

РЕГУЛЯЦИЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ И ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ КЛАСТЕРОВ
piРНК В ГЕРМИНАЛЬНЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЯХ*Drosophila melanogaster* ЗАВИСИТ ОТ ГЕНА *rhino*© 2023 г. П. А. Миляева^{1,2}, А. Р. Лавренов^{1,3}, И. В. Кузьмин¹, А. И. Ким^{1,2}, Л. Н. Нефедова^{1, *}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия²Биологический факультет, университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Шэньчжэнь, 518172 Китай³Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: nefedova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 05.05.2023 г.

После доработки 17.06.2023 г.

Принята к публикации 29.06.2023 г.

Drosophila melanogaster — широко используемый объект генетики для изучения механизмов РНК-интерференции и регуляции мобильных генетических элементов (МГЭ), в частности системы piРНК-интерференции. Считается, что у *D. melanogaster* система piРНК-интерференции работает только в гонадах и существуют два пути биогенеза piРНК — с помощью одноцепочечных и двуцепочечных кластеров, содержащих дефектные копии МГЭ, транскрибируемых с одной или двух цепей соответственно. Предполагается, что функционирование двуцепочечных кластеров зависит от функции гена *rhino*, в то время как одноцепочечные кластеры транскрибируются и затем сплайсируются независимо от *rhino*. В настоящей работе мы показали, что ген *rhino* участвует в регуляции сплайсинга одноцепочечного кластера *flamenco*. Более того, система piРНК-интерференции необходима для регуляции некоторых ретротранспозонов не только в гонадах, но и в других органах.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, piРНК, *rhino*, ретротранспозоны, РНК-интерференция.

DOI: 10.31857/S0016675823120056, EDN: QDLMAL

У эукариот известны три системы РНК-интерференции, необходимые для подавления транспозиционной активности мобильных генетических элементов (МГЭ), — это системы mi-, si- и piРНК-интерференции [1–3]. Источником miРНК и siРНК могут быть одиночные вставки последовательностей МГЭ и инфицирующих клетку вирусов, в то время как источником piРНК служат как одиночные копии МГЭ, так и кластеры — скопления, как правило, дефектных копий МГЭ [4, 5].

Система piРНК-интерференции, участвующая в подавлении ретротранспозонов, хорошо изучена в тканях яичников *Drosophila melanogaster*. В клетках зародышевого пути большая часть работающих piРНК-кластеров является двуцепочечной (*42AB*, *38C*, *80EF*) [6]. Такие кластеры представлены МГЭ, не имеющими единого направления транскрипции. Их транскрипция запускается с обеих цепей с неканонических сайтов. За счет этого получают длинные транскрипты, отдельные участки которых являются антисмысловыми по отношению к мРНК МГЭ. Транскрипты двуцепочечных кластеров без сплайсинга отправляются в цитоплазму, где в околоядерной области “Нюаж” вовлекаются в цикл “пинг-понг” с последующим процессингом и пре-

образованием в piРНК [7]. Блокирование сплайсинга транскриптов таких кластеров необходимо, так как именно в интронах содержатся последовательности, необходимые для получения специфичных piРНК.

Важную роль в транскрипции и блокировании сплайсинга транскриптов двуцепочечных кластеров играет комплекс белков Rhino (Rhi), Deadlock (Del) и Cutoff (Cuff). Rhi, представитель семейства гетерохроматиновых белков Hrp1, связывается с кластером, распознавая гистоновые метки H3K9me3. Rhi взаимодействует с Del, который, в свою очередь, связывается с Cuff, и вместе они образуют комплекс RDC. Данный комплекс способствует посадке РНК-полимеразы на неканонические старты транскрипции, а также препятствует кэпированию и полиаденилированию транскриптов таких кластеров. Активный сплайсинг транскриптов двуцепочечных кластеров без работы комплекса RDC, наоборот, приводит к неправильной работе системы piРНК-интерференции и повышению экспрессии некоторых МГЭ [8].

Ген *rhino* *D. melanogaster* является настолько быстро эволюционирующим геном, что Rhi самого эволюционно близкого вида, *D. simulans*, не спо-

способен образовывать комплекс с Del *D. melanogaster* [9]. Стремительная эволюция *rhino* объясняется высокой скоростью изменчивости МГЭ. В отличие от других белков семейства Hrp1 Rhi экспрессируется в основном в гонадах как самцов, так и самок дрозофилы, и отсутствие этого белка ведет к активному сплайсингу транскриптов двуцепочечных кластеров и повышению уровня транспозиции МГЭ [6].

В соматических клетках яичников дрозофилы piRNA образуются из длинных транскриптов одноцепочечных кластеров, таких как *flamenco*. Длинные транскрипты процессируются путем альтернативного сплайсинга и последующего нарезания на piRNA. Считается, что *flamenco* транскрибируется независимо от комплекса RDC и его транскрипты перемещаются из ядра в белковый комплекс “Уб-тельце”, локализованный на внешней мембране митохондрий. После процессинга пре-piRNA модифицируются метилтрансферазой Hen1 и транспортируются в ядро в составе комплекса с белком PIWI, где происходит подавление активности ретротранспозонов на уровне транскрипции с привлечением белков для гетерохроматинизации Asterix (Arx), Hrp1a и Maelstrom (Mael) [10]. Стоит отметить, что метилтрансфераза Hen1 является неотъемлемым компонентом процессинга любых si- и piRNA как в соматических клетках зародышевой линии, так и в цикле “пинг-понг” в клетках зародышевого пути. Более того, этот фермент выполняет ту же функцию в нервной системе взрослых особей нематоды *Caenorhabditis elegans* [11]. Таким образом, кластер *flamenco* участвует исключительно в создании геновых piRNA и не принимает участия в интерференции. Вероятно, поэтому считается, что кластер в норме подвергается альтернативному сплайсингу и процессируется независимо от *rhino*. На нервной системе личинок дрозофилы было продемонстрировано, что снижение сплайсинга транскриптов этого кластера приводит к повышению количества пре-piRNA и снижению зрелых piRNA [12], однако эффект от повышения количества сплайсированных форм этого кластера для МГЭ ранее не рассматривался.

