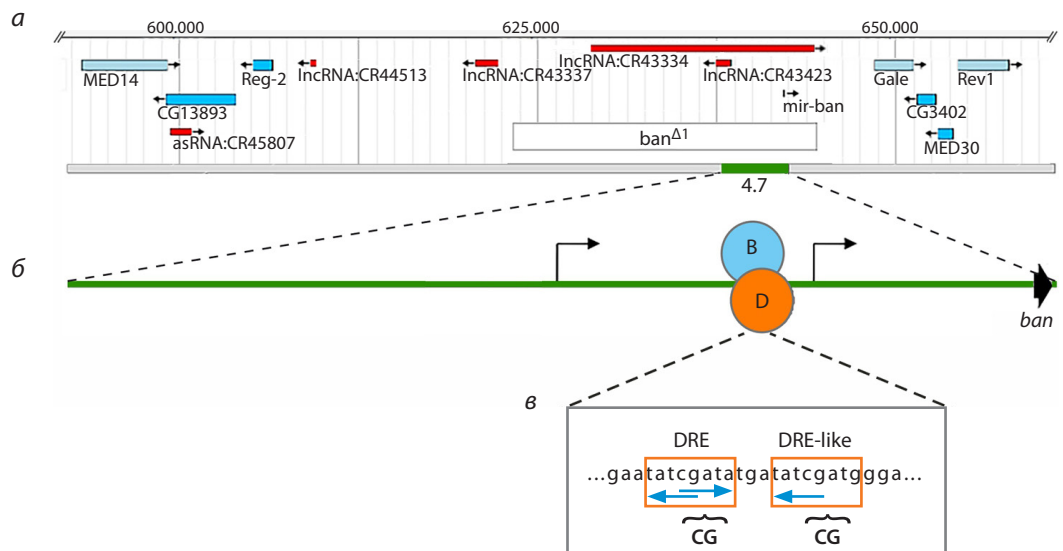


Рис. 1. Молекулярно-генетическая организация локуса *bantam*.

а – фрагмент ДНК 4.7, содержащий ген *bantam* (зеленый прямоугольник), делеция *ban^{Δ1}* – белый прямоугольник; положение остальных генов в районе – голубые и красные прямоугольники; б – схема организации фрагмента ДНК 4.7. Сайты связывания белков DREF и BEAF-32 – овалы D и B соответственно. Изогнутые стрелки – положение предполагаемых промоторов гена *bantam* (Brennecke et al., 2003; Qian et al., 2011). Положение шпильки *bantam* – черная стрелка; в – последовательность нуклеотидов с сайтами связывания белков DREF и BEAF-32. Мотивы, характерные для сайтов связывания DREF – оранжевые прямоугольники и BEAF-32 – синие стрелки. Фигурными скобками отмечены динуклеотидные инсерции, разрушающие сайты связывания DREF.

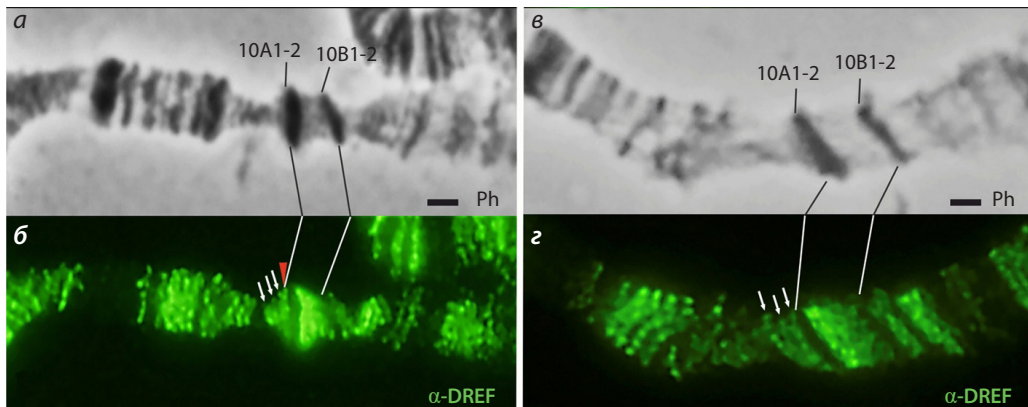


Рис. 2. Иммунолокализация белка DREF в районе 10A1-2 X-хромосомы трансгенных линий мух.

