

АНАЛИЗ ТКАНЕ- И СТАДИЕСПЕЦИФИЧНОСТИ ТРАНСКРИПЦИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ГРУППЫ *GYPGY* У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Ф.А. Урусов, Л.Н. Нефедова, А.И. Ким

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
e-mail: aikim@mail.ru

Исследована стадийспецифичность транскрипции 11 мобильных генетических элементов группы *gypsy* в линии *Drosophila melanogaster* SS (Stable Strain), мутантной по гену *flamenco*, контролирующему транспозиции элемента *gypsy*. В отличие от контрольной линии *flamenco*⁺ в линии SS выявлен повышенный уровень транскрипции большинства изученных элементов на эмбриональной стадии и стадии имаго. На личиночной стадии экспрессия не выявлена ни в одной из линий. Полученные результаты могут свидетельствовать о существовании общих механизмов контроля экспрессии/транспозиции для всех элементов группы *gypsy*. При исследовании тканеспецифичности экспрессии элементов в линии SS установлено, что элемент *Tirant* транскрибируется исключительно в яичниках взрослых самок. Для других элементов такой зависимости обнаружено не было.

Ключевые слова: мобильные генетические элементы, ретротранспозоны, *gypsy*, экспрессия.

Мобильные генетические элементы (МГЭ) составляют значительную часть генома эукариот, например, у *Drosophila melanogaster* на их долю приходится более 20 % (Pimpinelly *et al.*, 1995). Классификация МГЭ основана на способах их перемещения. Различают транспозоны (перемещение по механизму вырезания/встраивания) и ретротранспозоны (перемещение происходит через РНК-интермедиат, образованный в результате обратной транскрипции). Ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (ДКП-ретротранспозоны) проявляют значительное структурное и функциональное сходство с ретровирусами. Элемент *gypsy* является типичным ДКП-ретротранспозоном, содержащим три открытые рамки считывания (ОРС), в том числе активную ОРС3 (Marlor *et al.*, 1986). Неудивительно, что *gypsy* является первым ретровирусом, обнаруженным у беспозвоночных (Kim *et al.*, 1994). Позже в геноме *D. melanogaster* были обнаружены и другие родственные *gypsy* ретроэлементы (Kaminker *et al.*, 2002). Их филогенетические отношения установлены с помощью биоинформатического анализа (Нефедова, Ким, 2009). Несмотря на то

что некоторые из них содержат ОРС3, инфекционные свойства экспериментально показаны пока только для *gypsy* (Kim *et al.*, 1994) и ZAM (Leblanc *et al.*, 2000).

Транспозиции МГЭ вносят значительный вклад в формирование наследственной изменчивости, однако их высокая частота, являясь причиной геномной нестабильности, может быть опасна для жизни особи, поэтому в клетке существуют механизмы, ограничивающие перемещение элементов. Исследования данных механизмов удобно проводить на модельных системах, представляющих собой линии, в которых повышена частота транспозиции МГЭ. Одним из таких примеров является система нестабильной мутаторной линии (MS) *D. melanogaster*, которая ведет свое происхождение от стабильной лабораторной линии (SS) и характеризуется увеличенной частотой спонтанного мутагенеза до величин порядка 10^{-3} – 10^{-4} , нестабильным характером мутаций и активной транспозицией *gypsy* (фенотип *flamenco*) при неизменной локализации других элементов (Ким и др., 1989). Таким образом, в линии SS имеются нарушения в системе

контроля транспозиции *gypsy*, однако генетическая стабильность данной линии обусловлена отсутствием в ее геноме активной копии элемента (Lyubomirskaya *et al.*, 1998).

У *D. melanogaster* транспозиция *gypsy* контролирует ген *flamenco* (Prud'homme *et al.*, 1995). Ген *flamenco* картирован в районе 20A1-3 X-хромосомы. В настоящее время известно, что *flamenco*, имеющий в своем составе множество дефектных копий МГЭ, является источником антисмысловой РНК-предшественника для системы РНК-интерференции (Pellisson *et al.*, 2007, Потапова, 2011). Показано, что ген *flamenco*, возможно, принимает участие в контроле транспозиции не только *gypsy*, но и элементов *ZAM* и *Idefix* (Нефедова и др., 2010). Не исключено, что его влияние может распространяться и на другие элементы, родственные перечисленным выше.

