ГЕНЕТИКА, 2024, том 60, № 4, с. 34–46

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 575.164

ФУНКЦИИ ХЕЛИКАЗЫ MLE *Drosophila melanogaster* ВНЕ ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА И ПЛЕЙОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ МУТАЦИИ *mle[9]*

© 2024 г. Г. А. Ашниев[1], С. Г. Георгиева[1], Ю. В. Николенко[1, *]

[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

**e-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com*

Поступила в редакцию 25.09.2023 г.
После доработки 16.11.2023 г.
Принята к публикации 20.11.2023 г.

Хеликаза *Drosophila melanogaster* MLE – консервативный у высших эукариот белок, ортолог хеликазы DHX9 человека. У млекопитающих показано участие этой хеликазы на разных стадиях экспрессии генов. У *D. melanogaster* активно изучалась роль MLE как одного из компонентов видоспецифичного комплекса дозовой компенсации. Однако роль MLE в других процессах оставалась мало изученной. В данной работе впервые картирована на молекулярном уровне мутация *mle[9]* и показано, что она вызвана делецией, приводящей к утрате высококонсервативного мотива III в каталитическом “ядре” молекулы. Таким образом, мутация *mle[9]* специфически нарушает хеликазную активность белка, не затрагивая функции других доменов. Изучение фенотипических проявлений мутации у самок показало, что в гомозиготном состоянии она имеет плейотропный эффект. Не оказывая влияния на выживаемость, она существенно снижает фертильность и продолжительность жизни. Кроме того, с высокой частотой наблюдается удвоение скутеллярных макрохет. Полученные результаты подтверждают, что у *D. melanogaster* хеликаза MLE вне дозовой компенсации вовлечена в широкий спектр процессов регуляции экспрессии генов.

Ключевые слова: MLE, хеликаза, продолжительность жизни, фертильность, плейотропный фенотип, *Drosophila melanogaster*.

DOI: 10.31857/S0016675824040034 **EDN**: CRIPIZ

MLE (Maleless) – консервативный в эволюции белок семейства DExH-хеликаз [1, 2]. Ген, кодирующий ортолог MLE, был обнаружен в геномах многих высших эукариот, включая млекопитающих и человека [3–5]. У разных организмов этот белок был известен под названиями NDHII (nuclear DNA helicase II) или RHA (RNA helicase A). В настоящее время эти белки, включая MLE, объединяют под общим названием DHX9. В клетках млекопитающих хеликазы DHX9 вовлечены в широкий спектр процессов, от поддержания стабильности генома до регуляции трансляции [6, 7].

MLE *D. melanogaster* и все DHX9 имеют сходный размер и мультидоменное строение. Наиболее консервативна центральная часть молекулы, так называемое каталитическое “ядро”, определяющее способность белка АТФ-зависимо расплетать разнообразные формы ДНК, РНК и ДНК-РНК-гибридов [1, 8]. Специфичность же функций, выполняемых MLE в клетках *in vivo*, определяется доменами, расположенными на N- и C-концах молекулы [9, 10]. Многие функции DHX9 консервативны в эволюции, поэтому их детальное изучение в модельном организме может иметь большое практическое значение.

Изучение функций DHX9 у млекопитающих ограничено тем, что мутации, приводящие к потере функции этого белка, в гомозиготном состоянии приводят к эмбриональной летальности. Поэтому исследования проводятся в основном на линиях клеток. У *D. melanogaster* такие мутации не дают летального эффекта на эмбриональной стадии, что позволяет изучать функции MLE *in vivo* на протяжении всего онтогенеза у самок и до стадии куколки у самцов [11, 12]. На протяжении многих лет MLE у *D. melanogaster* рассматривалась почти исключительно как компонент видоспецифичного комплекса дозовой компенсации [13, 14]. Однако тот факт, что мутации MLE у самок *D. melanogaster* не дают летального эффекта, не означает, что MLE не выполняет важных функций вне дозовой компенсации. В последние годы появились данные о том, что в клетках *D. melanogaster* и в клетках млекопитающих хеликазы MLE и DHX9 вовлечены в одни и те же процессы. Также

ранее в наших работах и работах других исследовательских групп были обнаружены такие новые важные функции MLE как участие в гормон-зависимой регуляции транскрипции, взаимодействие с транскрипционным комплексом SAGA и другими кофакторами транскрипции и комплексами ремоделирования хроматина [15–17].

В качестве модели для изучения функции MLE *in vivo* мы выбрали самок *D. melanogaster*, гомозиготных по мутации *mle[9]* (*mle[γ38]*). Эта мутация, нарушающая дозовую компенсацию и вызывающая летальный фенотип у самцов, была получена под воздействием γ-лучей более 30 лет назад и определена как *loss-of-function*. Было установлено, что она представляет собой небольшую делецию в теле гена, однако точное картирование не проводилось [18]. В недавних исследованиях было показано, что эта мутация влияет на регуляцию экспрессии гена экдизонового каскада *ftz-f1* [17, 19–21]. Также эта мутация усугубляет фенотип слабой мутации *e(y)2[u1]* в гене, кодирующем белок ENY2, который входит в состав ряда транскрипционных белковых комплексов [16, 22–27]. В настоящей работе, мутация *mle[9]* была картирована на молекулярном уровне, были изучены и описаны фенотипические проявления мутации у гомозиготных самок на стадии имаго.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Программное обеспечение, базы данных

В работе использовалась база данных FlyBase (www.flybase.org). Для поиска белковых и нуклеотидных последовательностей использовали сервер NCBI (National Center for Biotechnology Information https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Для анализа последовательностей и подбора праймеров использовали программу Vector NTI (Invitrogen).

Линии Drosophila melanogaster

Дрозофил содержали при температуре 24°C в пробирках объемом 50 мл, содержащих 5 мл стандартной среды. В работе была использована линия из коллекции центра Bloomington Drosophila Stock Center (http://flystocks.bio.indiana.edu/) #5873 с генотипом *mle[9]cn[1]bw[1]/CyO*.

Для изучения влияния мутации *mle[9]* на экспрессию белка MLE на стадиях личинки и куколки была использована линия BDSC #56552 с генотипом *w[1118];PBac{vas-Cas9}VK00037/CyO,P{Tb[1]}Cpr[CyO-A]*. В результате скрещивания самок линии #5873 с самцами линии #56552 была получена линия дрозофил, несущих хромосому с мутацией *mle[9]*, уравновешенную балансерной хромосомой, несущей мутацию *Tb[1]*. Это позволило нам визуально отличать самок, гомозиготных по мутации *mle[9]*, от гетерозиготных самок не только по форме крыльев и цвету глаз, т.е. на стадии поздней куколки и имаго (как было в исходной линии #5873), но намного раньше, начиная со стадии личинки.

Для изучения влияния мутации *mle[9]* на продолжительность жизни как гетерозиготный контроль с прямыми крыльями использовали самок, полученных от скрещивания самок линии #5873 с самцами линии *Oregon R*. В качестве контроля дикого типа была использована линия *Oregon R*.

Праймеры, использованные для картирования мутации mle[9]

“1” AATCAACAATTGTCGAAGAGT,
“2” AATCTTGGTTACGCCTTCTGGAAC,
“3” ACGAGAGAGACGTGAACAGCG.

Праймеры, использованные для измерения уровня экспрессии генов

mle: CCAATGATGTTCCAGCGGATGC и CGTGGTTTAGAGGGCGATAGGC (5′-область гена); CGACAACCCTTCCGACATACTTC и TCCTCCGCCGTCACTGAAC (3′-область гена);

β-Tubulin56D:
CGAGAACACGGACGAGACCTACTG и GGAATCGGAGGCAGGTGGTTACG.

В эксперименте были использованы виргильные самки в возрасте от 5 до 10 сут. Все эксперименты проведены в трех биологических повторностях.

