ВЛИЯЮЩИЕ НА МАЛЫЕ РНК МУТАЦИИ В ГЕНАХ *spn-E*, *piwi*^{2} И *aub* НЕ СКАЗЫВАЮТСЯ НА МУТАБИЛЬНОСТИ *hobo*-ИНСЕРЦИОННОГО АЛЛЕЛЯ ГЕНА *yellow DROSOPHILA MELANOGASTER*

Л.П. Захаренко, М.А. Волошина

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: zakharlp@bionet.nsc.ru;
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Исследовали влияние мутаций в генах *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub Drosophila melanogaster*, причастных к продукции малых РНК, на частоту мутирования высоконестабильного аллеля y^{+h} локуса *yellow*, в регуляторную зону которого встроен *hobo*-элемент. Локус-специфическая нестабильность в y^{+h} складывается из перемещения *hobo* и рекомбинационных событий, в которые вовлечен *hobo* из регуляторной зоны гена *yellow*.Частоту мутирования оценивали, скрещивая самцов, несущих y^{+h} на фоне исследуемых аллелей *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub*, с самками со сцепленными Х-хромосомами. По нашим данным, частота появления мутаций в гене *yellow* в большей степени зависела от скрещивания с линией со сцепленными Х-хромосомами, чем от наличия мутации в генах *spn-E*, *piwi*^{2} или *aub*. Видимо, исследуемые мутации не сказываются на активности *hobo*-элемента или же в нестабильности аллеля y^{+h} рекомбинации между *hobo*-элементами играют большую роль, чем скорость его перемещения.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, *yellow*, *hobo*, мобильные генетические элементы, *spn-E*, *piwi*^{2}, *aub*.

Введение

Мобильные генетические элементы (МГЭ) занимают около 22 % генома *Drosophila melanogaster* (Kapitonov, Jurka, 2003). У *D. melanogaster* описано около сотни семейств МГЭ, каждое из которых представлено от нескольких копий до нескольких десятков копий на геном в зависимости от линии дрозофил или типа мобильного элемента. Есть линии, в которых некоторые семейства МГЭ не представлены вовсе. По крайней мере, треть МГЭ семейства Drosophilidae видоспецифичны (Bartolomé *et al*., 2009). Одни МГЭ могут кодировать активные ферменты, участвующие в их перемещении, другие копии дефектны. В ряде случаев дефектные копии способны к перемещению при наличии в геноме полноразмерной активной копии и сохранении концевых повторов. В природной популяции дрозофил невозможно найти две хромосомы с одинаковым распределением МГЭ. Тем не менее большая часть МГЭ относительно стабильна. Спонтанная скорость перемещения МГЭ колеблется в пределах порядка величин от 10^{-1} до 10^{-5} на сайт на геном за поколение (Harada *et al*., 1990). С учетом того что в геноме число копий каждого семейства, способных к перемещению, не превышает 1–2 десятков, в среднем перемещается не более одной копии на геном за поколение. Консенсусной нуклеотидной последовательности по сайтам внедрения МГЭ, как правило, нет, но есть, по-видимому, предпочтение к некоторым конформационным состояниям ДНК (Saville *et al*., 1999). Существуют горячие и холодные сайты внедрения МГЭ, но не очень понятно, то ли в некоторые участки хромосомы легко встроиться, то ли из них трудно выщепиться (Thibault *et al*., 2004; Esnault *et al*., 2011). Большая часть МГЭ обнаруживается в межгенных пространствах и

меньшая – в интронах и экзонах (Lipatov *et al*., 2005). Внедрение МГЭ в экзон обычно сказывается на активности гена, но описаны случаи «экзонизации» МГЭ, когда фрагменты МГЭ закрепляются в гене, оказываются значимыми для генома и сохраняются в ряду поколений (Lipatov *et al*., 2005). Таким образом, мобильные элементы обеспечивают генетический полиморфизм в природных популяциях дрозофил за счет разного набора и количества МГЭ, структуры их дефектных производных и локализации МГЭ на хромосомах.