Исследовалась экспрессия на уровне транскрипции в линии SS 11 ретротранспозонов группы *gypsy*. Анализируемые элементы *ZAM*, *17.6*, *297*, *Tirant*, *springer*, *rover*, *Quasimodo*, *opus*, *Idefix* и *gypsy* содержат 3 ОРС, и только *Transpac*-элемент, имеющий в своем составе только первые две ОРС.

Материалы и методы

Линии *D. melanogaster* и их характеристики

Линия SS (Stable Strain) характеризуется фенотипом *flamenco*, генетическим маркером *w*¹; активный *gypsy* отсутствует, линия 413 имеет фенотип *flamenco*⁺, сцепленные X-хромосомы, генетические маркеры *y*, *v*, *f*. Линии мух культивировали в стандартных условиях на общепринятой агаризованной питательной среде при температуре 25 °С.

Выделение тотальной РНК

Выделение РНК осуществляли с помощью набора фирмы «Promega» «RNAagents Total RNA Isolation System». Биоматериал гомогенизировали в буфере, содержащем гуанидинизотиоцианат. Далее экстракцию проводили по протоколу «Promega». Все манипуляции с РНК осуществляли на ледяной бане. Качество выделенной

РНК оценивали путем электрофореза в 2 %-м агарозном геле, количество – спектрофотометрически (Nanodrop).

Обратная транскрипция

Перед реакцией обратной транскрипции проводили обработку РНК ДНКазой I («Fermentas») в 4-кратном объеме согласно протоколу фирмы-производителя. Использовали пробы, содержащие 1 мкг РНК. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 2,2 мМ. ДНКазу инактивировали прогреванием при 65 °С в течение 10 мин. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора фирмы «Fermentas» «First Strand cDNA Synthesis Kit» по протоколу производителя, в качестве затравки для синтеза использовали случайные праймеры.

Полимеразная цепная реакция

Аmplификацию проводили в амплификаторе «Biokom» в течение 30 циклов, используя *Taq*-полимеразу. Концентрация в пробе MgCl₂ составляла 2,5 мМ, каждого праймера – 0,4 мМ. Параметры ПЦР: денатурация 95 °С 30 с, отжиг 54 °С 1 мин, элонгация 72 °С 1 мин. Праймеры, использованные в реакциях амплификации, имели следующий нуклеотидный состав: *ZAM_RT_f* (5'-aacggcatcaattgcatcaa-3'), *ZAM_RT_r* (5'-tgttggttctactctgcttg-3'), *17.6_RT_f* (5'-cctgcgtagcacgattttgt-3'), *17.6_RT_r* (5'-rctatgtccgccacaccagtt-3'), *297_RT_f* (5'-cgttggttcatacggcaat-3'), *297_RT_r* (5'-ttcgacgtctgctactccgt-3'), *Transpac_RT_f* (5'-taacaagcgatccgatagtc-3'), *Transpac_RT_r* (5'-ctgagtcgacactgtgaata-3'), *Tirant_RT_f* (5'-ggaattgcattaacgtagtt-3'), *Tirant_RT_r* (5'-gggtctgttcgggtttcatt-3'), *springer_RT_f* (5'-gacgtagttcgacgatttcc-3'), *springer_RT_r* (5'-gccactattgtctgcgattt-3'), *rover_RT_f* (5'-gcgacttaatagggttgcc-3'), *rover_RT_r* (5'-ttccgtgttacgggtgtctg-3'), *Quasimodo_RT_f* (5'-ggaagcacattgcaacgct-3'), *opus_RT_r* (5'-ttgagcactgtggggcataa-3'), *Idefix_RT_f* (5'-gacatgggaaaaccgcaaga-3'), *Idefix_RT_r* (5'-acgatcttctgccacgatt-3'), *gypsy_RT_f* (5'-gtgaacgctattcactgcga-3'), *gypsy_RT_r* (5'-gaggtgacagttctgagtt-3').

Результаты и обсуждение

Критическим этапом в жизненном цикле ретротранспозонов является их транскрипция. Поэтому исследование уровня мРНК ретроэлементов в некоторых случаях может способствовать пониманию механизмов, контролирующих их перемещение.