Антитела

В работе были использованы поликлональные антитела к белку MLE *D. melanogaster*, полученные ранее в нашей лаборатории [16].

Приготовления проб для Вестерн-блоттинга

Для выделения ядер по 20 одновозрастных личинок или куколок женского пола каждого из анализированных генотипов гомогенизировали в растворе, содержащем 0.15 M NaCl, 0.01 M Трис-HCl (pH 8.0), 0.005 M ЭДТА и 0.2% Nonidet P-40. Полученный гомогенат фильтровали через ткань Miracloth (Millipore), ядра осаждали центрифугированием и ресуспендировали осадок в буфере Лэммли [11]. Наносили на полиакрила-

мидный гель в равных количествах (1/2 объема полученной пробы, что соответствует экстракту из 10 особей, на одну лунку геля).

Анализ выживаемости самок

Параллельно было поставлено две серии скрещиваний: гомозиготных самок и гетерозиготных самок линии #5873 скрещивали с гетерозиготными самцами той же линии. Свежевылетевшие имаго были рассажены в пять пробирок с питательной средой (по пять самцов и пять самок в одну пробирку), пересадка на свежую среду проводилась ежедневно в течение пяти дней. Были подсчитаны потомки, произведенные самками за первые пять суток жизни. Эксперимент был проведен в двух биологических повторностях. Суммарно в каждой из двух серий скрещиваний было проанализировано не менее 200 самок каждого исследованного генотипа.

Анализ продолжительности жизни

Для получения одновозрастных самок в достаточном количестве, помещали в одну пробирку по пять самок и пять самцов линий #5873 (десять пробирок) и *Oregon R* (десять пробирок), отсаживали родителей через три дня. Свежевылетевших одновозрастных виргильных самок F1 каждого исследованного генотипа рассаживали по 20 штук в одну пробирку и пересаживали на свежую среду каждые два дня до конца жизни, одновременно ведя подсчет умерших особей. Эксперимент был проведен в двух биологических повторностях. Суммарно было проанализировано не менее 100 самок каждого исследованного генотипа. Особей, случайно потерянных при пересадке, исключали из финального расчета.

Анализ фертильности самок

Для получения одновозрастных самок в достаточном количестве помещали в одну пробирку по пять самок и пять самцов линий #5873 (десять пробирок) и *Oregon R* (десять пробирок), отсаживали родителей через три дня. Отбирали свежевылетевших одновозрастных виргильных самок F1. Рассаживали по пять самок каждого исследованного генотипа в пробирки с пятью самцами дикого типа, пересаживали на свежую среду ежедневно. Затем подсчитывали количество куколок, развившихся из яиц, отложенных самками за одни сутки, на 10–14 сут после кладки. Эксперимент был проведен в двух биологических повторностях. Суммарно было проанализировано потомство 50 самок каждого исследованного генотипа.

Анализ частоты удвоения скутеллярных макрохет

Эксперимент был проведен в двух биологических повторностях параллельно с анализом выживаемости самок. Одновременно с подсчетом количества гомо- и гетерозиготных самок проводили подсчет количества скутеллярных макрохет. Суммарно было проанализировано не менее 300 самок каждого исследованного генотипа.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился в программе RStudio https://posit.co/products/open-source/rstudio/ (язык программирования R). Проверку полученных данных на нормальность проводили при помощи теста Шапиро-Уилка. Для анализа продолжительности жизни и фертильности сравнение экспериментальных групп с ненормальным распределением проводили с помощью теста Манна-Уитни. Отсутствие статистически значимых различий между биологическими повторностями в экспериментах было установлено с помощью теста Манна-Уитни. Для повышения статистической мощности метода далее проводились сравнения суммарных количеств мух из двух повторностей. Для анализа представленности фенотипа удвоения макрохет использовали критерий Хи-квадрат и точный критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ последовательности ДНК гена mle в мутантах mle[9]

Схематическое изображение гена *mle* и его транскриптов представлено на рис.1,*а*. Согласно литературным данным [18] делеция *mle[9]* расположена в районе протяженностью примерно 1000 пн между двумя сайтами рестриктазы HincII. Для точного картирования делеции в настоящей работе были подобраны олигонуклеотидные зонды 1 и 2 (рис. 1,*а*) и соответствующая область генома была субклонирована для последующего секвенирования. Мы использовали геномную ДНК, выделенную из самок дикого типа (линия *Oregon R*) и из самок линии #5873, гомозиготных по мутации *mle[9]*. Чтобы исключить любую возможную примесь ДНК гена *mle* дикого типа, в эксперименте использовали только виргильных самок. Сравнение последовательности ДНК, полученной от мутантных самок, с референсным геномом и с последовательностью ДНК самок дикого типа, позволило нам точно картировать мутацию. Оказалось, что она представляет собой делецию 49 нуклеотидов и захватывает 8 нуклеотидов последнего интрона и 41 нуклеотид начала последнего экзона гена (рис. 1,*б*).

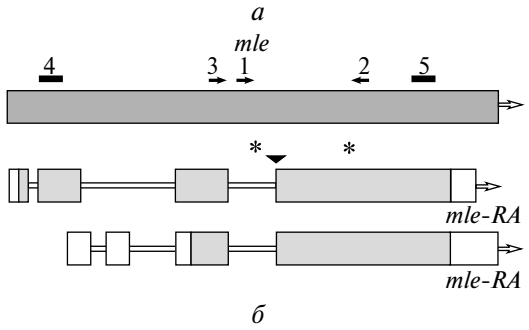


Рис. 1. Молекулярное картирование мутации *mle[9]* на уровне ДНК и мРНК.
а – схематическое изображение гена *mle* и его транскриптов. *mle-RA* – транскрипт, кодирующий полноразмерный белок; *mle-RC* – гипотетический транскрипт. Звездочками обозначены сайты эндонуклеазы рестрикции HincII; стрелками обозначено положение зондов 1, 2 и 3, использованных для картирования делеции; черным треугольником – установленное нами точное положение делеции. Черные отрезки указывают положение зондов для измерения уровня транскрипции *mle* “выше” (4) и “ниже” (5) делеции; *б* – фрагмент нуклеотидной последовательности в районе делеции *mle[9]* в ДНК и кДНК. В ДНК строчными буквами обозначена последовательность интрона, прописными буквами – экзона; последовательность, делетированная в мутации *mle[9]*, выделена серым цветом, подчеркнуты динуклеотиды AG – акцепторные сайты сплайсинга в гене дикого типа и в мутации.

Анализ последовательности мРНК гена mle в мутантах mle[9]

Поскольку делеция *mle[9]* затрагивает границу интрона и экзона гена *mle*, анализ последовательности был продолжен на уровне мРНК. Помимо полноразмерного транскрипта A, возможно существование и более короткого транскрипта C, однако затронутые мутацией *mle[9]* интрон и экзон входят в состав обоих транскриптов. Методом обратной транскрипции мы получили кДНК тотальной полиаденилированной РНК виргильных самок, гомозиготных по мутации *mle[9]* и самок дикого типа. Субклонировали и секвенировали последовательность *mle* при помощи зондов 2 и 3 (рис. 1,*а*). Сравнение последовательности кДНК мутантов с кДНК дикого типа и с референсными транскриптами, показало, что в мРНК делеция была более протяженной и захватывала 72 нуклеотида последнего экзона. Различие в длине делеции *mle[9]* в ДНК и мРНК легко объяснимо: поскольку делеция в ДНК вырезает 3′-сайт сплайсинга (AG) сплайсинг в мутантах идет по первому альтернативному сайту AG, и, таким образом, начало последнего экзона сдвигается (рис. 1,*б*).