Несмотря на ярко выраженный полиморфизм по распределению МГЭ в природных популяциях, фенотип дрозофил остается неизменным, а роль МГЭ в жизни особи и в эволюции не до конца понятой. Природа факторов, индуцирующих перемещение МГЭ, так же, как и причина их сайленсинга, активно обсуждается. Одна из тенденций в этой области биологии – исследование влияния малых РНК на регуляцию активности МГЭ (Aravin *et al*., 2004; Vagin *et al*., 2006; Brennecke *et al*., 2007; Klenov *et al*., 2007). Описано несколько типов малых РНК (siRNA, miRNA, rasiRNA и др.), которые имеют разное происхождение. Одни формируются на базе шпилек из транскриптов самих МГЭ, в других случаях малые РНК имеют независимое от регулируемых МГЭ происхождение. Предполагается, что участие малых РНК в репрессии МГЭ осуществляется по принципу комплементарности к РНК-мишени (РНК интерференция) с последующим разрушением РНК МГЭ. Другой возможный механизм регуляции активности МГЭ – малые РНК блокируют транскрипцию РНК МГЭ. После формирования малые РНК связываются с белками семейства *Argonaute*, формируя эффекторный комплекс, блокирующий транскрипцию МГЭ. Считается, что этот комплекс является посредником во всех процессах, где РНК выступает регулятором активности. Гены *piwi* и *aub* (*aubergine*) – члены семейства *Argonaute*/*Dicer*, ген *spn-E* (*spindle E*) относят к классу хеликаз. Мутации в этих генах коррелируют с увеличением количества малых РНК к соответствующим МГЭ (Vagin *et al*., 2006; Brennecke *et al*., 2007).

Мы исследовали влияние мутаций в генах *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* на частоту мутирования в гене *yellow* в линии y^{+h} *Drosophila melanogaster*. В линии y^{+h} объединены два нестабильных гена: *yellow*$^+$-аллель из линии 743$^+$, в регуляторной зоне которого встроен дефектный *hobo*-элемент, и ген *Notch* из линии Uc-1 с полноразмерным *hobo*-элементом, внедренным в один из интронов этого гена. Внедрение *hobo* в эти гены не сказывается на фенотипе дрозофил, но обеспечивает высокую нестабильность в этих локусах как за счет перемещения *hobo*, так и за счет рекомбинаций между *hobo*-элементами, внедренными в эти гены, и другими *hobo*, расположенными на Х-хромосоме (Захаренко и др., 2000, 2004).

По нашим данным, частота появления мутаций в гене *yellow* в большей степени зависела от скрещивания с линией со сцепленными Х-хромосомами, чем от наличия–отсутствия мутации в генах *spn-E*, *piwi*^{2} или *aub*.

Материалы и методы

В работе использовали линии *Drosophila melanogaster*: y^{+h}, содержащую *hobo*-элемент в генах *yellow* и *Notch*; *spn-E* (*ru*^{1} *st*^{1} *spn-E*^{1} *e*^{1} *ca*^{1}/*TM3*, *Sb*^{1}); *piwi*^{2} (*w*^{1}; *piwi*^{2}/*CyO*); *aub* (*y ac w*^{1}; *aubQC42 cn*^{1} *bw*^{1}/*CyO*); линию со сцепленными Х-хромосомами *C*(*1*)*DX*/*Y*, *y w f*.

Путем однократного скрещивания самцов линии y^{+h} с самками из линии с доминантными маркерами Cy/L; D/Sb были синтезированы линии, где Х-хромосома содержала аллель y^{+h}, а аутосомы – доминантные маркеры либо по второй, либо по третьей аутосомам. Далее скрещивая мух этих линий с мухами линий с изучаемыми мутациями *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub*, синтезировали линии y^{+h}; *spn-E*/*TM3*, *Sb*^{1}, y^{+h}; *piwi*^{2}/*Cy* и y^{+h}; *aub*/*Cy*.

Влияние мутации в гене *piwi*^{2} на нестабильность в гене y^{+h} анализировали по числу мутантных самцов, появившихся после скрещивания самцов с Х-хромосомой, содержащих ген y^{+h} и мутацию по гену *piwi*^{2}, с самками со сцепленными Х-хромосомами (рис. 1–3). Аналогичную работу проводили с мутантами по *spn-E* и *aub*.