Методом ПЦР, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), была исследована транскрипция МГЭ группы *gypsy* в линии SS (фенотип *flamenco*). Линия 413, имеющая фенотип *flamenco*⁺, в данном эксперименте была использована в качестве контрольной. Для анализа использовали взрослых особей (рис. 1).

На представленных электрофореграммах (рис. 1) видно, что в линии SS обнаруживается мРНК большинства МГЭ, при этом в контрольной линии 413 при данных условиях эксперимента эти транскрипты не выявляются или они едва детектируются. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что почти для всех изучаемых элементов существует общий механизм контроля их экспрессии (ген *flamenco*), который нарушен в линии SS. Исключение составляют элементы *rover* и *ZAM*. В обеих линиях обнаруживается пониженный уровень РНК элементов *rover* и *ZAM*. Этот эффект, вероятно, связан с низкой копийностью элементов *rover* и *ZAM* в геноме линий SS и 413. Следует также обратить внимание на то, что транскрипция *gypsy*

в линии SS при данных условиях эксперимента также происходит слабо.

Известно, что мобильные элементы могут проявлять дифференциальную активность на разных стадиях развития организма-хозяина, поэтому мы исследовали экспрессию МГЭ группы *gypsy* на личиночной и эмбриональной стадиях развития дополнительно к имагинальной (рис. 2).

На личиночной стадии развития экспрессия всех элементов либо отсутствует, либо происходит на очень низком уровне. Данная закономерность установлена как для линии SS (рис. 2), так и для контрольной линии 413 (результаты не представлены). Это позволяет предполагать, что на данной стадии развития, в отличие от стадии имаго, могут действовать другие механизмы регуляции экспрессии исследуемых МГЭ. Дело в том, что на стадии личинок анализу подвергается транскрипция в личиночных тканях, тогда как будущие ткани взрослых особей находятся в имагинальных дисках в ничтожно малом количестве.

Совершенно иная картина получена на эмбрионах линии SS. Экспрессия всех элементов, за исключением *Tirant* и *ZAM*, была обнаружена (рис. 3). Здесь следует обратить внимание на тот факт, что у взрослых особей достаточно четко выявлялась экспрессия элемента *Tirant* (рис. 1), значит отсутствие или крайне слабый уровень транскрипции никак не связаны с числом копий

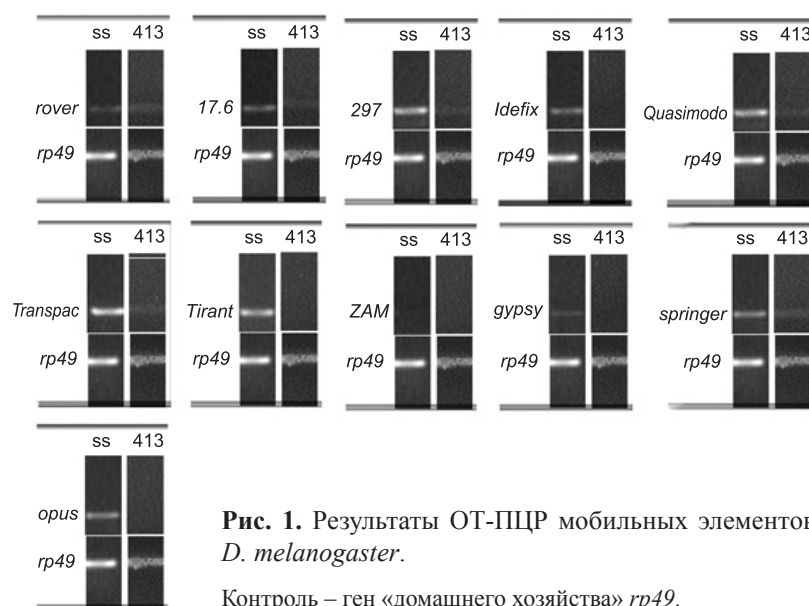


Рис. 1. Результаты ОТ-ПЦР мобильных элементов группы *gypsy* в линиях SS и 413 *D. melanogaster*.

Контроль – ген «домашнего хозяйства» *rp49*.