Считается, что пути siRNA и piRNA работают в гонадах, в то время как путь siRNA работает еще и в соматических тканях [4]. Однако исследования системы piRNA-интерференции на разных модельных объектах в последнее десятилетие позволили выявить функционирование этой системы не только в клетках зародышевого пути, но и в нервной системе. Так, нормальный процессинг транскриптов piRNA-кластеров необходим для обеспечения двигательной активности как личинок, так и взрослых мух *D. melanogaster*. Основными участниками контроля piRNA в нервной системе, согласно исследованию [12], являются гены *aubergine* (*aub*), *cabeza* (*caz*) и *rhino*, а также одноцепочечный кластер *flamenco*. У позвоночных и

беспозвоночных piRNA принимают участие в ответе на повреждения периферической нервной системы: у нематоды piRNA участвуют в подавлении роста аксонов в ответ на повреждение, а у мыши экспрессия piRNA повышается при повреждении нервов, и одна из piRNA отвечает за миграцию шванновских клеток [13].

Ранее было показано, что МГЭ *gypsy* повышает экспрессию в тканях головы *D. melanogaster* при мутациях в генах *aub* и *argonaute 3* (*ago3*) [14]. Ген *rhino* комплементарно взаимодействует с этими генами благодаря участию в транскрипции и сплайсинге кластеров piRNA. Таким образом, для отдельных компонентов системы piRNA было показано, что они вносят вклад в подавление экспрессии отдельных МГЭ в соматических тканях с помощью цикла “пинг-понг”.

Ранее нами была показана корреляция между снижением экспрессии *rhino* и повышением экспрессии сплайсированных форм *flamenco* у линии с фенотипом *flamenco*, SS7K, характеризующейся нарушением контроля транспозиции МГЭ *gypsy* [15]. В настоящей работе мы провели нокдаун гена *rhino* у *D. melanogaster* и измерили экспрессию наиболее изученных кластеров piRNA и МГЭ в тканях яичников, головы, корпуса (тканей, оставшихся после отделения головы и яичников) у семидневных самок, чтобы оценить роль комплекса RDC в регуляции системы piRNA-интерференции за пределами гонад, а также установить роль Rhi в регуляции синтеза piRNA не только двуцепочечных кластеров, которые работают в клетках зародышевого пути, но и одноцепочечных кластеров, которые, как считается, работают исключительно в соматических тканях гонад.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии Drosophila melanogaster и условия культивирования

Для нокдауна гена *rhino* использовали систему UAS-GAL4, основанную на скрещивании драйверной и трейсерной линий *D. melanogaster*, несущих соответственно конструкцию с геном, который кодирует белок GAL4 и находится под тканеспецифичным промотором, и конструкцию со шпилькой для siRNA-интерференции под промотором UAS. Для создания гибридов с нокдауном исследуемого гена использовали самок линии *rhi* (Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) ID 101620) и самцов линии *tubP-Gal4* (*y1w**; P{*tubP-GAL4*}LL7/TM3, Sb1Ser1; Bloomington Drosophila Stock Center BL5138; запускает нокдаун во всех тканях). В качестве контроля использовали гибрид самок линии *w*[118] (на ее основе была получена линия *rhi*) и самцов *tubP-Gal4*. Гибриды от скрещивания драйверной и трейсерной линий культивировали при температуре 27°C. Данная

температура была оптимальной для работы драйверной конструкции. Эксперимент проводили в трех повторях.

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени

Выделение РНК семидневных самок с нокдауном гена *rhino* и самок контрольных гибридов проводили из тканей яичников, головы и корпуса с помощью реактива ExtractRNA (Евроген) после вскрытия мух в буфере PBS. Перед постановкой реакции обратной транскрипции образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific). Для обратной транскрипции использовали набор MMLV-RT Kit (Евроген). Обратную транскрипцию ставили со случайным праймером (так как экспрессия большинства кластеров в нашем опыте не превышает экспрессию МГЭ). ПЦР проводили в присутствии SYBR Green I (Евроген) в амплификаторе MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad). В опыте анализировали относительную экспрессию ретротранспозонов *gypsy*, *Tirant*, *roo*, *scopia*, *blood*, *HeT-A*, *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* и кластеров *38C*, *20A*, *42AB*, *flamenco*, нормированную на экспрессию генов α *Tub84D*, *Rpl40* и *EloB*. Для контроля нокдауна гена *rhino* использовали праймеры к соответствующему гену (табл. 1). Статистическую обработку результатов ПЦР проводили с помощью критерия Манна–Уитни в среде программирования R. В каждой выборке использовали от пяти до 14 образцов. Праймеры для кластера *42AB* были взяты из работы Zh. Zhang и соавт. [6], праймеры для кластеров *38C* и *20A* были взяты из работы J. Nig и соавт. [16], праймеры для кластера *flamenco* были подобраны нами к сплайсированной форме транскрипта согласно сиквенсу из базы данных NCBI (Gene ID: 26067356) [17]. Все праймеры подобраны к специфичным частям кластеров и не отжигаются на копиях мобильных элементов, находящихся в других точках генома.

Для оценки экспрессии piРНК картировали piРНК из базы данных (<https://www.pirnadb.org/>) на аннотированную последовательность кластера *flamenco* и выбрали piРНК *11620*, так как она оказалась картирована в интрон кластера. В качестве референсной РНК использовали miРНК *U6*. Для выделения микроРНК использовали набор для выделения суммарной РНК и микроРНК из реагента “Лира” (Biolabmix). Выборки содержали до шести образцов. Обратную транскрипцию проводили с помощью специфичного шпилечного праймера. Для количественной ПЦР использовали праймеры к шпильке и к целевой РНК (табл. 1). ПЦР проводили в присутствии SYBR Green I (Евроген) в амплификаторе MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad). В качестве референсной РНК использовали miРНК *U6*.