Результаты и обсуждение

В работе анализировали влияние мутаций в генах *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* на частоту мутирования в гене *yellow*, несущем в регуляторной зоне

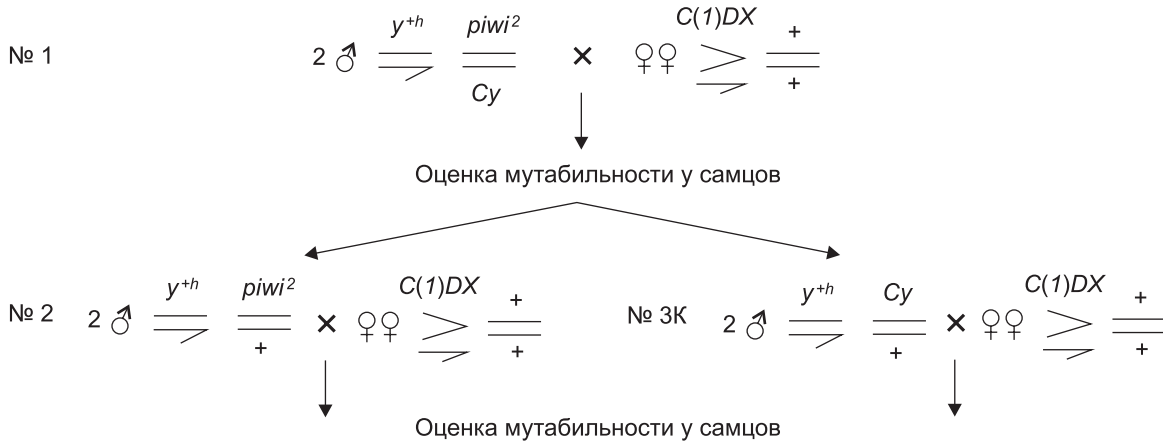

Рис. 1. Схема эксперимента по исследованию влияния гетерозигот *piwi*^{2}/+ на нестабильность y^{+h}.

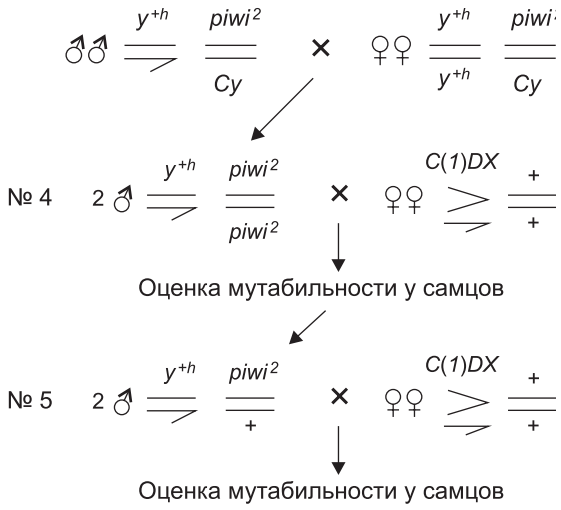

Рис. 2. Схема скрещиваний для оценки влияния гомозигот *piwi*^{2} на частоту мутирования в гене *yellow* линии y^{+h}.

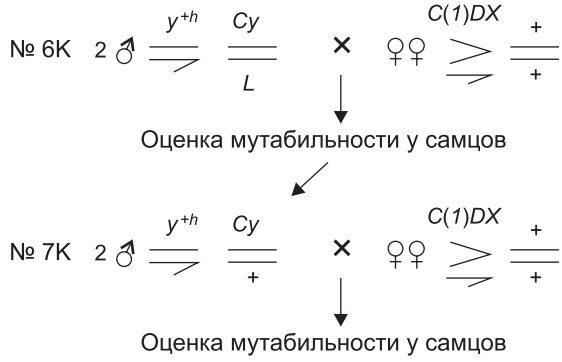

Рис. 3. Схема контрольных экспериментов для *piwi* и *aub*.

Аналогично ставился контроль для *spn-E* с линией y^{+h} D/Sb.

встройку дефектного *hobo*-элемента в линии y^{+h} *Drosophila melanogaster* (табл. 1–3). Ген *yellow* в линии y^{+h} проявляет высокую локус-специфическую нестабильность за счет того, что *hobo*-элемент, внедрившийся в этот локус, мобилен и, кроме этого, вступает в цис-рекомбинацию с другими *hobo*, расположенными на Х-хромосоме (Захаренко и др., 2000, 2004; Коваленко и др., 2006). В геном линии y^{+h} вводили с помощью скрещиваний хромосомы с мутациями в генах *spn-E*, *piwi*^{2} или *aub*, участвующие в регуляции активности повторенных последовательностей (Aravin *et al*., 2004; Vagin *et al*., 2006; Brennecke *et al*., 2007; Klenov *et al*., 2007). Анализ нестабильности в гене *yellow* проводили, скрещивая самцов линии y^{+h}, гомозиготных или гетерозиготных по анализируемым генам (*piwi*^{2} и *aub*), с самками со сцепленными Х-хромосомами. Затем оценивали количество нормальных и мутантных самцов, появившихся в результате такого скрещивания, количество семей, взятых в анализ, и количество семей, несущих особей с мутантным фенотипом (табл. 1–3). Если все мутантные самцы оказывались в одной семье, то считалось, что это результат одного генетического события. Гомозиготные самцы по мутантному гену *spn-E* обладают пониженной жизнеспособностью или не выживают вовсе, поэтому анализировали лишь влияние гетерозигот *spn-E*/+ на частоту мутирования в гене *yellow*.