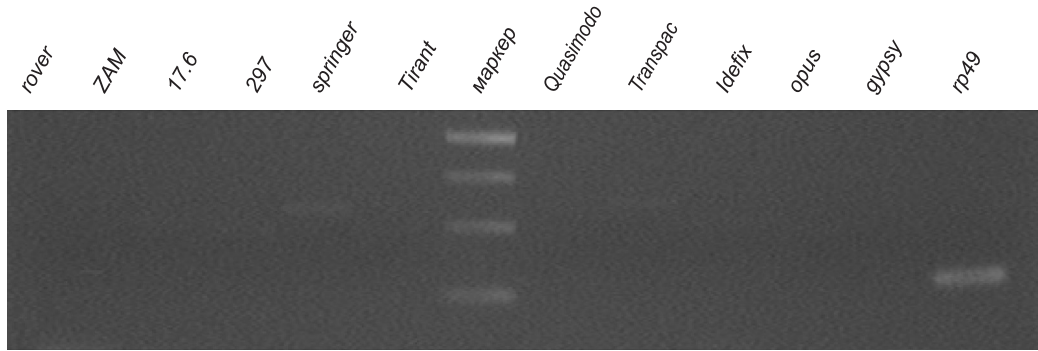


Рис. 2. Результаты ОТ-ПЦР-анализа транскрипции МГЭ на личиночной стадии развития (линия SS).

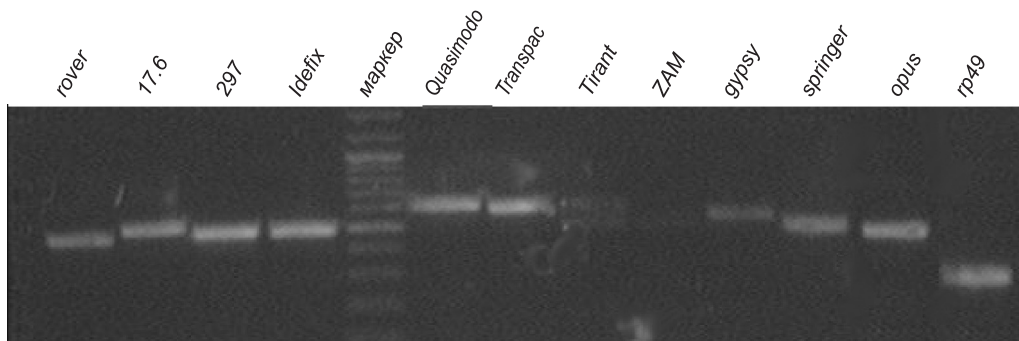


Рис. 3. Экспрессия МГЭ на эмбриональной стадии развития.

этого элемента в геноме. Вероятно, наличие его транскрипции у взрослых мух обеспечивается особыми механизмами, что и отличает элемент *Tirant* от других представителей МГЭ группы *gypsy*. Относительно элемента *ZAM* сложно сделать какие-либо выводы, поскольку его экспрессия не регистрировалась ни на одной из стадий развития, хотя в геноме всех линий, использованных в настоящей работе, этот элемент присутствует, но, вероятно, в малом числе копий и/или в виде дефектных копий, не способных к транскрипции.

Значительный интерес вызывают данные о тканеспецифичности экспрессии мобильных элементов. Мы оценили уровень экспрессии изучаемых элементов в яичниках и корпусе мух линии SS, не обнаружив при этом существенных различий практически для всех элементов (результаты не представлены). Их экспрессия регистрировалась как в корпусе, так и в яичниках. Исключением стал элемент *Tirant*. Как видно из рис. 4, его экспрессия не обнаруживается в корпусе мух линии SS, а в яичниках наблюдается на достаточно высоком уровне. Можно сделать вывод, что в целых мухах экс-

прессия данного элемента регистрируется за счет его транскрипции в яичниках.

В совокупности полученные нами данные могут свидетельствовать о существовании молекулярных механизмов, обеспечивающих тканеспецифический профиль экспрессии элемента *Tirant*, и, возможно, не функционирующих в линии SS. Кроме того, не исключено, что нарушения в линии SS, формирующие фенотип *flamenco*, касаются не только элемента *gypsy*,

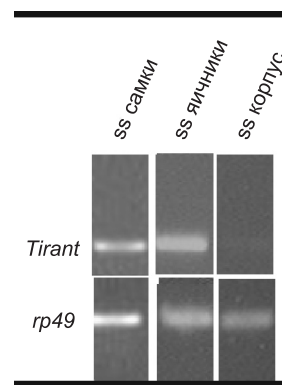


Рис. 4. Экспрессия элемента *Tirant* в разных тканях линии SS *D. melanogaster*.