Анализ последовательности белка MLE в мутантах mle[9]

Согласно полученным данным, в результате мутации *mle[9]* на уровне белка должно происходить вырезание 24 а.о. (а.о. 536–559) без сдвига открытой рамки считывания (рис. 2,*а*). Анализ на уровне доменной структуры белка показывает, что мутация затрагивает самую консервативную область молекулы – первый RecA-подобный домен каталитического “ядра”, полностью делетируется консервативный мотив III (рис. 2,*б*). Выравнивание этой части последовательности белка у представителей разных таксонов высших эукариот представлено на рис. 2,*в*. Видно, что 9 из 24 делетированных в мутации а.о. идентичны (и еще шесть подобны) у всех представленных организмов. Ранее было показано, что мотив III отвечает за хеликазную активность белка [28, 29]. Таким образом, на основании анализа последовательности следовало ожидать, что в мутантных особях будет экспрессирован белок, практически не отличимый по размеру и доменной структуре от белка дикого типа, но лишенный хеликазной активности.

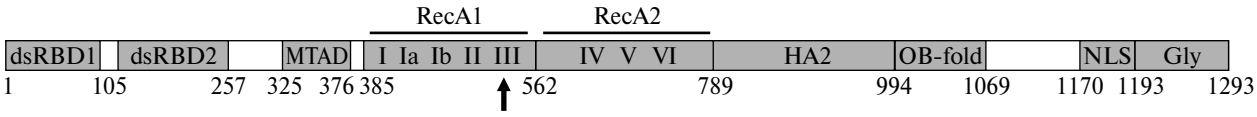
Мутация mle[9] не нарушает экспрессию гена

Поскольку мутация в теле гена, затрагивающая границу экзона и интрона, потенциально может привести к нарушениям транскрипции, далее было исследовано влияние мутации *mle[9]* на транскрипцию гена *mle* у гомозиготных самок. В качестве контроля использовали гетерозиготных самок из той же линии #5873. Были использованы зонды как на 3′-концевую область мРНК (общую для обоих транскриптов), так и на 5′-концевую область мРНК (специфи-

а

MDIKSFLYQFCAKSQIEPKFDIRQTGPKNRQRFLCEVRVEPNTYIGVGNSTNKKDAEKNACRDFVNYLVRVGKLNTNDVPADAGASGGGPRTGLEGA
GMAGGSGQQKRVFDGQSGPQDLGEAYRPLNHDGGDGGNRYSVIDRIQEQRDMNEAEAFDVNAAIHGNWTIENAKERLNIYKQTNNIRDDYKYTPVGP
EHARSFLAELSIYVPALNRTVTARESGSNKKSASKSCALSLVRQLFHLNVIEPFSGTLKKKKDEQLKPYPVKLSPNLINKIDEVIKGLDLPVVNPRN
IKIELDGPPIPLIVNLSRIDSSQQDGEKRQESSVIPWAPPQANWNTWHACNIDEGELATTSIDDLSMDYERSLRDRRQNDNEYRQFLEFREKLPIAA
MRSEILTAINDNPVVIIRGNTGCGKTTQIAQYILDDYICSGQGGYANIYVTQPRRISAISVAERVARERCEQLGDTVGYSVRFESVFPRPYGAILFC
TVGVLLRKLEAGLRGVSHIIVDEIHERDVNSDFLLVILRDMVDTYPDLHVILMSATIDTTKFSKYFGICPVLEVPGRAFPVQQFFLEDIIQMTDFVP
SAESRRKRKEVEDEEQLLSEDKDEAEINYNKVCEDKYSQKTRNAMAMLSESDVSFELLEALLMHIKSKNIPGAILVFLPGWNLIFALMKFLQNTNIF
GDTSQYQILPCHSQIPRDEQRKVFEPVPEGVTKIILSTNIAETSITIDDIVFVIDICKARMKLFTSHNNLTSYATVWASKTNLEQRKGRAGRVRPGF
CFTLCSRARFQALEDNLTPEMFRTPLHEMALTIKLLRLGSIHHFLSKALEPPPVDAVIEAEVLLREMRCLDANDELTPLGRLLARLPIEPRLGKMMV
LGAVFGCADLMAIMASYSSTFSEVFSLDIGQRRLANHQKALSGTKCSDHVAMIVASQMWRREKQRGEHMEARFCDWKGLQMSTMNVIWDAKQQLLDL
LQQAGFPEECMISHEVDERIDGDDPVLDVSLALLCLGLYPNICVHKEKRKVLTTESKAALLHKTSVNCSNLAVTFPYPFFVFGEKIRTRAVSCKQLS
MVSPLQVILFGSRKIDLAANNIVRVDNWLNFDIEPELAAKIGALKPALEDLITVACDNPSDILRLEEPYAQLVKVVKDLCVKSAGDFGLQRESGILP
HQSRQFSDGGGPPKRGRFETGRFTNSSFGRRGNGRTFGGGYGNNGGGYGNNGGGYGNIGGGYGNNAGGYGNNGGYGNNGGGYRNNGGGYGNNGGGYG
NKRGGFGDSFESNRGSGGGFRNGDQGGRWGNF

б



в

H. sapiens	534	YPEVRIVLMSATIDTSMFCEYFF------NCPIIEVYGRTY
B. taurus	531	YPEVRIVLMSATIDTSMFCEYFF------NCPIIEVYGRTF
M. musculus	536	YPEVRIVLMSATIDTSMFCEYFF------NCPIIEVYGRTF
D. melanogaster	530	YPDLHVILMSATIDTTKFSKYFG------ICPVLEVPGRAF
C. elegans	527	YRDLRVVLMSATIDTDLFTNFFSSIPDVGPTPVITMHGRAF
A. thaliana	336	NPHLRLILMSATLDAERFSGYFG------GCPVVRVPGFTY

Рис. 2. Строение белка MLE в мутантах *mle[9]*. *а* – аминокислотная последовательность белка MLE. Делеция выделена серым цветом; *б* – доменное строение MLE (цит. по [7] с изменениями). Районы, соответствующие определенным доменам, обозначены серым цветом, линкерные участки – белым цветом. Представлены два домена связывания дцРНК – dsRBD1 и dsRBD2, минимальный домен трансактивации MTAD, каталитическое “ядро”, состоящее из доменов RecA1 и RecA2 и хеликаза-ассоциированного домена HA2, область связывания олигосахарида/олигонуклеотида OB-fold, сигнал ядерной локализации NLS, глицин-богатый С-концевой домен Gly. Консервативные мотивы обозначены римскими цифрами, положение делеции обозначено черной стрелкой; *в* – выравнивание последовательности, содержащей мотив III, у представителей разных видов. Подобные у разных видов а.о. выделены жирным шрифтом, идентичные а.о. выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Делеция *mle[9]* выделена серым цветом.

ческую для полноразмерного транскрипта A). По данным проекта modENCODE на стадии имаго в самках на самом высоком уровне ген *mle* транскрибируется в головах и также на заметном уровне – в яичниках. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени мы проанализировали экспрессию гена *mle* и установили, что в тканях гомозиготных мутантных самок делеция *mle[9]* не приводит к существенному нарушению транскрипции (рис. 3,*а*).

Белок MLE экспрессируется на протяжении всего онтогенеза у *D. melanogaster* обоего пола, однако уровень экспрессии на стадии имаго в самках очень невелик по сравнению с высоким уровнем экспрессии в самцах. Поэтому для исследования белка MLE в самках мы, ориентируясь на данные проекта modENCODE, выбрали стадии развития с самым высоким уровнем экспрессии, на которых мы могли при этом достоверно определить пол особей. Это стадии поздней (блуждающей) личинки L3 и ранней куколки. Для того чтобы получить возможность отличать гомозиготных по мутации *mle[9]* самок от гетерозиготных, было поставлено скрещивание, в результате которого несущая ген *mle* дикого типа балансерная хромосома *CyO* была заменена балансерной хромосомой *CyO,Tb[1]*. В результате гетерозиготные по мутации *mle[9]* особи имели укороченное тело и были легко отличимы от гомозиготных.