Когда гены *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* находились в гетерозиготном состоянии, частоты мутирования в гене *yellow* варьировали в проведенных экспериментах от 0,1 до 0,3 % (скрещивание № 1),

Таблица 1

Влияние мутации в гене *piwi*^{2} на частоту мутирования аллеля y^{+h} у самцов различных генотипов

№ скрещивания	Генотип самцов-родителей	Число потомков	Число мутантов y^2, %	Число семей*	Число семей с мутациями, %
1	y^{+h}; *piwi*^{2}/*Cy*	2812	9 (0,3)	77	4 (5,2)
2	y^{+h}; *piwi*^{2}/+	2612	32 (1,2)	54	12 (22,2)
3К	y^{+h}; *Cy*/+	2931	23 (0,8)	69	12 (17,4)
4	y^{+h}; *piwi*^{2}/*piwi*^{2}	1229	9 (0,7)	38	5 (13,2)
5	y^{+h}; *piwi*^{2}/+	1083	8 (0,7)	41	7 (17,1)
6К	y^{+h}; *Cy*/*L*	1085	0	39	0
7К	y^{+h}; *Cy*/+	1488	21 (1,4)	34	4 (11,8)

Примечание. * Здесь и в табл. 2, 3 каждая семья – все потомство двух самцов-родителей; К – контрольные скрещивания (генотип без *piwi*^{2}).

Таблица 2

Влияние мутации в гене *aub* на частоту мутирования аллеля y^{+h} у самцов различных генотипов

№ скрещивания	Генотип самцов-родителей	Число потомков	Число мутантов y^2, %	Число семей*	Число семей с мутациями, %
1	y^{+h}; *aub*/*Cy*	2038	3 (0,2)	55	1 (1,8)
2	y^{+h}; *aub*/+	3426	25 (0,7)	64	13 (20,3)
3К	y^{+h}; *Cy*/+	3299	20 (0,6)	63	9 (14,3)
4	y^{+h}; *aub*/*aub*	509	0	15	0
5	y^{+h}; *aub*/+	2382	37 (1,6)	53	16 (30,2)

К – контрольные скрещивания (генотип без *aub*). Дополнительным контролем служили скрещивания 6К и 7К из табл. 1.

Таблица 3

Влияние мутации в гене *spn-E* на частоту мутирования аллеля y^{+h} у самцов различных генотипов

№ скрещивания	Генотип самцов-родителей	Число потомков	Число мутантов y^2, %	Число семей*	Число семей с мутациями, %
1	y^{+h}; *spn-E*/*D*	2158	2 (0,1)	60	1 (1,7)
2	y^{+h}; *spn-E*/+	2375	50 (2,1)	61	12 (19,7)
3К	y^{+h}; *D*/+	1758	61 (3,5)	56	16 (28,6)
6К	y^{+h}; *D*/*Sb*	799	0	34	0
7К	y^{+h}; *D*/+	3454	36 (1,0)	64	17 (26,6)

К – контрольные скрещивания (генотип без *spn-E*).

а в контроле (скрещивание 6К) мутантных самцов не было. В скрещивании № 2 частоты мутирования варьировали в эксперименте от 0,7 % для *aub*/+ до 2,1 % для *spn-E*, а в контроле (К3) – от 0,6 % для *aub*/+ до 3,5 % для *spn-E*. Частота семей, в которых возникали мутантные по гену *yellow* потомки, варьировала от 1,8 до 5,2 % в первом поколении

после скрещивания гетерозигот по мутациям *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* с самками со сцепленными Х-хромосомами. После второго скрещивания с самками со сцепленными Х-хромосомами доля таких семей возросла в опыте до 19–22 %, в контроле – до 14–28 %.