Линии мух: «4.7» (а, б) и «DREF» (в, з). Микрофотографии политенных X-хромосом слюнных желез личинок в режиме фазового контраста (Ph) и после окраски антителами против DREF (зеленый цвет). Белыми стрелками отмечены эндогенные сигналы локализации DREF в районе 9F, красным треугольником – дополнительный сигнал локализации DREF в дистальной части диска 10A1-2, соответствующий локализации трансгена в линии «4.7». В линии «DREF» дополнительный сигнал отсутствует (з). Шкала 1 мкм.

Линия мух «DREF» содержала вставку трансгена с фрагментом 4.7 с нарушенными сайтами связывания DREF. Для нарушения сайтов связывания DREF мы внесли мутации в мотивы DRE (DREF-responding element) и DRE-like (см. рис. 1, в). Следует отметить, что DRE и DRE-like включают в себя мотивы CGATA, формирующие сайт связывания инсуляторного белка BEAF-32. Введенные нами мутации не нарушали мотивы CGATA и, соответственно, не разрушали сайт связывания BEAF-32. Иммунолокализация на политенных хромосомах личинок дрозофилы показала, что в линии «4.7» в дистальной части диска 10A1-2 в месте встройки транспозона есть дополнительный сигнал локализации DREF (рис. 2, б, красная стрелка). При этом в линии «DREF» этот дополнительный сигнал отсутствует (см. рис. 2, з). Можно полагать, что обнаруженные нами мотивы DRE и DRE-like соответствуют сайту связывания белка DREF, а введенные нами мутации данных мотивов приводят к нарушению связывания белка DREF.

Нарушение сайта связывания DREF в регуляторной области *bantam* влияет на жизнеспособность мух

Мы обнаружили, что мухи из линии «DREF» выживали на фоне делеции *ban*^{Δ1}, однако жизнеспособность таких мух была значительно снижена по сравнению с мухами из линии «4.7» (рис. 3), а также с контрольными мухами «ТМ6», не содержащими ни трансгена, ни делеции *ban*^{Δ1}. Причем гибель мух, гомозиготных по *ban*^{Δ1}, в линии «DREF» в основном происходила на стадии поздней куколки, что совпадает с характерной летальностью делеции *ban*^{Δ1} (Brennecke et al., 2003). Использование контроля, содержащего балансер ТМ6В, позволяло учитывать влияние самого балансера на жизнеспособность мух.

Для того чтобы выяснить, ассоциировано ли снижение жизнеспособности трансгенных мух «DREF» с экспрессией гена *bantam*, мы изучали уровень экспрессии зрелой микроРНК *bantam* в личинках трансгенных и контрольных мух. Исследования проводили с помощью метода ПЦР в

реальном времени, адаптированного для микроРНК (Chen et al., 2005; Kramer, 2011). Линия «уи» с нормальным локусом *bantam* служила положительным контролем. В качестве отрицательного контроля мы использовали линию «*Aban*», с делецией *ban*^{Δ1}. Отбирали личинок, гомозиготных по встройкам. Так как особи, гомозиготные по делеции *ban*^{Δ1}, погибают на стадии куколки, анализировали личинок. Как и следовало ожидать, в линии «*Aban*» зрелая микроРНК *bantam* не детектировалась у личинок, гомозиготных по *ban*^{Δ1} (рис. 4). Экспрессия *bantam* оказалась снижена в обеих трансгенных линиях, «4.7» и «DREF», по сравнению с контролем «уи». Существенное снижение уровня экспрессии зрелой микроРНК в линии «4.7» кажется удивительным, при том что жизнеспособность мух в линии «4.7» не отличалась от контроля. Возможно, это объясняется тем, что в линии «4.7» уровень экспрессии микроРНК *bantam* хотя и существенно снижен, но сохраняется на достаточном уровне во всех тканях, где это необходимо для выживания мух. А в линии «DREF»

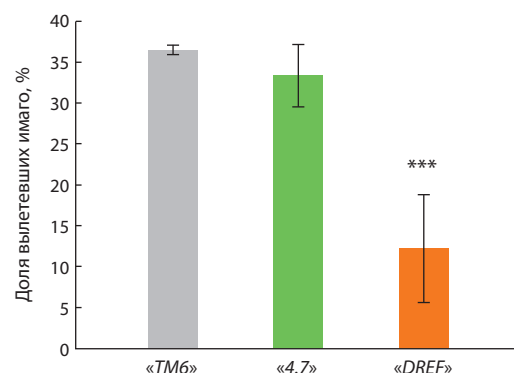


Рис. 3. Влияние связывания DREF с регуляторной областью *bantam* на жизнеспособность имаго в трансгенных линиях мух.