Антитела к MLE, полученные ранее в нашей лаборатории [16], специфичны для N-концевого домена, поэтому способны распознавать полноразмерный белок (~140 кДа) как дикого типа, так и с делецией. Ядерные экстракты [11], полученные из личинок и куколок, были проанализированы методом Вестерн-блот. Как мы и ожидали,

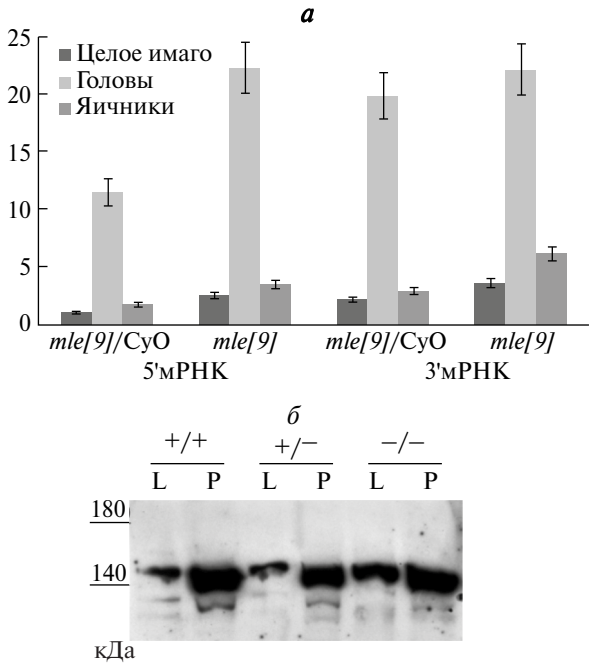


Рис. 3. Мутация *mle[9]* не нарушает экспрессию гена *in vivo* в гомозиготных самках. *а* – транскрипция *mle* в самках с мутацией *mle[9]*. Уровень транскрипция *mle* в имаго измерен относительно уровня транскрипции контрольного гена *β-Tubulin56D.* Использованы зонды, расположенные "выше" (5′) и "ниже" (3′) делеции *mle[9]*. Гетерозиготные самки той же линии (+/–) использованы в качестве положительного контроля. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку измерений; *б* – Вестерн-анализ экспрессии белка MLE в личинках и куколках. L – блуждающие личики L3, P – куколки, возраст одни сутки; "–/–" – гомозиготные, "+/–" – гетерозиготные, "+/+" – *Oregon R*. На каждую дорожку геля нанесен ядерный экстракт из 10 особей.

мутантный белок был по размеру практически не отличим от белка дикого типа (рис. 3,*б*).

В совокупности полученные данные показывают, что в мутантах *mle[9]* действительно синтезируется белок MLE с делецией мотива III в первом RecA-подобном домене, почти не отличимый по размеру и доменному строению от белка дикого типа. Предположение, что мутантный белок должен быть лишен хеликазной активности, согласуется с тем фактом, что мутация *mle[9]* у самцов летальна, т.е. нарушает дозовую компенсацию, для которой необходима хеликазная активность MLE [28].

Анализ фенотипических проявлений мутации mle[9] у самок на стадии имаго

1. Мутация mle[9] не снижает выживаемости самок. В первую очередь для того, чтобы удостовериться, что мутация *mle[9]* не снижает выживаемости самок, были поставлены параллельно два скрещивания: гомозиготных самок и гетерозиготных самок линии #5873 отдельно скрещивали с гетерозиготными самцами той же линии. Количество выживших до стадии имаго гомозиготных самок F1 сравнивали с количеством гетерозиготных самок, полученных в этом же скрещивании. Ожидаемое распределение гомо- и гетерозиготных самок в первом скрещивании составляло 1 : 1, во втором скрещивании – 1 : 2. Согласно данным, представленным в табл. 1, распределение самок, полученных в эксперименте, соответствовало ожидаемому, т.е. выживаемость гомозиготных по мутации *mle[9]* самок не снижается, вне зависимости от того, гомо- или гетерозиготными были их матери. Этот результат был ожидаем и согласуется с полученными ранее данными, характеризующими мутацию *mle[9]* как летальную только у самцов [18].

2. Мутация mle[9] снижает продолжительность жизни. Мы исследовали продолжительность жизни гомозиготных по мутации *mle[9]* виргильных самок при физиологической температуре 24°C. Положительным контролем служили самки дикого типа и самки, гетерозиготные по мутации *mle[9]*. По ходу проведения эксперимента было замечено, что гетерозиготные самки линии #5873, несущие хромосому *CyO*, а значит загнутые крылья, чаще при пересаживании гибли случайно или оказывались утраченными, чем самки других генотипов. Поэтому как дополнительный контроль были использованы самки, гетерозиготные по мутации *mle[9]* с прямыми кры-

Таблица 1. Гомозиготное состояние мутации *mle[9]* не снижает выживаемость самок до стадии имаго

P	♀F1		
	Ожидаемое распределение *mle[9]/mle[9]* : *mle[9]/CyO*	*mle[9]/mle[9]*	*mle[9]/CyO*
♀ *mle[9]/mle[9]* ♂ *mle[9]/CyO*	1 : 1	208	225
♀ *mle[9]/CyO* ♂ *mle[9]/CyO*	1 : 2	250	453

Примечание. Ожидаемое и полученное в эксперименте распределение самок, гомо- и гетерозиготных по мутации *mle[9]*.

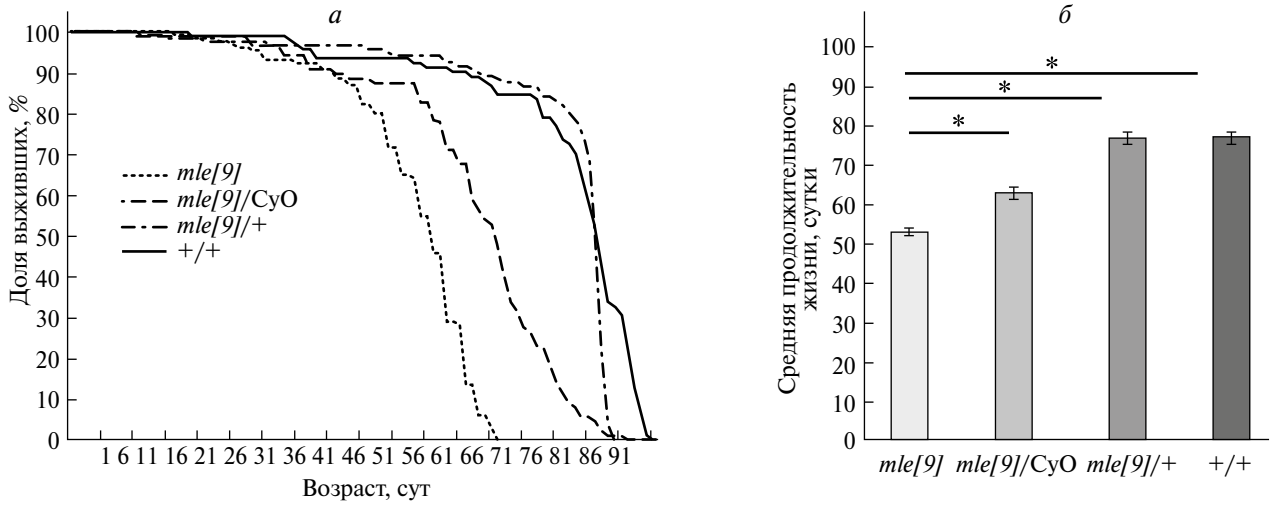


Рис. 4. Мутация *mle[9]* в гомозиготном состоянии снижает продолжительность жизни самок. *а* – кривые выживания при температуре 24°C. *mle[9]* – гомозиготные самки, *mle[9]/CyO* и *mle[9]/+* – гетерозиготные самки с загнутыми и с прямыми крыльями соответственно, +/+ – самки линии *Oregon R*; *б* – средняя продолжительность жизни. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего, * – $p < 0.001$.