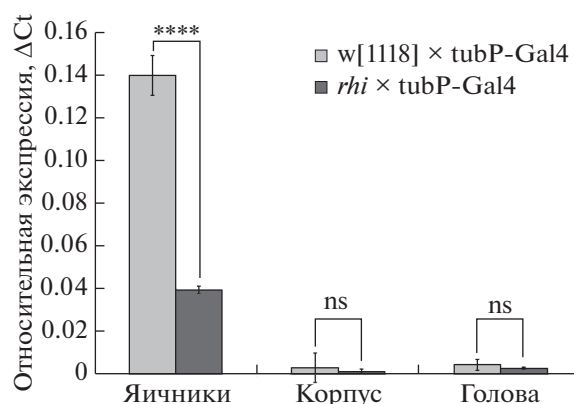


Рис. 1. Относительная экспрессия гена *rhino* в тканях яичников, корпуса и головы у семидневных самок гибридов с нокдауном гена *rhino* и контрольных гибридов (**** — $p < 0.0001$ по критерию Манна–Уитни; ns, not significant — статистически незначимое изменение).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Зависимость сплайсинга кластеров piРНК от уровня экспрессии гена *rhino*

Для подтверждения роли гена *rhino* в контроле активности ретротранспозонов разных семейств мы получили гибриды с его нокдауном от скрещивания линий *D. melanogaster* *rhi* и *tubP-Gal4* и проанализировали экспрессию этого гена в тканях яичников, головы и корпуса в сравнении с теми же тканями у контрольных гибридов (*w[1118] × tubP-Gal4*) (рис. 1). Как и ожидалось, в контрольных гибридах экспрессия гена *rhino* была наиболее высокой в тканях яичников, где система piРНК-интерференции работает наиболее активно. Примечательно, что мы также обнаружили экспрессию гена *rhino* в небольшом количестве в тканях корпуса и головы. У гибридов с нокдауном гена *rhino* мы увидели подавление экспрессии этого гена во всех тканях, однако статистически значимым оно было только в яичниках. Мы предполагаем, что это могло быть вызвано низкой экспрессией *rhino* в тканях корпуса и головы, а также различиями в контроле. Так как в контроле видим стабильно низкую экспрессию *rhino* считаем, что в этих тканях нокдаун этого гена был осуществлен успешно.

Далее мы провели сравнительный анализ экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм предшественников piРНК, транскрибирующихся с одно- и двуцепочечных кластеров и участвующих в сайленсинге МГЭ. Для анализа мы использовали наиболее изученные кластеры piРНК (*flamenco* (одноцепочечный) и *42AB* (двуцепочечный)) [18, 19] (рис. 2, а, б).

Для плохо изученных кластеров *20A* (одноцепочечный) и *38C* (двуцепочечный) мы провели анализ только несплайсированных форм, по-

Таблица 1. Праймеры для обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР

Название	Прямой праймер	Обратный праймер
Гены		
<i>αTub84D</i>	5'-GTGCATGTTGTCCAAACASSAC-3'	5'-AGAACTCTCCCTCCCTCCATA-3'
<i>EloB</i>	5'-GCACAAACATACACATCAGC-3'	5'-TTTCTACTTCTCGCTTGCACCC-3'
<i>RpL40</i>	5'-CTGCGTGTGTGATCATTTG-3'	5'-CAGGTTGTGGTGTGTCTCC-3'
<i>rhino</i>	5'-CTTCGAGTCGGAGGTCCTTCA-3'	5'-CTGCACCGACCTTGGAAATGTT-3'
Кластеры		
<i>flamenco-spliced</i>	5'-CATCAGCTCAGCAGCAGTGTA-3'	5'-AGTCCAAATGCTCGCTTGAAA-3'
<i>flamenco-unspliced</i>		5'-GACTTAACACTTACCGCTTGAAA-3'
<i>42AB-spliced</i>	5'-GCAGTTGCGCTCTCTCCCTT-3'	5'-TGGGTCAAAGTGCAGCAGTTT-3'
<i>42AB-unspliced</i>		5'-TACGGGAATATAATCGCAGCAGTT-3'
<i>38C 1</i>	5'-AATGGCTAGTTGCTACCAGACAG-3'	5'-CGGGTCTTCTCTCAAACGCAATC-3'
<i>38C 2</i>	5'-SACAAAATGGCCGCTGGAAA-3'	5'-AGCCAAACCCCTGTGTGTGA-3'
<i>20A</i>	5'-GCCTACGCAGAGGCCCTAAGT-3'	5'-CAGATGTGGTCCAGTTGTGTC-3'
Ретротранспозоны		
<i>gyrus</i>	5'-CTGCTGAAAAGACGGCATTTATC-3'	5'-AGAACTTTGCCTTGCCSAGAT-3'
<i>Tirant</i>	5'-AACGCTATTCAATTCTGCAAC-3'	5'-AGGGTTCTCTCTAATACTACGTC-3'
<i>copia</i>	5'-CTTCAGTGATGGACAACCTG-3'	5'-CAGTGTAACTCTCATGGTTCAT-3'
<i>roo</i>	5'-ACAGATTCCCACCTTCTTTG-3'	5'-AGCCGAGGAGTAATGAGTA-3'
<i>blood</i>	5'-ATGCGACAACGATACAGG-3'	5'-TTTGTTCAGCATTTATCGGCG-3'
<i>HeT-A</i>	5'-TCAGGATACAGGCAAGGAC-3'	5'-CGACTATCCACGAGCATGG-3'
<i>TART-A</i>	5'-GCAGCAGTTTCCATTGTGAC-3'	5'-AAGAACAACACCATCGCTTG-3'
<i>TART-B</i>	5'-ATAGGGTATGGCACGAAAGG-3'	5'-GGGCAGACCAAGTTTATCC-3'
<i>TART-C</i>	5'-ATAGGGTATGGCACGAAAGG-3'	5'-AAGTAGTGGTCCGAGATTGTC-3'
Шпилечные праймеры для ОТ		
<i>U6</i>	5'-CTCAACTGGTGTCTGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAAAATGTGG-3'	
<i>11620</i>	5'-CTCAACTGGTGTCTGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGATGGCA-3'	
Праймеры для микроРНК		
Универсальный праймер для шпильки		5'-ACTGGTGTCTGTTGGAGTCT-3'
<i>U6</i>	5'-GCTGGGATACAGAGAAAGATTAG-3'	
<i>11620</i>	5'-GCTGGGTCAACTAGTATTCTTG-3'	