Доля имаго, гомозиготных по делеции *ban*^{Δ1}, в трансгенных линиях мух «4.7» (зеленый столбец) и «DREF» (оранжевый столбец). Доля имаго в контрольной линии мух «ТМ6» (серый столбец), содержащих только нативный локус *bantam* дикого типа. *** $p < 0.001$.

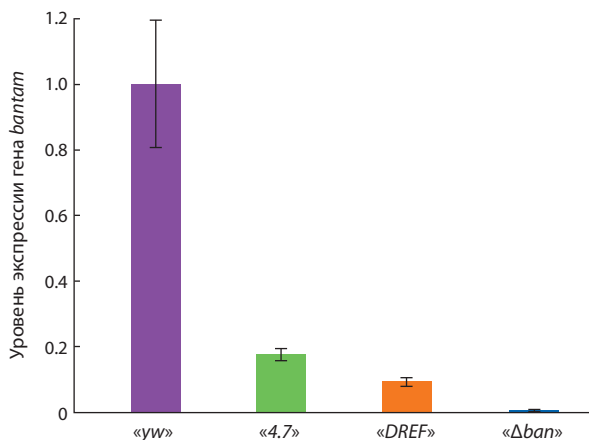


Рис. 4. Экспрессия микроРНК *bantam* в личинках 3-го возраста.

Уровни представленности зрелой микроРНК *bantam* в трансгенных линиях «4.7» и «DREF» и контрольной линии «Δban», гомозиготных по делеции *ban^{Δ1}*. Экспрессия *bantam* в контрольной линии «уw» условно принята за единицу. Уровни экспрессии *bantam* нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена мРНК *U6*.

уровень экспрессии *bantam* повсеместно находится на низком пороговом уровне, что значительно сказывается на жизнеспособности. Возможно также, что в линии «DREF» уровень экспрессии *bantam* снижен только в определенных тканях, критически важных для выживания мух. Полученные данные говорят о том, что, хотя трансген «DREF» спасает делецию *ban^{Δ1}*, он не содержит всех регуляторных элементов, необходимых для полноценной экспрессии *bantam*.

Принципиальная способность мутантного трансгена в линии «DREF» «спасать» делецию *ban^{Δ1}* косвенно подтверждает то, что внесенные мутации не разрушили сайт связывания белка BEAF-32. Ранее нами было показано, что разрушение сайт связывания белка BEAF-32 в регуляторной области *bantam* приводит к гибели на стадии поздней куколки (Schwartz et al., 2019).

Интересно, что в трансгенной линии «DREF» жизнеспособность взрослых мух, гомозиготных по *ban^{Δ1}*, зависела от пола. Доля самцов, гомозиготных по *ban^{Δ1}*, составляла всего 30 % от всех взрослых мух, что достоверно ниже, чем в линии «4.7» и в контроле ($p < 0.01$). Это может объясняться тем, что разрушение сайта связывания DREF в регуляторной области *bantam* в большей степени влияет на жизнеспособность самцов, чем самок. Другим объяснением может служить разный уровень активности трансгена в X-хромосоме, связанный с дозовой компенсацией. Несмотря на то что самцы линии «DREF», гомозиготные по *ban^{Δ1}*, были менее жизнеспособными, чем самки, у них не было проблем с фертильностью.

Нарушение сайта связывания DREF в промоторной области *bantam* существенно снижает фертильность самок

Мы исследовали фертильность самок трансгенных линий, оценивая усредненное количество отложенных яиц на одну самку (см. Материалы и методы). В линии «4.7» фертильность самок, гомозиготных по *ban^{Δ1}*, была достоверно снижена по сравнению с самками контрольной линии

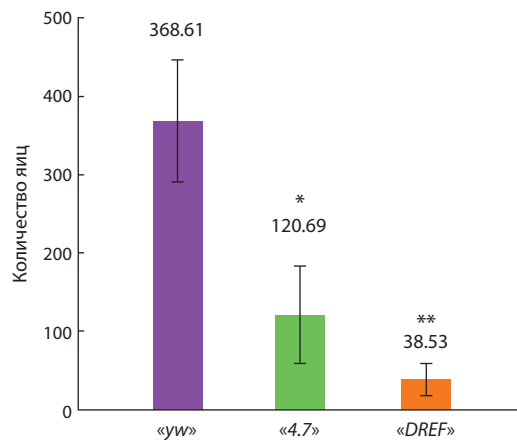


Рис. 5. Фертильность самок трансгенных линий мух.