Частота мутирования y^{+h}, когда *piwi*^{2} находился в гомозиготе (скрещивание № 4) и в гетерозиготе (скрещивание № 5), была одинакова как по числу мутантных особей, так и по числу семей, где мутанты по гену *yellow* были обнаружены (табл. 1). Контролем для гомозигот *piwi*^{2} служит скрещивание № 6, поскольку самцы линий y^{+h}; *Cy*/*L* впервые сталкиваются с линией со сцепленными Х-хромосомами, так же, как и гомозиготы *piwi*^{2}. Частота мутирования в гене *yellow* в контроле № 6 равна нулю. Для гетерозигот из скрещивания № 5 контролем служит скрещивание № 7, где частота семей с вновь возникшими мутантами и частота мутантных потомков были на том же уровне, что и в эксперименте.

В случае гомозиготы *aub* (скрещивание № 4) мутантных потомков мы не обнаружили, возможно, потому, что в анализ было взято всего 15 семей, а у гетерозигот *aub*/+ (скрещивание № 5) частота семей, в которых возникли мутанты, и частота появления мутантных потомков были сопоставимы с результатами скрещивания № 2. То есть чем больше раундов скрещивания с самками из линии со сцепленными Х-хромосомами проходит Х-хромосома линии y^{+h}, тем более высокую частоту мутирования в гене *yellow* мы обнаруживаем. В первом скрещивании мы видели, что наличие гетерозиготы по мутациям в генах *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* сказывалось на частоте мутирования в гене *yellow* по сравнению с контролем (скрещивание № 1 и контроль № 6). В контроле для гомозиготы по *piwi*^{2} мы также не обнаружили мутаций по гену *yellow*. Однако получение гетеро- и гомозигот по генам *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* сопровождалось дополнительным скрещиванием с особями линий, несущих эти мутации, что отличает их от контрольных линий. Возможно, повышенная по сравнению с контролем частота мутирования в гене *yellow* в первом скрещивании также не связана с наличием в геноме гетерозигот по генам *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub*, а обусловлена большей гетерогенностью тестируемых геномов.

Частота мутирования в нестабильном гене может варьировать со временем. Изменение частоты мутирования в исследуемом гене сопровождается изменением числа копий и местоположением *hobo* в геноме (Захаренко и др., 2004). Самцов с нестабильной Х-хромосомой часто содержат в линиях с самками со сцепленными Х-хромосомами для того, чтобы сохранить нестабильную хромосому, поскольку в каждом следующем поколении сцепленные Х-хромосомы достаются только самкам, а самцы-потомки в таких линиях могут содержать только нестабильную Х-хромосому. Утраченную локус-специфическую нестабильность в некоторых случаях удается восстановить, скрещивая самцов таких линий с посторонними самками со сцепленными Х-хромосомами. То есть имеет значение не просто нахождение хромосом с нестабильным геном в геномах таких самок, а тот факт, что в геном вносятся хромосомы, которые не контактировали ранее с хромосомой с нестабильным геном. Скрещивания с самками этой линии индуцируют генетическую нестабильность и в других линиях (Захаренко и др., 2000; Коваленко и др., 2006). В линии $y^{2\text{-}717}$ было получено несколько производных, когда за счет рекомбинаций между двумя *hobo*-элементами был получен каскад мутантных производных, менявших фенотип от нормы к yellow-2 и обратно. Однако молекулярно-генетические характеристики гена *yellow*, несмотря на фенотипическое сходство производных, не повторялись, поскольку рекомбинации всякий раз шли с разными парами *hobo* и сопровождались новыми перемещениями *hobo*. Со временем фенотипическая нестабильность затухала, хотя молекулярно-генетические события, меняющие структуру гена *yellow*, продолжались, по крайней мере, на протяжении года.

Таким образом, на частоте мутирования в гене *yellow* в большей степени сказываются скрещивания исследуемых мух с мухами линий со сцепленными Х-хромосомами, чем наличие в геноме гетерозиготности по мутациям в генах *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* или даже гомозиготности по мутации в гене *piwi*^{2}. Либо эти мутации мало сказываются на активности *hobo*-элемента, либо в локус-специфической нестабильности гена *yellow* рекомбинации между *hobo*-элементами играют гораздо большую роль, чем скорость его перемещения.

Благодарности

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 09-04-00213а и № 09-04-00872-а, программой РАН «Биоразнообразие» Б 23.29. Линии *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* любезно предоставлены профессором В.А. Гвоздевым.