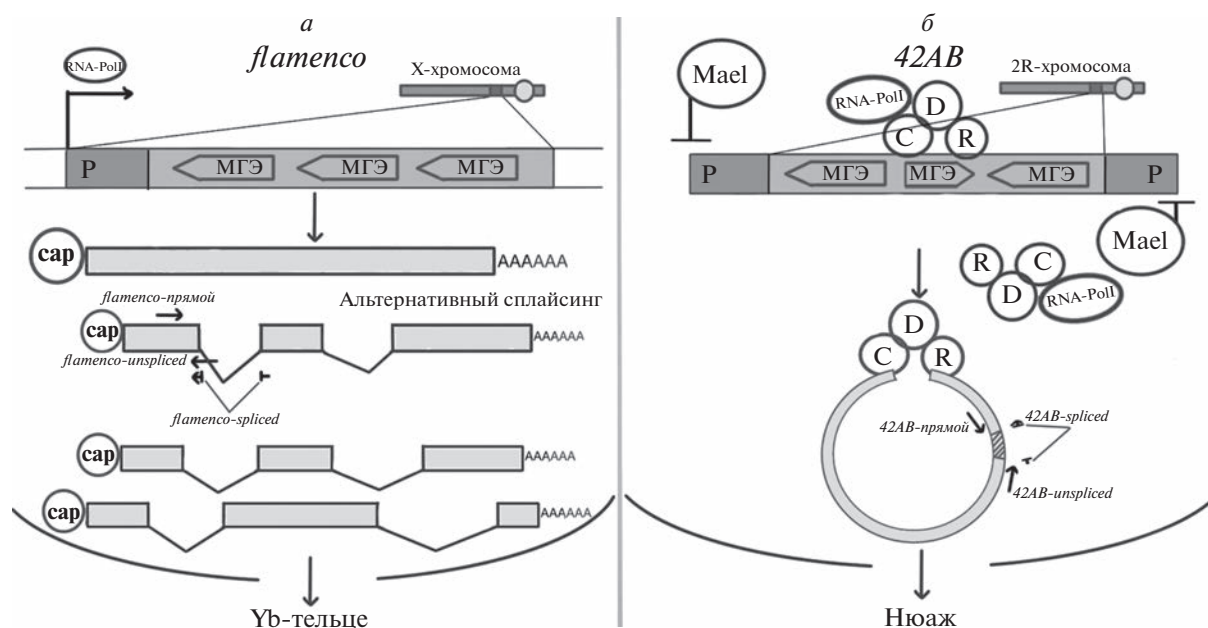


Рис. 2. Регуляции одноцепочечных и двуцепочечных кластеров *flamenco* и *42AB* и схемы локализации праймеров для выявления сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов. *a* – особенности транскрипции одноцепочечных кластеров: транскрипция идет с канонического промотора в одном направлении, транскрипты сплайсируются (праймеры для отличия сплайсированных и несплайсированных форм: *flamenco-прямой* (общий праймер), *flamenco-spliced* (для сплайсированной формы), *flamenco-unspliced* (для несплайсированной формы)); *б* – особенности транскрипции двуцепочечных кластеров: транскрипция идет с неканонических промоторов в обоих направлениях за счет комплекса RDC и белка Mael, транскрипты не сплайсируются, так как RDC блокирует экзипирование и полиаденилирование транскриптов (праймеры для отличия сплайсированных и несплайсированных форм: *42AB-прямой* (общий праймер), *42AB-spliced* (для сплайсированной формы), *42AB-unspliced* (для несплайсированной формы)). P – промотор.

скольку альтернативный сплайсинг для них пока не показан. Анализ для кластера *38C* проводили в двух точках, чтобы определить, равнозначно ли отразится на экспрессии разных частей кластера снижение экспрессии *rhino*.

Измерив относительную экспрессию несплайсированных форм кластеров *20A*, *38C*, *42AB* и *flamenco* между тканями контрольных гибридов и гибридов с нокдауном *rhino*, мы в большинстве случаев не обнаружили значимого изменения экспрессии этих кластеров при снижении экспрессии *rhino* (рис. 3,а). Исключение составило изменение экспрессии кластеров *42AB*, *38C* и *20A* в тканях корпуса. Возможно, это связано с особенностями регуляции кластеров в этих тканях. Примечательно, что в яичниках, основном месте работы кластеров рiРНК, при нокдауне *rhino* повышается экспрессия только сплайсированных форм кластеров *flamenco* и *42AB*. Это наводит на мысль, что *rhino* может регулировать и сплайсинг *flamenco*.

При сравнении относительной экспрессии сплайсированных и несплайсированных форм кластера *42AB*, которые являются мишенью Rhi, мы увидели значительное повышение количества сплайсированных форм во всех типах тканей гибридов с нокдауном *rhino* относительно контроля

(рис. 3,б). Более того, значительное повышение экспрессии сплайсированных форм по отношению к экспрессии несплайсированных мы также обнаружили для кластера *flamenco*, который, в отличие от остальных кластеров, у взрослых самок экспрессируется только в яичниках. Однако при подсчете отношения количества сплайсированных форм к несплайсированным мы обнаружили, что при нокдауне *rhino* это соотношение повышается не только для кластера *42AB* в яичниках и голове, но и для кластера *flamenco* в яичниках, хотя уровень значимости в случае последнего ниже.

Мы также оценили экспрессию рiРНК *11620*, которая картирована в интроне кластера *flamenco*, однако не нашли различий между контролем и мутантом с нокдауном *rhino* (рис. 3,в).

Таким образом, роль гена *rhino* не ограничивается только генеративными и соматическими тканями яичников, но и распространяется на другие соматические ткани, где *rhino* так же, как и в тканях яичников, регулирует сплайсинг кластеров рiРНК. Помимо этого мы не исключаем, что процессинг транскриптов кластера *flamenco* может зависеть от *rhino* так же, как процессинг транскриптов кластера *42AB*. Однако на уровень экспрессии рiРНК из этого кластера повышенная частота сплайсинга, вероятно, не влияет.