льями (*mle[9]/+*). Результаты представлены на рис. 4.: мутация *mle[9]* в гомозиготном состоянии значительно снижала продолжительность жизни самок. Средняя продолжительность жизни гомозиготных самок составила 53 ± 0.9 сут, гетерозиготных самок *mle[9]/CyO* – 63 ± 1.4 сут, гетерозиготных самок с прямыми крыльями 77 ± 1.5 и самок дикого типа – 77 ± 1.2 сут (рис. 4,*б*). Гибель 50% популяции гомозиготных самок (медианная продолжительность жизни) наблюдалась в возрасте между 55 и 56 сут, самок *mle[9]/CyO* – между 65 и 66 сут, самок *mle[9]/+* и самок дикого типа – между 81 и 82 сут (рис. 4,*а*).

3. Мутация mle[9] снижает фертильность самок. Для анализа влияния мутации *mle[9]* на раннюю фертильность самок, было подсчитано потомство, произведенное самками, гомозиготными и гетерозиготными по мутации, на протяжении первых трех недель жизни при скрещивании с самцами дикого типа. В качестве дополнительного положительного контроля использовали скрещивание самок дикого типа с самцами дикого типа. Родителей пересаживали на свежую среду ежедневно на всем протяжении эксперимента. Подсчет количества потомков F1 проводили по достижении стадии куколки. Более 95% куколок, полученных во всех скрещиваниях, развивались до стадии имаго (данные не представлены). Гомозиготное состояние мутации *mle[9]* значительно снижало фертильность самок (рис. 5). Начиная с третьего дня после вылупления и до конца эксперимента фертильность гомозиготных самок была снижена вдвое и более по сравнению с самками обеих контрольных линий (рис. 5,*а*). Среднее количество потомков F1 в пересчете на одну самку за первые 22 дня жизни имаго у гомозиготных самок также было вдвое меньше (104), чем у самок контрольных линий (228 у гетерозиготных самок и 254 у самок дикого типа) (рис. 5,*б*).

4. Мутация mle[9] влияет на формирование макрохет. В настоящей работе было обнаружено еще одно фенотипическое проявление мутации *mle[9]* у самок *D. melanogaster*. Было замечено, что у гомозиготных по мутации самок с повышенной частотой встречается фенотип удвоение передних скутеллярных макрохет, asc (anterior scutellar bristle) (рис. 6,*а*). Этот фенотип встречается менее чем у 1% дрозофил дикого типа (результаты не представлены). Была подсчитана частота встречаемости этого фенотипа у гомо- и гетерозиготных по мутации *mle[9]* самок, результат представлен на рис. 6,*б*. У 38.4% гомозиготных самок наблюдалось удвоение передних скутеллярных макрохет, у гетерозиготных самок этот фенотип встречался у 3.5% особей, т.е. в 10 раз реже. У 6.7% гомозиготных самок наблюдалось удвоение обеих передних скутеллярных макрохет, этот фенотип никогда не встречался у гетерозиготных самок.

В итоге было показано, что мутация *mle[9]* у самок *D. melanogaster* имеет плейотропный эффект, снижает продолжительность жизни и

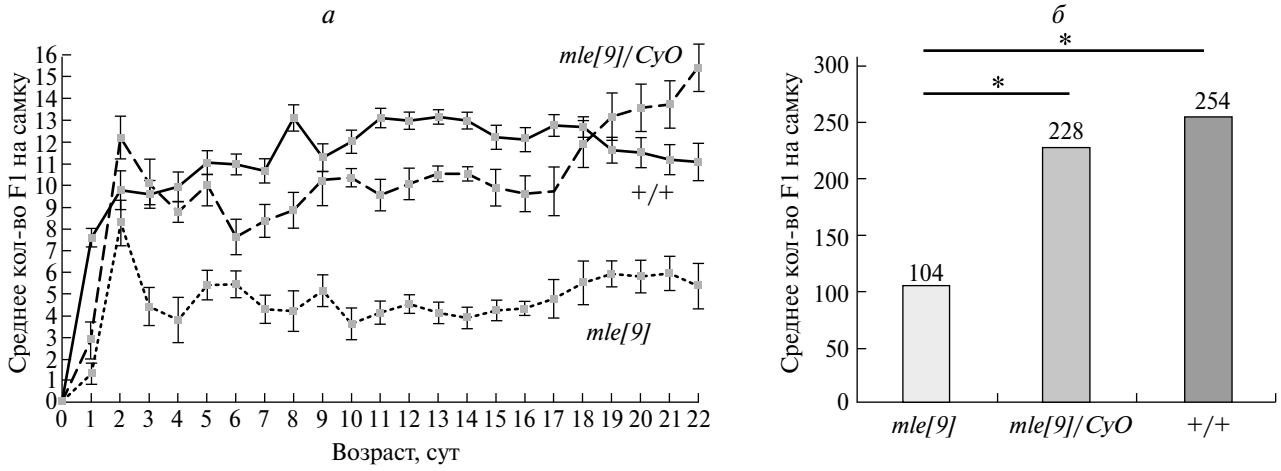


Рис. 5. Мутация *mle[9]* в гомозиготном состоянии снижает фертильность самок. *а* – динамика фертильности самок на протяжении первых трех недель жизни. *mle[9]* – гомозиготные самки, *mle[9]/CyO* – гетерозиготные самки, +/+ – самки линии *Oregon R*. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего; *б* – среднее количество потомков за первые 22 сут жизни, * – $p < 0.001$.

фертильность и влияет на формирование макрохет.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе была впервые картирована и описана на молекулярном уровне мутация *mle[9]* и исследованы ее фенотипические проявления у самок *D. melanogaster*. Из литературных данных было известно лишь примерное положение мутации. В настоящей работе было определено, что в ДНК делеция имеет протяженность 49 нуклеотидов и захватывает 8 нуклеотидов последнего интрона и 41 нуклеотид начала последнего экзона гена. Вследствие того, что делеция в ДНК вырезает акцепторный сайт сплайсинга, интрон в мутантом гене продолжается до первого альтернативного динуклеотида AG. Протяженность делеции в мРНК при этом увеличивается до 72 нуклеотидов (рис. 1,*б*). На уровне белка это приводит к вырезанию 24 а.о. (а.о. 536–559) без сдвига открытой рамки считывания. В результате в мутантном белке полностью отсутствует мотив III первого RecA-подобного домена (рис. 2). При этом остаются интактными последовательности остальных мотивов каталитического “ядра” и доменов на N- и C-концах белка, отвечающих за взаимодействия MLE с белками и нуклеиновыми кислотами [9, 10].

Методом сайт-направленного мутагенеза ранее было показано, что мутации, нарушающие связывание и гидролиз АТФ, например точечные замены в мотиве I, нарушают также и хеликазную функцию MLE, поскольку расплетание происходит АТФ-зависимо. Но при этом есть мутации, избирательно нарушающие только хеликазную функцию и не затрагивающие АТФазную. К таким мутациям относится замена двух консервативных а.о. S539A и T541A в мотиве III [28, 29]. Также было сделано наблюдение, что в мутантах *mle[9]* комплексы дозовой компенсации, содержащие мутантный белок, остаются связанными с высокоафинными сайтами и не распространяются по всей протяженности Х-хромосомы [30]. Опираясь на эти исследования, мы ожидали, что белок в мутантах *mle[9]* почти не будет отличаться по размеру и конформации от белка дикого типа, но будет лишен мотива III, отвечающего за хеликазную активность. Вестерн-анализ показал, что белок в мутантах, как и в самках дикого типа, действительно имел размер ~140 кДа (рис. 3,*б*).