Литература

Захаренко Л.П., Захаров И.К., Волошина М.А. и др. Причина сохранения высокой нестабильности по гену *yellow* в линиях *Drosophila melanogaster*, выделенных в период «моды на мутацию» в популяции Умани // Генетика. 2004. Т. 40. № 3. С. 316–321.

Захаренко Л.П., Захаров И.К., Романова О.А. и др. «Мода на мутацию» в природной популяции *Drosophila melanogaster* Умани вызвана распространением индуцированной *hobo*-элементом нестабильной инверсии регуляторной части гена *yellow* // Генетика. 2000. Т. 36. № 6. С. 1–9.

Коваленко Л.В., Захаренко Л.П., Захаров И.К. Транспозиции *hobo*-элемента в соматических клетках *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2006. Т. 42. № 2. С. 177–184.

Aravin A.A., Klenov M.S., Vagin V.V. *et al*. Dissection of a natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line // Mol. Cell Biol. 2004. V. 24. P. 6742–6750.

Bartolomé C., Bello X., Maside X. Widespread evidence for horizontal transfer of transposable elements across *Drosophila* genomes // Genome Biol. 2009. V. 10. N 2. R22.

Brennecke J., Aravin A.A., Stark A. *et al*. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila // Cell. 2007. V. 128. P. 1089–1103.

Esnault C., Palavesam A., Pilitt K., O'Brochta D.A. Intrinsic characteristics of neighboring DNA modulate transposable element activity in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2011. V. 187. N 1 P. 319–331.

Harada K., Yukuhiro K., Mukai T. Transposition rates of movable genetic elements in *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 3248–3252.

Kapitonov V.V., Jurka J. Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. N 11. P. 6569–6574.

Klenov M.S., Lavrov S.A., Stolyarenko A.D. *et al*. Repeat-associated siRNAs cause chromatin silencing of retrotransposons in the *Drosophila melanogaster* germline // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. N 16. P. 5430–5438.

Lipatov M., Lenkov K., Petrov D.A., Bergman C.M. Paucity of chimeric gene-transposable element transcripts in the Drosophila melanogaster genome // BMC Biol. 2005. 3. 24.

Saville K.J., Warren W.D., Atkinson P.W., O'Brochta D.A. Integration specificity of the *hobo* element of *Drosophila melanogaster* is dependent on sequences flanking the integration site // Genetica. 1999. V. 105. N 2. P. 133–147.

Thibalt S.T., Singer M.A., MiyazakiI W.Y. *et al*. *P* and *piggyBac* transposons display a complementary insertion spectrum in *Drosophila*: A multifunctional tool kit to manipulate an insect genome // Nat. Genet. 2004. V. 36. P. 283–287.

Vagin V.V., Sigova A., Li C. *et al*. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline // Science. 2006. V. 313. N 5785. P. 320–324.

MUTATIONS IN GENES *spn-E*, *piwi*^{2}, AND *aub*, INFLUENCING SMALL RNA PRODUCTION, DO NOT INFLUENCE THE RATE OF MUTATIONS ASSOCIATED WITH A *hobo* INSERTION IN THE *yellow* GENE OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

L.P. Zakharenko, M.A. Voloshina

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: zakharlp@bionet.nsc.ru;
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Effects of mutations in the *spn-E*, *piwi*^{2}, and *aub* genes of *Drosophila melanogaster*, involved in small RNA production, on the mutation frequency in the highly unstable y^{+h} allele, formed by an insertion of a *hobo* copy in the regulatory region of the *yellow* gene were studied. Mutation frequencies were assessed by crossing males with the genotypes y^{+h}; *piwi*/*Cy*, y^{+h}; *piwi*/*piwi*, y^{+h}; aub/Cy and y^{+h}; *spn-E*/*TM3* to females with linked X-chromosomes. The frequency of mutations in the *yellow* gene depended to a greater extent on the cross to the strain with linked X-chromosomes than on the presence of a mutation in the *spn-E*, *piwi*^{2}, or *aub* genes. The locus-specific instability in y^{+h} allele is the sum of *hobo* transpositions and recombination events involving the *hobo* from the regulatory region of *yellow*. It appears that either the mutations under study do not affect the activity of the *hobo* copy or recombinations between *hobos* are much more significant for the locus-specific instability in *yellow* than the transposition rate.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *yellow*, *hobo*, transposable elements, *spn-E*, *piwi*^{2}, *aub*.