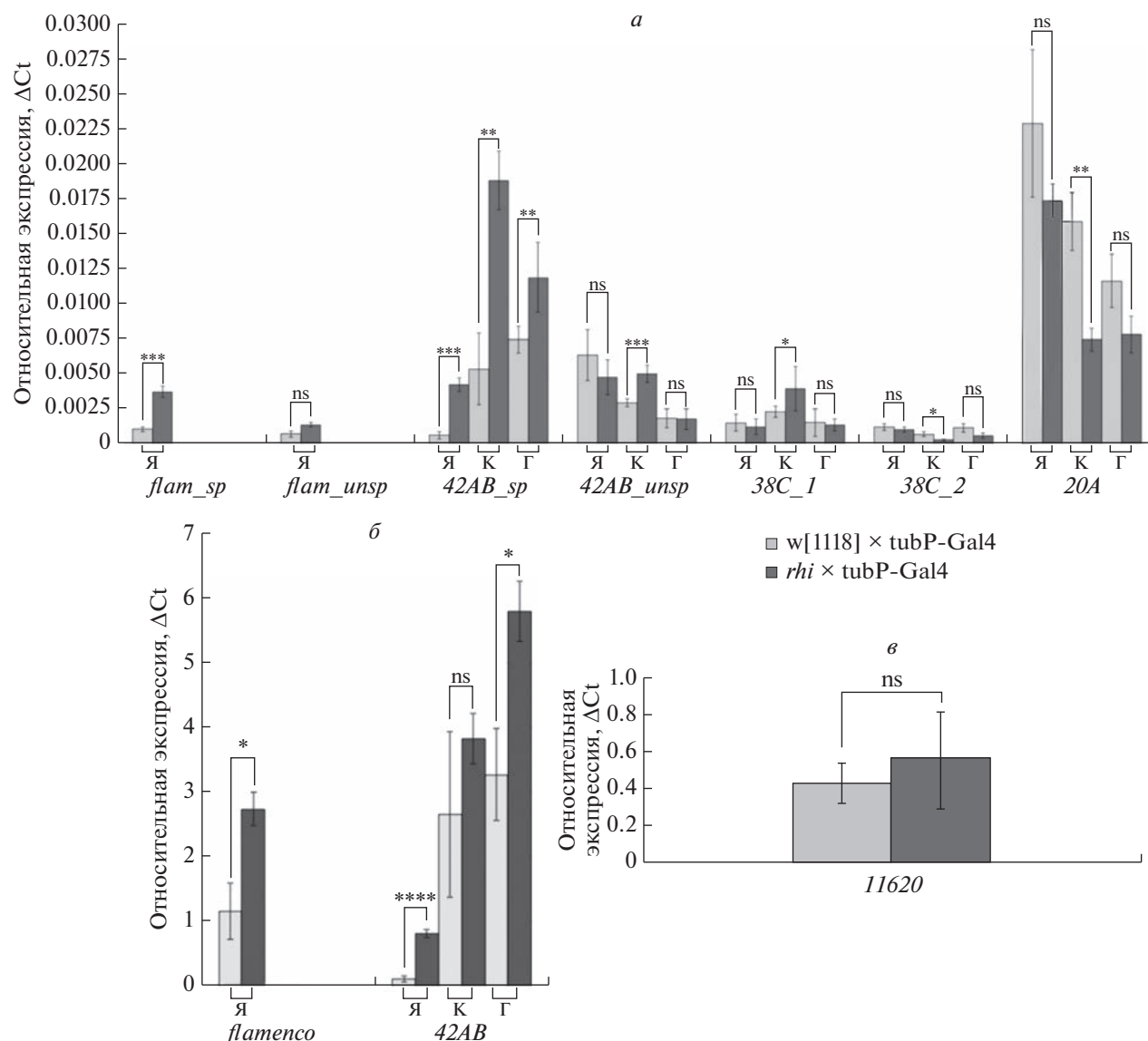


Рис. 3. Относительный уровень транскрипции различных кластеров piРНК в тканях яичников, головы и корпуса. *а* – относительный уровень транскрипции сплайсированных и несплайсированных форм одноцепочечных и двуцепочечных кластеров; *б* – соотношение уровней транскрипции сплайсированных и несплайсированных форм транскриптов кластеров *flamenco* (одноцепочечный) и *42AB* (двуцепочечный); *в* – относительный уровень транскрипции piРНК *11620* (кластер *flamenco*) в яичниках. Для рис. 3, 4: Я – яичники, К – корпус, Г – голова (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$ по критерию Манна–Уитни; ns, not significant – статистически незначимое изменение).

Зависимость уровня экспрессии ретротранспозонов от уровня экспрессии гена *rhino*

Далее мы провели исследование транскрипции МГЭ в тканях нокдаун-мутанта по гену *rhino* и проанализировали взаимосвязь транскрипции МГЭ с уровнем сплайсированных/несплайсированных форм исследуемых кластеров. Для анализа были выбраны ДКП-ретротранспозоны, которые ранее демонстрировали повышение экспрессии в ответ на стресс либо повышали экспрессию в тканях головы при мутациях центральных участников цикла “пинг-понг”, *aub* либо *ago3*, по данным

P. Perrat и соавт. [14]: *gypsy*, *roo*, *copia*, *Tirant* и *blood*. Также мы взяли несколько теломерных LINE-элементов, которые, как показано ранее, по-разному реагируют на снижение экспрессии *rhino*: *HeT-A*, *TART-A*, *TART-B* и *TART-C* [20].

С помощью базы данных FlyBase (<http://flybase.org>) [21] мы проверили наличие копий изучаемых нами ретротранспозонов в исследуемых кластерах (*flamenco*, *42AB*, *20A* и *38C*) и обнаружили, что в этих кластерах присутствуют только копии ДКП-ретротранспозонов, в то время как теломерные LINE-элементы в них не представлены. Кла-

стер *flamenco* содержит ДКП-ретротранспозон *gypsy*, в кластере *20A* есть копии *roo*, *copia* и *blood*, кластер *42AB* содержит *gypsy*, *roo* и *Tirant*, а в кластере *38C* находятся *gypsy*, *copia* и *roo*.

ДКП-ретротранспозоны и теломерные LINE-элементы осуществляют транспозицию путем репликативного синтеза, однако в отличие от ДКП-ретротранспозонов элементы *HeT-A*, *TART-A*, *TART-B* и *TART-C* встраиваются после районов TAS в теломеры, замещая таким образом функцию теломеразы. LINE-элемент *HeT-A* в ходе эволюции утерял рамку считывания, кодирующую эндонуклеазу и обратную транскриптазу, поэтому способен осуществлять транспозицию только за счет белков, кодируемых родственными LINE-элементами. В настоящее время считается, что *rhino* запускает транскрипцию не только с кластеров, но и с одиночных копий как ДКП-ретротранспозонов, так и LINE-элементов, однако его роль в транскрипции одноцепочечных кластеров и в соматических тканях за пределами гонад остается неизученной [22].

Мы обнаружили, что в контрольных гибридах ретротранспозоны по-разному экспрессируются в тканях яичников, корпуса и головы. Большинство исследованных МГЭ закономерно экспрессируются на более низком уровне в яичниках по сравнению с другими тканями. Однако исключение составил МГЭ *Tirant*, который практически не работает в тканях корпуса и головы, в отличие от яичников. При этом он, скорее всего, содержится в двуцепочечном кластере *42AB*. Также следует отметить, что большинство ретротранспозонов имеют различный уровень транскрипции в голове и тканях корпуса, что может указывать на различный характер регуляции транскрипции МГЭ в разных соматических тканях.