Усредненное количество яиц на одну самку из контрольной линии «уw» и трансгенных линий «4.7» и «DREF», гомозиготных по трансгенам и по делеции *ban^{Δ1}*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

«уw» и составляла 32.7 % от фертильности контрольных самок «уw», принятой за 100 % (рис. 5). Фертильность самок, гомозиготных по *ban^{Δ1}*, в линии «DREF» составляла лишь 10.5 %. Эти данные указывают на то, что фрагмент 4.7 содержит не все регуляторные элементы, необходимые для нормального прохождения оогенеза, а мутация сайта связывания в линии «DREF» еще более существенно нарушает этот процесс.

Однако нужно учитывать, что продолжительность жизни самок в трансгенных линиях была значительно снижена по сравнению с контрольными самками линии «уw» ($p < 0.05$). Так, в линии «уw» 50 % самок погибали в среднем на 22-й день эксперимента, в линии «4.7» – на 16-й день, а в линии «DREF» – на 10-й день.

В то же время сокращение продолжительности жизни не являлось единственным объяснением снижения количества яиц, которые откладывали самки трансгенных линий. Анализ динамики откладки яиц показал, что самки трансгенных линий не только откладывают меньше яиц в каждый день эксперимента, чем самки контрольной линии «уw» ($p < 0.001$), но и гораздо раньше заканчивают откладывать яйца (рис. 6). Репродуктивный период у самок линии «4.7» длился в среднем 16.3 дня ($p < 0.01$), а у самок «DREF» — 8.3 дня ($p < 0.001$), в то время как репродуктивный период у контрольных самок «уw» составлял 24.7 дня.

Нарушение сайта связывания DREF снижает экспрессию микроРНК *bantam* в яичниках взрослых мух

Раннее завершение откладки яиц в трансгенных линиях сходно с ситуацией, описанной по инактивации микроРНК *bantam* в стволовых клетках зародышевого пути в яичниках взрослых мух (Shcherbata et al., 2007). По данным авторов, у таких самок около 14 % стволовых клеток зародышевого пути уходило из своей ниши за день. Это может приводить как к общему снижению фертильности, так и к сокращению репродуктивного периода.

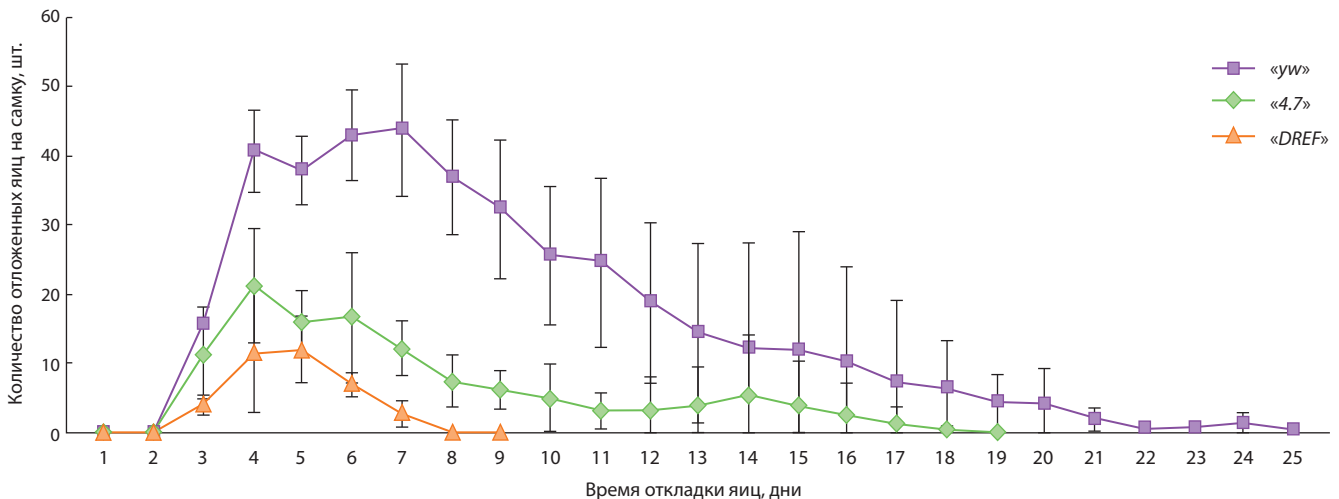


Рис. 6. Временная динамика фертильности самок.