Была замечена тенденция к усилению экспрессии гена *mle* в гомозиготных самках, их головах и яичниках, по сравнению с гетерозиготными самками (рис. 3,*а*). Однако временной профиль экспрессии *mle*, как дикого типа, так и мутантного, в тканях самок имаго ранее не был изучен детально. Поэтому для точного количественного сравнения уровней экспрессии в тканях и органах гомо- и гетерозиготных самок необходимы дальнейшие исследования, в которых будут проанализированы выборки самок строго одинакового возраста. В нашей предыдущей работе было показано, что MLE участвует в регуляции транскрипции гена *ftz-f1* [17]. *ftz-f1* кодирует ядерный рецептор, играющий важную роль в процессе онтогенеза *D. melanogaster*, является

поздним геном экдизонового каскада. Активация его транскрипции в начале метаморфоза ограничена узким промежутком времени, подвержена сложной регуляции и включает промежуточную стадию "задержки" РНК-полимеразы II [21]. Методом иммунопреципитации хроматина было показано, что в модельной системе в культуре клеток Schneider 2 (S2) MLE связывается с промотором и интронным энхансером этого гена, и связывание усиливается в процессе активации транскрипции. Исследования в модельной системе в клетках S2 и в гомозиготных самках на стадии формирования предкуколки показали, что нокдаун MLE и мутация *mle[9]* нарушают регуляцию транскрипции гена *ftz-f1* [17]. Возможно, изменение уровня транскрипции гена *mle* на фоне мутации *mle[9]* указывает на то, что MLE также задействован в прямой или косвенной регуляции транскрипции собственного гена. Можно предположить, что в обоих этих случаях (*ftz-f1* и *mle*) MLE выполняет сходную функцию, которая нарушается при мутации. Предположение о возможности влияния MLE на экспрессию собственного гена требует дальнейшей экспериментальной проверки.

В ходе изучения фенотипических проявлений мутации *mle[9]* в гомозиготном состоянии у самок на стадии имаго было обнаружено, что мутация имеет плейотропный эффект: снижает продолжительность жизни и фертильность и вызывает удвоение скутеллярных макрохет.

Средняя продолжительность жизни гомозиготных самок (53 сут) при нормальной температуре снижалась на 31% по сравнению с самками дикого типа и с гетерозиготными самками с прямыми крыльями (77 сут) (рис. 4,*б*). Отличие от гетерозиготных самок, несущих балансер *CyO* (средняя продолжительность жизни 63 сут), было не таким большим, но статистически значимым, и составляло 16%. Также значительно отличалась медианная продолжительность жизни, т.е. возраст, когда в живых оставалось ровно 50% особей (рис. 4,*а*). У гомозиготных самок этот возраст составлял 55–56 суток и был на 15–32% меньше, чем у самок трех контрольных линий (65–66 и 81–82 сут соответственно).

Полученные нами данные о влиянии мутации *mle[9]* на продолжительность жизни согласуются с данными, полученными ранее при изучении температурно-чувствительной мутации *mle[napts]* [31]. В этом исследовании было показано, что при повышенной температуре продолжительность жизни имаго, гомозиготных по мутации *mle[napts],* значительно снижается. Мутация представляет собой замену одного а.о. T415S в мотиве I, что при повышении температуры вызывает конформационные изменения, приводящие к снижению АТФазной активности MLE. Это приводит к нарушению редактирования и сплайсинга гена *para*, кодирующего белок Na^+-каналов, и как следствие к резкому снижению его экспрессии [18, 32, 33]. В то же время у гомозигот по мутациям самого гена *para* продолжительность жизни не снижается. Это позволило исследователям предположить, что снижение продолжительности жизни у мутантов *mle[napts]* обусловлено не столько нарушением экспрессии гена *para*, сколько влиянием на экспрессию других, еще не известных, генов-мишеней [31]. Мы предполагаем, что влияние обеих мутаций в гене *mle* на продолжительность жизни обусловлено общим механизмом. Интересно, что функция MLE в поддержании нормальной продолжительности жизни может быть консервативна: потеря функции DHX9 в первичных фибробластах человека приводит к их преждевременному старению через активацию p53 и подавление репликации ДНК [34].

Поскольку согласно данным проекта modENCODE высокий уровень экспрессии *mle* наблюдается в головах имаго, а также в центральной нервной системе личинок, возникает предположение, что влияние MLE на продолжительность жизни обусловлено функциями этой хеликазы в ЦНС. Эти функции MLE на данный момент не изучены, однако на основании анализа данных высокопроизводительного секвенирования ген *mle* включен в каталог предполагаемых "синаптических генов", т.е. генов, определяющих формирование и функционирование синапсов [35]. Надо отметить, что в самках имаго ген *ftz-f1* так же, как и *mle*, экспрессируется в головах на высоком уровне. Было показано, что ftz-f1 имеет важные функции в формировании ЦНС и вовлечен в созревание и ремоделирование нейронов грибовидных тел головного мозга [36–38]. Эти данные позволяют предположить, что снижение продолжительности жизни у самок, гомозиготных по *mle[9]*, обусловлено влиянием мутации на экспрессию гена *ftz-f1* в нервной системе имаго. Поскольку на данный момент влияние MLE на экспрессию *ftz-f1* было показано только в культуре клеток и на уровне целого организма на стадии предкуколки, это предположение требует экспериментальной проверки.

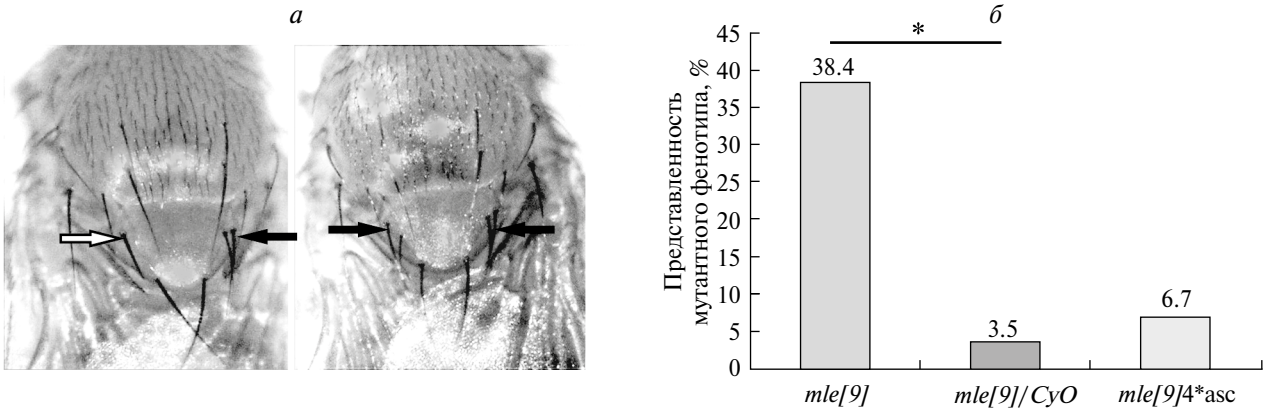


Рис. 6. Мутация *mle[9]* влияет на формирование скутеллярных макрохет (asc). *а* – удвоение передней скутеллярной макрохеты с одной (слева) или с обеих (справа) сторон груди у гомозиготных самок. Белой стрелкой обозначено нормальное расположение макрохет, черными стрелками – мутантный фенотип; *б* – частота встречаемости мутантного фенотипа у гомо- (*mle[9]*) и гетерозиготных (*mle[9]/CyO*) самок; 4*asc – самки с удвоением макрохет с обеих сторон, * $p < 0.001$.