При нокдауне *rhino* ДКП-ретротранспозоны *gypsy*, *copia* и теломерные LINE-элементы *HeT-A* и *TART-C* значительно повышают уровень экспрессии в тканях яичников и корпуса. Более того, теломерный LINE-элемент *TART-B* значительно повышает свою экспрессию не только в тканях яичников, но и во всех соматических тканях, в то время как другой теломерный ретротранспозон, *TART-A*, только в тканях головы (рис. 4, а, б). Для ДКП-ретротранспозона *blood* и *Tirant* мы обнаружили падение экспрессии только в одной из исследуемых тканей. Для ДКП-ретротранспозона *roo* мы обнаружили падение экспрессии в тканях корпуса, в то время как в тканях головы изменений не было.

Таким образом, изменения в считывании кластеров могут приводить к повышению уровня транскрипции одних ретротранспозонов и к его снижению у других. Возможно, что при снижении экспрессии *rhino* транскрипция кластеров изменяется и либо сплайсированные транскрип-

ты способны быть источником рiРНК против некоторых ретротранспозонов, либо эти МГЭ активно подавляются системой siРНК-интерференции, куда могут направляться транскрипты кластеров после сплайсинга. Более того, мы увидели повышение транскрипции одних участков кластеров и снижение других, что может быть причиной усиления образования пре-si и рiРНК против *roo*, но падения количества антисмысловых транскриптов против *gypsy*, *copia*, *TART-B*, *TART-C* и *HeT-A*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Белок Rhi входит в состав комплекса RDC, взаимодействуя гетерохроматиновыми метками H3K9Me3, маркирующими кластеры рiРНК [10]. С помощью хромотеневого (chromoshadow) домена Rhi взаимодействует с белком Del, который, в свою очередь, связывается с белком Cuff. Роль Cuff заключается в конкурировании за кэп на 5'-конце и препятствовании полиаденилированию транскрипта рiРНК. Кроме того, Cuff взаимодействует с комплексом TREX, который отвечает за транспорт пре-рiРНК из ядра. Таким образом, Rhi является фундаментом для построения комплекса RDC, который необходим для запуска транскрипции двуцепочечных кластеров с неканонических сайтов, участвуя в транскрипции рiРНК как с двуцепочечных кластеров, так и с единичных вставок ретротранспозонов. Новые ретротранспозоны становятся кластерами после присоединения меток H3K9me3 благодаря привлечению гетерохроматиновых белков с помощью PIWI и препятствию началу транскрипции с канонических сайтов белком Mael [9, 19, 23–25].

В нашей работе мы продемонстрировали, что функция гена *rhino* необходима для функционирования как двуцепочечных, так и одноцепочечных кластеров. Мы обнаружили, что снижение экспрессии *rhino* приводит к активному сплайсингу транскриптов одноцепочечного кластера *flamenco* так же, как и двуцепочечного кластера *42AB* (при этом экспрессия несплайсированных форм кластеров в яичниках остается на прежнем уровне), что указывает на возможную зависимость процессинга транскриптов *flamenco* от комплекса RDC, фундаментом которого является *rhino*. Однако изменений в экспрессии рiРНК этого кластера мы не наблюдаем. Подобные эффекты наблюдали и другие исследователи, изучая вопрос взаимодействия *rhino* с кластером *flamenco* с помощью ChIP-seq [6, 26]. В данных работах взаимодействие *flamenco* и *rhino* не было достоверно установлено, однако в нашем случае мы видим слабое влияние нокдауна *rhino*, оказываемое на сплайсинг. Так как транскрипция кластеров — это сложный процесс, который не до конца изучен, мы не исключаем, что кластер *flamenco* может обладать минорными