Усредненное количество откладываемых яиц в день на одну самку в контрольной линии «uw» и в трансгенных линиях «4.7» и «DREF», гомозиготных по трансгенам и по делеции *bant*^{Δ1}.

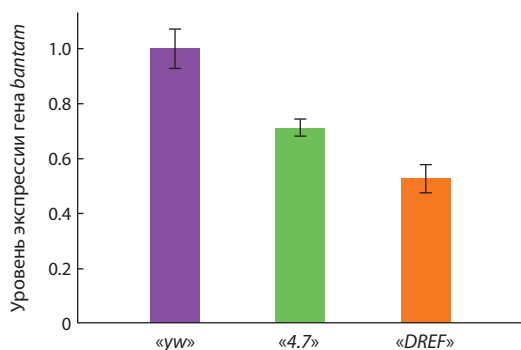


Рис. 7. Экспрессия зрелой микроРНК *bantam* в яичниках трансгенных самок.

Уровни представленности зрелой микроРНК *bantam* в трансгенных линиях «4.7» и «DREF», гомозиготных по делеции *bant*^{Δ1}. Экспрессия *bantam* в контрольной линии «uw» условно принята за единицу. Уровни экспрессии *bantam* нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена мРНК *U6*.

Мы решили проверить, действительно ли связывание DREF с регуляторной областью *bantam* влияет на уровень экспрессии зрелой микроРНК. С помощью ПЦР в реальном времени мы показали, что экспрессия микроРНК *bantam* в яичниках у самок трансгенных линий «4.7» и «DREF» ниже, чем у самок контрольной линии «uw» (рис. 7).

Полученные результаты согласуются с тем, что в обеих трансгенных линиях фертильность самок снижена по сравнению с контрольными самками «uw». При этом в линии «DREF» экспрессия *bantam* снижена не только по сравнению с «uw», но и по сравнению с «4.7». Это свидетельствует о том, что связывание DREF с регуляторной областью гена *bantam* играет важную роль в его экспрессии в яичниках и именно нарушение этого связывания может объяснять значительное снижение фертильности у самок линии «DREF».

Заключение

В настоящей работе мы проверили функциональность потенциального сайта связывания транскрипционного фактора DREF, обнаруженного в регуляторной области гена *bantam*. Нарушение данного сайта связывания DREF оказывает существенное влияние на жизнеспособность мух, а также на фертильность самок. Это сопровождается значительным снижением экспрессии зрелой микроРНК *bantam* как в целых личинках, так и в яичниках взрослых мух. Как было показано ранее, DREF положительно влияет на активность каскада Hippo, тем самым опосредованно ограничивая экспрессию *bantam* (Fujiwara et al., 2012; Vo et al., 2014). Влияние связывания DREF с промоторной областью гена *bantam* на уровень его экспрессии предполагает дополнительный уровень сложности регуляции экспрессии этой микроРНК.

Снижение количества откладываемых яиц и сокращение репродуктивного периода у самок при нарушении сайта связывания DREF в регуляторной области гена *bantam* позволяют предполагать, что через *bantam* DREF также участвует в регуляции оогенеза дрозофилы.

Список литературы / References

- Андреев О.В., Андреевкова Н.Г., Волкова Е.И., Георгиев П.Г., Гончарова А.А., Похолкова Г.В., Демаков С.А. Эктопическое привлечение белка Chromator в системе UAS>DBD(GAL4) как метод изучения инсуляторных белков в политеменных хромосомах *Drosophila melanogaster*. *Цитология*. 2016;58(6):493-497 [Andreenkov O.V., Andreenkova N.G., Volkova E.I., Georgiev P.G., Goncharova A.A., Pokholkova G.V., Demakov S.A. Ectopic tethering of the Chromator protein in UAS>DBD(GAL4) system as approach for studying of the insulator proteins in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Tsitologiya = Cell and Tissue Biology*. 2016;58(6):493-497 (in Russian)]
- Brennecke J., Hipfner D.R., Stark A., Russell R.B., Cohen S.M. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*. 2003;113(1):25-36. DOI 10.1016/s0092-8674(03)00231-9

- Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179. DOI 10.1093/nar/gni178
- Fujiwara S., Ida H., Yoshioka Y., Yoshida H., Yamaguchi M. The warts gene as a novel target of the *Drosophila* DRE/DREF transcription pathway. *Am. J. Cancer Res.* 2012;2(1):36-44
- Herranz H., Pérez L., Martín F.A., Milán M. A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G1-S transition in the *Drosophila* wing. *EMBO J.* 2008;27(11):1633-1645. DOI 10.1038/emboj.2008.84
- Hipfner D.R., Weigmann K., Cohen S.M. The *bantam* gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics.* 2002;161(4):1527-1537. DOI 10.1093/genetics/161.4.1527
- Huang J., Wu S., Barrera J., Matthews K., Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell.* 2005;122(3):421-434. DOI 10.1016/j.cell.2005.06.007
- Kolesnikova T.D., Posukh O.V., Andreyeva E.N., Bebyakina D.S., Ivankin A.V., Zhimulev I.F. *Drosophila* SUUR protein associates with PCNA and binds chromatin in a cell cycle-dependent manner. *Chromosoma.* 2013;122(1-2):55-66. DOI 10.1007/s00412-012-0390-9
- Kramer M.F. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2011;95(1):15.10.1-15.10.15. DOI 10.1002/0471142727.mb1510s95
- Ku H.Y., Sun Y.H. Notch-dependent epithelial fold determines boundary formation between developmental fields in the *Drosophila* antenna. *PLoS Genet.* 2017;13(7):e1006898. DOI 10.1371/journal.pgen.1006898
- Nagata R., Akai N., Kondo S., Saito K., Ohsawa S., Igaki T. Yorkie drives supercompetition by non-autonomous induction of autophagy via *bantam* microRNA in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 2022;32(5):1064-1076.e4. DOI 10.1016/j.cub.2022.01.016
- Oh H., Irvine K.D. Yorkie: the final destination of Hippo signaling. *Trends Cell Biol.* 2010;20(7):410-417. DOI 10.1016/j.tcb.2010.04.005
- Ohler U., Liao G.C., Niemann H., Rubin G.M. Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome. *Genome Biol.* 2002;3:research0087.1. DOI 10.1186/gb-2002-3-12-research0087
- Peng H.W., Slattery M., Mann R.S. Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: *Homothorax* and *yorkie* regulation of the microRNA *bantam* in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev.* 2009;23(19):2307-2319. DOI 10.1101/gad.1820009
- Qian J., Zhang Z., Liang J., Ge Q., Duan X., Ma F., Li F. The full-length transcripts and promoter analysis of intergenic microRNAs in *Drosophila melanogaster*. *Genomics.* 2011;97(5):294-303. DOI 10.1016/j.ygeno.2011.02.004
- Reddy B.V.V.G., Irvine K.D. Regulation of *Drosophila* glial cell proliferation by Merlin-Hippo signaling. *Development.* 2011;138(23):5201-5212. DOI 10.1242/dev.069385
- Schwartz (Berkaeva) M.B., Pankova T.E., Demakov S.A. ADF1 and BEAF-32 chromatin proteins affect nucleosome positioning and DNA decompaction in 61C7/C8 interband region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2019;23(2):154-159. DOI 10.18699/VJ19.475
- Shcherbata H.R., Ward E.J., Fischer K.A., Yu J.Y., Reynolds S.H., Chen C.H., Xu P., Hay B.A., Ruohola-Baker H. Stage-specific differences in the requirements for germline stem cell maintenance in the *Drosophila* ovary. *Cell Stem Cell.* 2007;1(6):698-709. DOI 10.1016/j.stem.2007.11.007
- Slattery M., Voutev R., Ma L., Nègre N., White K.P., Mann R.S. Divergent transcriptional regulatory logic at the intersection of tissue growth and developmental patterning. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003753. DOI 10.1371/journal.pgen.1003753
- Vo N., Horii T., Yanai H., Yoshida H., Yamaguchi M. The Hippo pathway as a target of the *Drosophila* DRE/DREF transcriptional regulatory pathway. *Sci. Rep.* 2014;4:7196. DOI 10.1038/srep07196
- Weng R., Cohen S.M. Control of *Drosophila* Type I and Type II central brain neuroblast proliferation by *bantam* microRNA. *Development.* 2015;142(21):3713-3720. DOI 10.1242/dev.127209
- Zhang X., Aksoy E., Girke T., Raikhel A.S., Karginov F.V. Transcriptome-wide microRNA and target dynamics in the fat body during the gonadotrophic cycle of *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017;114(10):E1895-E1903. DOI 10.1073/pnas.1701474114

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-14-00051П. Авторы выражают признательность центру коллективных исследований «Молекулярная и клеточная биология» ИМКБ СО РАН за предоставленные ресурсы при поддержке программы фундаментальных научных исследований по проекту FWGZ-2021-0014.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.11.2023. После доработки 29.11.2023. Принята к публикации 29.11.2023.