но и элемента *Tirant*, что в таком случае может указывать на общность механизмов контроля экспрессии/транспозиции двух вышеуказанных элементов в генеративных тканях.

Таким образом, по результатам данной работы можно сделать выводы о существовании возможного общего механизма контроля экспрессии для большинства элементов группы *gypsy*, дифференциальной транскрипционной активности элементов на разных стадиях развития дрозофилы и эффекта тканеспецифичности для элемента *Tirant*.

Работа частично поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» и грантом РФФИ 11-04-00403-а.

Литература

- Ким А.И., Беляева Е.С., Ларкина З.Г., Асланян М.М. Генетическая нестабильность и транспозиции мобильного элемента МДГ4 в мутаторной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1989. Т. 25. № 10. С. 1747–1756.
- Нефедова Л.Н., Дыйканов Д.Т., Мартиросян И.А., Ким А.И. Ретротранспозоны *Idefix* и *ZAM* способны к транспозиции в линии MS *Drosophila melanogaster*, мутантной по гену *flamenco* // Вестн. Моск. ун-та. 2010. Сер. 16. Биология. № 2. С. 3–8.
- Нефедова Л.Н., Ким А.И. Молекулярная филогения и систематика ретротранспозонов и ретровирусов дрозофилы // Молекуляр. биология. 2009. Т. 43. № 5. С. 807–815.
- Потапова М.В. Анализ структуры и экспрессии района локализации гена *flamenco* у *Drosophila melanogaster*: Дис. ... канд. биол. наук. М., 2011.
- Kaminker J.S., Bergman C.M., Kronmiller B. *et al.* The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective // Genome Biol. 2002. V. 3. N 12.
- Kim A., Terzian C., Santamaria P. *et al.* Retroviruses in vertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 1285–1289.
- Leblanc P., Desset S., Giorgi F. *et al.* Life cycle of an endogenous retrovirus, ZAM, in *Drosophila melanogaster* // J. Virol. 2000. V. 74. N 22. P. 10658–10669.
- Lyubomirskaya N.V., Smirnova Y.B., Avedisov S.N. *et al.* Comparative analysis of structure and retrotransposition activity in two *Drosophila* mobile element *mdg4* (*gypsy*) // Mol. Biol. 1998. V. 32. P. 689–694.
- Marlor R.L., Parkhurst S.M., Corces V.G. The *Drosophila melanogaster gypsy* transposable element encodes putative gene products homologous to retroviral proteins // Mol. Cell. Biol. 1986. V. 6. P. 1129–1134.
- Pellisson A., Sarot E., Payen-Groschene G., Bucheton A. A novel repeat-associated small interfering RNA-mediated silencing pathway down regulates complementary sense *gypsy* transcripts in somatic cells of the *Drosophila* ovary // J. Virol. 2007. V. 81. P. 1951–1960.
- Pimpinelli S., Berloco M., Fanti L. *et al.* Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 3804–3808.
- Prud'homme N., Gans M., Masson M. Flamenco a gene controlling the *gypsy* retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1995. V. 139. N 2. P. 697–711.

ANALYSIS OF THE TISSUE- AND STAGE-SPECIFIC TRANSCRIPTION OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* GYPSY RETROTRANSPOSON

F.A. Urusov, L.N. Nefedova, A.I. Kim

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia,
e-mail: aikim57@mail.ru

Summary

This study deals with the stage-specific transcription of 11 transposable elements of the gypsy group in *Drosophila melanogaster* strain SS (Stable Strain), bearing a mutant in the *flamenco* gene, which controls *gypsy* transposition. In contrast to the *flamenco*⁺ strain, elevated levels of transcription of most studied elements in SS have been recorded at the embryonic and adult stages. At the larval stage, the expression was not detected in either strain. The results suggest the existence of expression/transposition-controlling mechanisms shared by all members of the *gypsy* group. Study of the tissue specificity of TE expression in the SS strain has demonstrated that the *Tirant* element is transcribed only in the ovaries of adult females. Other elements show no such dependence.

Key words: transposable elements, retrotransposons, *gypsy*, expression.