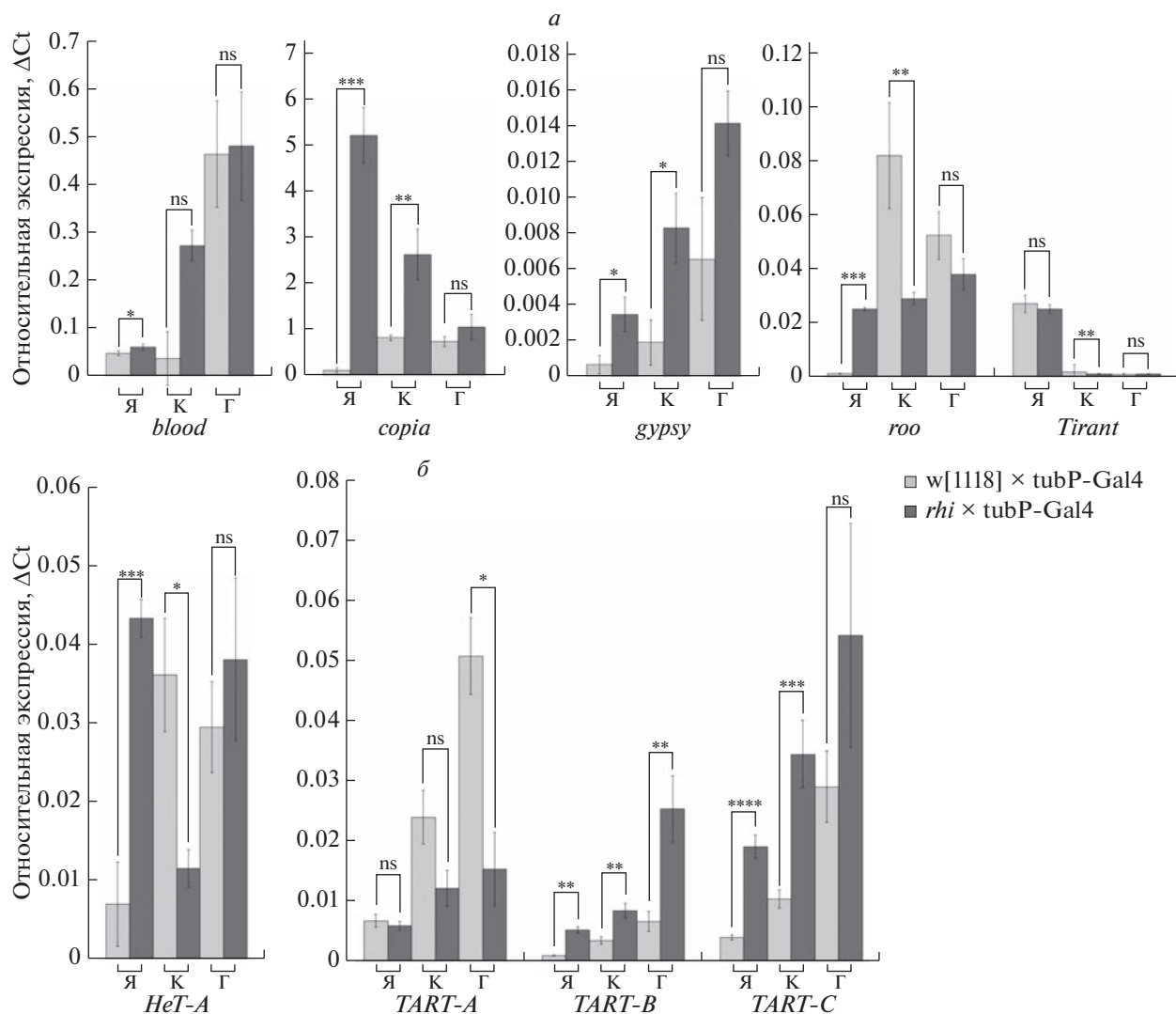


Рис. 4. Относительная экспрессия различных ретротранспозонов в тканях яичников, головы и корпуса. *а* — относительная экспрессия ДКП-ретротранспозонов; *б* — относительная экспрессия теломерных LINE-элементов.

механизмами регуляции. Например, кластер *42AB* транскрибируется с неканонических сайтов только в одном направлении и требует присутствия комплекса RDC только для транскрипции одной из цепей [27]. Таким образом, в нормальных условиях присутствует некоторое количество сплайсированных и несплайсированных форм кластеров. При нокдауне *rhino* баланс сдвигается в сторону увеличения количества сплайсированных форм, и вероятно происходит вырезание участков, которые в норме используются для процессинга piРНК. Повышение количества сплайсированных форм кластера *42AB* в тканях яичников и головы в ответ на понижение экспрессии *rhino* подтверждает наше предположение, что кластеры могут выполнять роль источника piРНК и в соматических тканях. В работах других исследователей было показано, что *rhino* экспрессируется в

соматических клетках и в клетках зародышевого пути яичников дрозофилы [28]. Считается, что наличие сплайсинга приводит к отправке транскриптов по пути siРНК, что было показано для кластеров *42AB* и *flamenco* в голове у дрозофилы [29]. Возможно, при отсутствии *rhino* система siРНК-интерференции частично замещает piРНК-интерференцию.

Показано, что одиночные копии I-элемента, относящегося к классу LINE-элементов, могут играть роль источников piРНК, причем эти кластеры делятся на сильные и слабые в зависимости от обогащения данных участков генома белком Rhi. Более того, старые копии I-элемента в линии R (чувствительна к I-элемент-индуцируемому гибридомному дисгенезу) могут являться источниками первых piРНК для установки меток H3K9me3 на новых инсерциях [22]. Также источниками

piРНК может служить сателлитная ДНК с метками H3K9me3; транскрипты с таких участков присутствуют не только в гонадах, но и различных тканях тела [18]. Также известно, что у дрозофилы некоторые кластеры транскрибируются полоспецифично [30].

В настоящей работе мы увидели, что снижение экспрессии *rhino* сказывается неоднозначно на экспрессии различных ретротранспозонов в соматических тканях. Большинство ретротранспозонов отреагировали на снижение экспрессии данного гена только в яичниках. Ретротранспозоны *coria*, *gypsy*, *TART-C* и *HeT-A* повысили уровень экспрессии только в гонадах и корпусе, а ретротранспозон *TART-B* начал активно экспрессироваться во всех тканях.

Известно, что теломерные сателлитные районы (TAS), а также теломерные транспозоны *HeT-A*, *TAHRE* и *TART* являются *rhino*-зависимыми источниками piРНК и транскрибируются с двух цепей [22]. Более того, гетерохроматиновые метки H3K9me3 обнаруживаются у дрозофилы и на теломерах в соматических тканях [20]. Повышение активности теломерных транспозонов не обязательно приводит к удлинению теломер за счет активной транспозиции. Так, мутация гена *hiphop* (привлекает белок Hrp1a для метилирования участков, содержащих МГЭ) приводит к значительному увеличению экспрессии теломерных ретротранспозонов без повышения транспозиционной активности [22]. Показано, что мутации генов *spnE* и *enok* системы piРНК-интерференции приводят к повышению экспрессии различных семейств ретротранспозонов, включая теломерные [8].

Регуляция различных ретротранспозонов может быть тканеспецифичной, что мы наблюдаем в случае ретротранспозонов *coria*, *TART-C*, *HeT-A*, *gypsy* и *TART-B*, первые четыре из которых регулируются компонентами системы piРНК только в яичниках и корпусе, а последний — во всем теле. Мы предполагаем, что различия в экспрессии ретротранспозонов в разных тканях единого организма могут зависеть как от работы кластеров в этих тканях, так и от дополнительных факторов транскрипции.

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику Института молекулярной генетики РАН М.С. Кленову за предоставление линии *ghi* и старшему научному сотруднику Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН Ю.Е. Воронцовой за предоставление линии *tubP-Gal4*.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Park E.G., Ha H., Lee D.H. et al. // Genomic analyses of non-coding RNAs overlapping transposable elements and its implication to human diseases // Intern. J. Mol. Sciences. 2022. V. 23. P. 8950. <https://doi.org/10.3390/ijms23168950>
2. Schwarz D.S., Hátvágner G., Haley B., Zamore P.D. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the drosophila and human RNAi pathways // Mol. Cell. 2002. V. 10. P. 537–548. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00651-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00651-2)
3. Guerreiro G.M.P. What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome // Heredity. 2012. V. 108. P. 461–468. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.89>
4. Carthew R.W., Sontheimer E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs // Cell. 2009. V. 136. P. 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
5. Yamanaka S., Siomi M.C., Siomi H. PiRNA clusters and open chromatin structure // Mobile DNA. 2014. V. 5. P. 22. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-5-22>
6. Zhang Zh., Wang J., Schultz N. et al. The HP1 homolog Rhino anchors a nuclear complex that suppresses piRNA precursor splicing // Cell. 2014. V. 157. № 6. P. 1353–1363. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.030>
7. Claycomb J.M. Emerging from the Clouds: Vasa heli-case sheds light on piRNA amplification // Dev. Cell. 2014. V. 29. P. 632–634. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.009>
8. Tsai S.-Y., Huang F. Acetyltransferase Enok regulates transposon silencing and piRNA cluster transcription // PLoS Genetics. 2021. V. 17. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009349>
9. Yu B., Lin Y.A., Parhad S.S. et al. Structural insights into Rhino–Deadlock complex for germline piRNA cluster specification // EMBO Reports. 2018. V. 19. <https://doi.org/10.15252/embr.201745418>
10. Théron E., Dennis C., Brassat E., Vauray C. Distinct features of the piRNA pathway in somatic and germ cells: From piRNA cluster transcription to piRNA processing and amplification // Mobile DNA. 2014. V. 5. № 28. <https://doi.org/10.1186/s13100-014-0028-y>
11. Kim K.W., Tang N.H., Andrusiak M.G. et al. A neuronal piRNA pathway inhibits axon regeneration in *C. elegans* // Neuron. 2018. V. 97(3). P. 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.014>
12. Wakisaka K.T., Tanaka R., Hirashima T. et al. Novel roles of drosophila FUS and Aub responsible for piRNA biogenesis in neuronal disorders // Brain Research. 2019. V. 1708. P. 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.028>
13. Kim K.W. PIWI proteins and piRNAs in the nervous system // Mol. Cells. 2019. V. 42(12). P. 828–835. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.014>
14. Perrat P.N., DasGupta Sh., Wang J. et al. Transposition driven genomic heterogeneity in the drosophila brain // Science. 2013. V. 340(6128). P. 9195. <https://doi.org/10.1126/science.1231965>