Недавние исследования указывают на то, что функции MLE в нервной системе могут быть консервативными у разных организмов. У человека были обнаружены ультра редкие *de novo* мутации DHX9, гетерозиготное состояние которых лежит в основе некоторых случаев наследственной моторно-сенсорной нейропатии (болезни Шарко-Мари-Тута) и нейродегенеративных заболеваний разной степени тяжести [39]. Также обнаружена роль DHX9 в развитии нейродегенеративных заболеваний, вызванных экспансией микросателлитных повторов [40].

В настоящей работе было обнаружено, что мутация *mle[9]* значительно, более чем в 2 раза, снижает фертильность гомозиготных самок (рис. 5). Эти данные хорошо согласуются с данными modENCODE Tissue Expression Data о высоком уровне экспрессии *mle* в яичниках самок на стадии имаго. Функции, которые MLE выполняет в клетках яичников, на данные момент не изучены, но они могут быть консервативными в эволюции. Так, было показано, что потеря функции ортолога MLE у *C. elegans* нарушает регуляцию транскрипции в герминальных клетках, что приводит к нарушениям митоза и мейоза и как следствие к стерильности [41].

В заключительной части работы мы показали, что у почти 40% гомозиготных по мутации *mle[9]* самок наблюдается удвоение скутеллярных макрохет с одной или даже (у 6%) с двух сторон (рис. 6). Макрохеты выполняют функции механорецептов, являются частью периферической нервной системы *D. melanogaster* и образуются из единственной родительской клетки (PKCO – родительская клетка сенсорного органа) [42, 43]. Ключевым событием, определяющим саму возможность формирования макрохеты, является обособление PKCO из массы эктодермальных клеток крылового имагинального диска. Делеции, удвоения или появление эктопических макрохет являются результатом нарушения правильного позиционирования PKCO. Особенность PKCO, определяющая ее нейральную детерминацию, состоит в повышенной экспрессии генов комплекса *achaete-scute* [44, 45]. Экспрессия этих генов подвержена сложной многостадийной регуляции, в которую вовлечены продукты генов *stripe (sr)*, *hairy (h)*, *extramacrochaetae (emc)* и др. [46]. Полученные в настоящей работе данные дают нам основание предполагать, что MLE также вовлечен в сложную регуляцию экспрессии генов, определяющую позиционирование PKCO.

В совокупности полученные в настоящей работе данные расширяют наши представления о функциях MLE в регуляции экспрессии генов и указывают направления дальнейших исследований. Изучение потенциально консервативных в эволюции функций MLE может иметь большое значение, поскольку DHX9 у человека необходим в эмбриональном развитии и вовлечен в канцерогенез и патогенез многих заболеваний [6].

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-24-00357.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы

ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Singleton M.R., Dillingham M.S., Wigley D.B.* Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases // Annu. Rev. Biochem. 2007. V. 76. № 1. P. 23–50. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052305.115300
2. *Fairman-Williams M.E., Guenther U.-P., Jankowsky E.* SF1 and SF2 helicases: family matters // Curr. Opin. Struct. Biol. 2010. V. 20. № 3. P. 313–324. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.03.011
3. *Lee C.G., Hurwitz J.* Human RNA helicase A is homologous to the maleless protein of *Drosophila* // J. Biolo. Chem. 1993. V. 268. № 22. P. 16822–16830. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85490-X
4. *Wei W., Twell D., Lindsey K.* A novel nucleic acid helicase gene identified by promoter trapping in *Arabidopsis* // The Plant J. 1997. V. 11. № 6. P. 1307–1314. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061307.x
5. *Zhang S., Maacke H., Grosse F.* Molecular cloning of the gene encoding nuclear DNA helicase II. A bovine homologue of human RNA helicase A and *Drosophila* Mle protein // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. № 27. P. 16422–16427. https://doi.org/10.1074/JBC.270.27.16422
6. *Lee T., Pelletier J.* The biology of DHX9 and its potential as a therapeutic target // Oncotarget. 2106. V. 7. № 27. P. 42716–42739. https://doi.org/10.18632/oncotarget.8446
7. *Николенко Ю.В., Георгиева С.Г., Копытова Д.В.* Разнообразие функций хеликазы MLE в регуляции экспрессии генов у высших эукариот // Мол. биология. 2023. Т. 57. № 1. С. 10-23. https://doi.org/10.31857/S0026898423010123
8. *Prabu J.R., Müller M., Thomae A.W. et al.* Structure of the RNA helicase MLE reveals the molecular mechanisms for uridine specificity and RNA-ATP coupling // Mol. Cell. 2015. V. 60. № 3. P. 487–499. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.011
9. *Aratani S., Kageyama Y., Nakamura A. et al.* MLE activates transcription via the minimal transactivation domain in *Drosophila* // Int. J. Mol. Med. 2008. V. 21. № 4. P. 469–476. https://doi.org/10.3892/ijmm.21.4.469
10. *Izzo A., Regnard C., Morales V. et al.* Structure-function analysis of the RNA helicase maleless // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36. № 3. P. 950–962. https://doi.org/10.1093/nar/gkm1108
11. *Kuroda M.I., Kernan M.J., Kreber R. et al.* The maleless protein associates with the X chromosome to regulate dosage compensation in drosophila // Cell. 1991. V. 66. № 5. P. 935–947. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90439-6
12. *Lee C.-G.* The NTPase/helicase activities of *Drosophila maleless*, an essential factor in dosage compensation // EMBO J. 1997. V. 16. № 10. P. 2671–2681. https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2671
13. *Kuroda M.I., Hilfiker A., Lucchesi J.C.* Dosage compensation in *Drosophila* – a model for the coordinate regulation of transcription // Genetics. 2016. V. 204. № 2. https://doi.org/10.1534/genetics.115.185108
14. *Samata M., Akhtar A.* Dosage compensation of the X chromosome: A complex epigenetic assignment involving chromatin regulators and long noncoding RNAs // Annu. Rev. Biochem. 2018. V. 87. https://doi.org/ 10.1146/annurev-biochem-062917-011816
15. *Cugusi S., Kallappagoudar S., Ling H., Lucchesi J.C.* The *Drosophila* helicase Maleless (MLE) is implicated in functions distinct from its role in dosage compensation // Mol. Cell. Proteomics. 2015. V. 14. № 6. P. 1478–1488. https://doi.org/10.1074/mcp.M114.040667
16. *Николенко Ю.В., Куршакова М.М., Краснов А.Н.* Мультифункциональный белок ENY2 взаимодействует с РНК-хеликазой MLE // ДАН. 2019. Т. 489. С. 637–640. https://doi.org/10.31857/S0869-56524896637-640
17. *Николенко Ю.В., Куршакова М.М., Краснов А.Н., Георгиева С.Г.* Хеликаза MLE – новый участник регуляции транскрипции гена *ftz-f1*, кодирующего ядерный рецептор у высших эукариот // ДАН. Науки о жизни. 2021. Т. 496. С. 48–51. https://doi.org/10.31857/S2686738921010182
18. *Kernan M.J., Kuroda M.I., Kreber R. et al. napts*, a mutation affecting sodium channel activity in *Drosophila*, is an allele of *mle* a regulator of X chromosome transcription // Cell. 1991. V. 66. № 5. P. 949–959. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90440-A
19. *Николенко Ю.В., Краснов А.Н., Воробьева Н.Е.* Ремоделирующий хроматин комплекс SWI/SNF влияет на пространственную организацию локуса гена *ftz-f1* // Генетика. 2019. Т. 55. С. 156–164. https://doi.org/10.1134/S0016675819020115
20. *Николенко Ю.В., Краснов А.Н., Мазина М.Ю. и др.* Изучение свойств нового экдизонзависимого энхансера // ДАН. 2017. Т. 474. С. 756–759. https://doi.org/10.7868/S0869565217180219
21. *Vorobyeva N.E., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N. et al.* SAYP and Brahma are important for “repressive” and “transient” Pol II pausing // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. № 15. P. 7319–7331. https://doi.org/10.1093/nar/gks472
22. *Фурсова Н.А., Николенко Ю.В., Сошникова Н.В. и др.* Белок CG9890 с доменами цинковых пальцев - новый компонент ENY2-содержащих комплексов