15. Лавренов А.Р., Неведова Л.Н., Романова Н.И., Ким А.И. Экспрессия генов семейства HP1 и их возможная роль в формировании фенотипа flamenco у *D. melanogaster* // Биохимия. 2014. Т. 79. № 11. С. 1554–1560.
16. Hur J.K., Luo Y., Moon S. et al. Splicing-independent loading of TREX on nascent RNA is required for efficient expression of dual-strand piRNA clusters in *Drosophila* // Genes & Development. 2016. V. 30. P. 840–855. <https://doi.org/10.1101/gad.276030.115>
17. Sayers E.W., Bolton E.E., Brister J.R. et al. Database resources of the national center for biotechnology information // Nucl. Ac. Res. 2022. V. 50. (D1):D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
18. Wei X., Eickbush D.G., Speece I., Larracuenta A.M. Heterochromatin-dependent transcription of satellite DNAs in the *Drosophila melanogaster* female germline // eLife. 2021. V. 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.62375>
19. Chang T.H., Mattei E., Gainetdinov I. et al. Maelstrom represses canonical polymerase II transcription within bi-directional piRNA clusters in *Drosophila melanogaster* // Mol. Cell. 2019. V. 73. P. 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.038>
20. Radion E., Morgunova V., Ryazansky S. et al. Key role of piRNAs in telomeric chromatin maintenance and telomere nuclear positioning in *Drosophila* germline // Epigenetics & Chromatin. 2018. V. 11:40. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0210-4>
21. Gramates L.S., Agapite J., Attrill H. et al. FlyBase: A guided tour of highlighted features // Genetics. 2022. V. 220. № 4. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac035>
22. Cui M., Bai Y., Li K., Rong Y.S. Taming active transposons at *Drosophila* telomeres: The interconnection between HipHop's roles in capping and transcriptional silencing // PLoS Genetics. 2021. V. 17(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009925>
23. Sato K., Siomi M.C. Two distinct transcriptional controls triggered by nuclear Piwi-piRISCs in the *Drosophila* piRNA pathway // Curr. Op. in Structural Biology. 2018. V. 53. P. 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.06.005>
24. Zhang G., Tu S., Yu T. et al. Co-dependent assembly of *Drosophila* piRNA precursor complexes and piRNA cluster heterochromatin // Cell Reports. 2018. V. 24. P. 3413–3422. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.081>
25. Akulenko N., Ryazansky S., Morgunova V. et al. Transcriptional and chromatin changes accompanying de novo formation of transgenic piRNA clusters // RNA. 2018. V. 24. № 4. P. 574–584. <https://doi.org/10.1261/rna.062851.117>
26. Klattenhoff C., Xi H., Li C. et al. The *Drosophila* HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters // Cell. 2009. V. 138. № 6. P. 1137–1149. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.014>
27. Parhad S.S., Yu T., Zhang G. et al. Adaptive evolution targets a piRNA precursor transcription network // Cell Reports. 2020. V. 30. № 8. P. 2672–2685. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.109>
28. Volpe A.M., Horowitz H., Grafer C.M. et al. *Drosophila* rhino encodes a female-specific chromo-domain protein that affects chromosome structure and egg polarity // Genetics. 2001. V. 159. P. 1117–1134. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.3.1117>
29. Chung W.-J., Okamura K., Martin R., Lai E.C. Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *Drosophila* transposons // Curr. Biology. 2008. V. 18. P. 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.05.006>
30. Chen P., Luo Y., Aravin A.A. RDC complex executes a dynamic piRNA program during *Drosophila* spermatogenesis to safeguard male fertility // PLoS Genetics. 2021. V. 17(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009591>

Regulation of Uni-Strand and Dual-Strand piRNA Clusters in Germ and Somatic Tissues in *Drosophila melanogaster* under Control of *rhino*

P. A. Milyaeva^{a, b}, A. R. Lavrenov^{a, c}, I. V. Kuzmin^a, A. I. Kim^{a, b}, and L. N. Nefedova^{a, *}

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bFaculty of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, Longgang District, Shenzhen, 518172 China

^cSevertsov Institute of Ecology and Evolution of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: nefedova@mail.bio.msu.ru

Drosophila melanogaster is a common genetic object for research of RNA-interference pathways and mobile elements regulation. Nowadays taking a part in control of retrotransposon expression the system of piRNA-interference well studied in ovary tissues. It is strongly believed that *D. melanogaster* piRNA-interference is used for retrotransposon suppression only in gonads, and two distinct pathways of piRNA biogenesis exist. Both mechanisms use transcripts of piRNA-clusters (accumulations of truncated and defect mobile elements copies): from unstrand clusters in the first case and from dualstrand clusters in the second, transcribed with one or both DNA chains correspondingly. It is well-known that proper dualstrand clusters function depends on the gene *rhino*, while unstrand clusters are transcribed *rhino*-independent and transcripts are spliced. In this paper we show that *rhino* participates in unstrand flamenco transcripts splicing and the piRNA-interference significance for regulation of several retrotransposons not only in gonads, but in other organs.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, piRNA, *rhino*, retrotransposons, RNA-interference.