дрозофилы // Acta Naturae. 2018. Т. 10. С. 110–114. https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-110-114
23. *Николенко Ю.В., Вдовина Ю.А., Фефелова Е.И. и др.* Деубиквитинирующий (DUB) модуль SAGA участвует в Pol III-зависимой транскрипции // Мол. биология. 2021. Т. 55. С. 1–10. https://doi.org/10.31857/S0026898421030137
24. *Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V. et al.* ENY2: couple, triple...more? // Cell Cycle. 2010. V. 9. № 3. P. 479–481. https://doi.org/10.4161/cc.9.3.10610
25. *Gurskiy D., Orlova A., Vorobyeva N.et al.* The DUBm subunit Sgf11 is required for mRNA export and interacts with Cbp80 in *Drosophila* // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. № 21. P. 10689–10700. https://doi.org/10.1093/nar/gks857
26. *Popova V.V., Orlova A.V., Kurshakova M.M. et al.* The role of SAGA coactivator complex in snRNA transcription // Cell Cycle. 2018. V. 17. № 15. P. 1859–1870. https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1489175
27. *Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N. et al.* Multifunctional factor ENY2 is associated with the THO complex and promotes its recruitment onto nascent mRNA // Genes Dev. 2010. V. 24. № 1. P. 86–96. https://doi.org/10.1101/gad.550010
28. *Morra R., Smith E.R., Yokoyama R., Lucchesi J.C.* The MLE subunit of the *Drosophila* MSL complex uses its ATPase activity for dosage compensation and its helicase activity for targeting // Mol. Cell. Biol. 2008. V. 28. № 3. P. 958–966. https://doi.org/10.1128/MCB.00995-07
29. *Pause A., Sonenberg N.* Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: The mammalian translation initiation factor eIF-4A // EMBO J. 1992. V. 11. № 7. P. 2643–2654. https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05330.X
30. *Figueiredo M.L.A., Kim M., Philip P. et al.* Non-coding roX RNAs prevent the binding of the MSL-complex to heterochromatic regions // PLoS Genet. 2014. V. 10. № 12. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004865
31. *Fergestad T., Ganetzky B., Palladino M.J.* Neuropathology in *Drosophila* membrane excitability mutants // Genetics. 2006. V. 172. № 2. P. 1031–1042. https://doi.org/10.1534/GENETICS.105.050625
32. *Reenan R.A., Hanrahan C.J., Ganetzky B.* The *mlenapts* RNA helicase mutation in *Drosophil*a results in a splicing catastrophe of the para Na^+ channel transcript in a region of RNA editing // Neuron. 2000. V. 25. № 1. P. 139–149. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80878-8
33. *Hanrahan C.J., Palladino M.J., Ganetzky B., Reenan R.A.* RNA editing of the *Drosophila para* Na^+ channel transcript: evolutionary conservation and developmental regulation // Genetics. 2000. V. 155. № 3. P. 1149–1160. https://doi.org/10.1093/genetics/155.3.1149
34. *Lee T., Di Paola D., Malina A. et al.* Suppression of the DHX9 helicase induces premature senescence in human diploid fibroblasts in a p53-dependent manner // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 33. P. 22798–22814. https://doi.org/10.1074/JBC.M114.56853535
35. *Pazos Obregón F., Palazzo M., Soto P. et al.* An improved catalogue of putative synaptic genes defined exclusively by temporal transcription profiles through an ensemble machine learning approach // BMC Genomics. 2019. V. 20. № 1. P. 1011. https://doi.org/10.1186/s12864-019-6380-z
36. *Lin S., Huang Y., Lee T.* Nuclear receptor unfulfilled regulates axonal guidance and cell identity of *Drosophila* mushroom body neurons // PLoS One. 2009. V. 4. № 12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008392
37. *Iyer E.P., Iyer S.C., Sullivan L. et al.* Functional genomic analyses of two morphologically distinct classes of *Drosophila* sensory neurons: post-mitotic roles of transcription factors in dendritic patterning // PLoS One. 2013. V. 8. № 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072434
38. *Boulanger A., Clouet-Redt C., Farge M. et al.* ftz-f1 and Hr39 opposing roles on EcR expression during *Drosophila* mushroom body neuron remodeling // Nat. Neurosci. 2011. V. 14. № 1. P. 3–44. https://doi.org/10.1038/nn.2700
39. *Calame D. G., Guo T., Wang C. et al.* Monoallelic variation in DHX9, the gene encoding the DExH-box helicase DHX9, underlies neurodevelopment disorders and Charcot–Marie–Tooth disease // Am. J. Hum. Genet. 2023. V. 110. № 8. P. 1394–1413. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2023.06.013
40. *Castelli L. M., Benson B. C., Huang W.-P. et al.* RNA helicases in microsatellite repeat expansion disorders and neurodegeneration // Front. Genet. 2022. V. 13 https://doi.org/10.3389/fgene.2022.886563
41. *Walstrom K.M., Schmidt D., Bean C.J., Kelly W.G.* RNA helicase A is important for germline transcriptional control, proliferation, and meiosis in *C. elegans* // Mech. Dev. 2005. V. 122. № 5. P. 707–720. https://doi.org/10.1016/J.MOD.2004.12.002
42. *Campuzano S., Modolell J.* Patterning of the *Drosophila* nervous system: The *achaete–scute* gene complex // Trends in Genetics. 1992. V. 8. № 6. P. 202–208. https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90234-U
43. *Cubas P., De Celis J.F., Campuzano S., Modolell J.* Proneural clusters of *achaete–scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc // Genes Dev. 1991. V. 5. № 6. P. 996–1008. https://doi.org/10.1101/GAD.5.6.996
44. *Villares R., Cabrera C.V.* The *achaete–scute* gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc // Cell. 1987. V. 50. № 3. P. 415–424. https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90495-8

45. *Cabrera C.V., Alonso M.C.* Transcriptional activation by heterodimers of the *achaete–scute* and *daughterless* gene products of *Drosophila* // EMBO J. 1991. V. 10. № 10. P. 2965–2974. https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1991.TB07847.X

46. *Usui K., Goldstone C., Gibert J.-M., Simpson P.* Redundant mechanisms mediate bristle patterning on the *Drosophila* thorax. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 51. P. 20112–20117. https://doi.org/10.1073/pnas.0804282105

Drosophila melanogaster MLE Helicase Functions Beyond Dosage Compensation: Molecular Nature and Pleiotropic Effect of *mle[9]* Mutation

G. A. Ashniev[1], S. G. Georgieva[1], J. V. Nikolenko[1, *]

[1]Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

**e-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com*

MLE of *D. melanogaster* is a conserved protein in higher eukaryotes, an ortholog of human DHX9 helicase. In mammals, this helicase has been shown to participate in different stages of gene expression. In *D. melanogaster*, the role of MLE as one of the components of the species-specific Dosage Compensation Complex has been extensively studied. However, the role of MLE in other processes has remained poorly understood. In this work, for the first time, the *mle[9]* mutation is mapped at the molecular level and shown to be caused by a deletion resulting in the loss of a highly conserved motif III in the catalytic core of the molecule. Thus, *mle[9]* specifically disrupts the helicase activity of the protein without affecting the function of other domains. The study of phenotypic manifestations of the mutation in females showed that in the homozygous state it has a pleiotropic effect. Without affecting survival, it significantly reduces fertility and lifespan. In addition, the duplication of scutellar macrochaetae was observed with high frequency. These results confirm that in *D. melanogaster* MLE helicase is involved in a wide range of gene expression regulation processes distinct from its role in dosage compensation.

Keywords: MLE, helicase, lifespan, fertility, pleiotropic phenotype, *Drosophila melanogaster*.