

РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ В РАЗВИТИИ

УДК 577.2145

РОЛЬ КОРОТКИХ РНК В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕРМИНАТИВНЫХ КЛЕТКАХ¹

© 2007 г. М. С. Клёнов, А. Д. Столяренко, С. С. Рязанский,
О. А. Соколова, И. Н. Константинов, В. А. Гвоздев

Институт молекулярной генетики РАН
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2
E-mail: gvozdev@img.ras.ru; asyastol@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.11.06 г.

В негативной регуляции экспрессии генов эукариот участвуют два основных типа коротких РНК (длиной 21–25 нуклеотидов): микроРНК и короткие интерферирующие РНК (siРНК, small interfering RNA) системы РНК-интерференции. МикроРНК главным образом подавляют трансляцию мРНК-мишеней; siРНК не только препятствуют трансляции мРНК и/или приводят к распаду мРНК, но и вовлекаются в регуляцию экспрессии генов на уровне транскрипции. В герминативных клетках существенную роль играет трансляционная регуляция экспрессии генов, механизм которой особенно детально изучен в оогенезе дрозофилы. В меньшей степени исследована роль гетерохроматизации и компактизации хроматина, которая может быть направлена на подавление экспрессии мобильных элементов и других повторяющихся элементов генома. Активация и перемещение мобильных элементов, сопровождающиеся мутациями и хромосомными перестройками, особенно опасны в клетках зародышевого пути. Предполагается, что в подавлении экспрессии мобильных элементов в герминативных клетках дрозофилы может участвовать специализированный класс коротких РНК (rasiRNA, repeat associated siRNA). В работе описываются характерные для герминативных клеток субклеточные рибонуклеопротеиновые структуры – перинуклеарные и полярные гранулы, содержащие белки системы РНК-интерференции и созреваания микроРНК. Представлены также собственные результаты, обнаруживающие роль генов системы РНК-интерференции в подавлении экспрессии мобильных элементов дрозофилы.

Ключевые слова: короткие РНК, мобильные элементы, перинуклеарные гранулы, полярные гранулы, герминативные клетки, оогенез.

Открытие роли коротких РНК в регуляции экспрессии генов эукариот рассматривается как революционное событие в молекулярной биологии (Mello, Conte, 2004). Короткие РНК представлены двумя главными классами: микроРНК (microRNA, miRNA) и малыми интерферирующими РНК, или siРНК (small interfering RNA) (Meister, Tusch, 2004). Роль микроРНК в основном сводится к регуляции трансляции (Bartel, 2004), хотя у растений они могут участвовать в метилировании ДНК и, следовательно, в модификации хроматина (Lippman et al., 2003; Bao et al., 2004; Клёнов, Гвоздев, 2005). siРНК могут не только препятствовать трансляции мРНК и/или приводить к распаду мРНК, но и вовлекаться в регуляцию экспрессии генов на уровне транскрипции. siРНК, вовлеченные в подавление экспрессии повторяющихся элементов генома, включая мобильные элементы, получили название rasiРНК (repeat

associated siРНК) (Aravin et al., 2003). Считается, что rasiРНК могут образовываться вследствие двусторонней транскрипции повторяющихся элементов, сопровождающейся продукцией двухцепочечной РНК (дцРНК), процессинг которой приводит к образованию коротких РНК (Volpe et al., 2002; May et al., 2005). В целом короткие РНК играют важнейшую роль в негативной регуляции экспрессии генов (РНК-сайленсинг) как на уровне трансляции, так и транскрипции. Механизмы РНК-сайленсинга с помощью коротких РНК также часто называют РНК-интерференцией (РНКи). Хотя РНК-сайленсинг подавляет экспрессию генов, приводя к потере функции, в отдельных случаях короткие РНК, напротив, участвуют в обеспечении функции определенных участков генома: например, siРНК важны для функционирования центромерных повторов дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, вызывая их гетерохроматизацию (компактизацию), необходимую для расхождения хромосом при делении клетки (Reinhart, Bartel, 2002; Volpe et al., 2002; Verdell et al., 2004).

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-48034а), Российской государственной программой по поддержке ведущих научных школ (проект № НШ-6113.2006.4) и Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

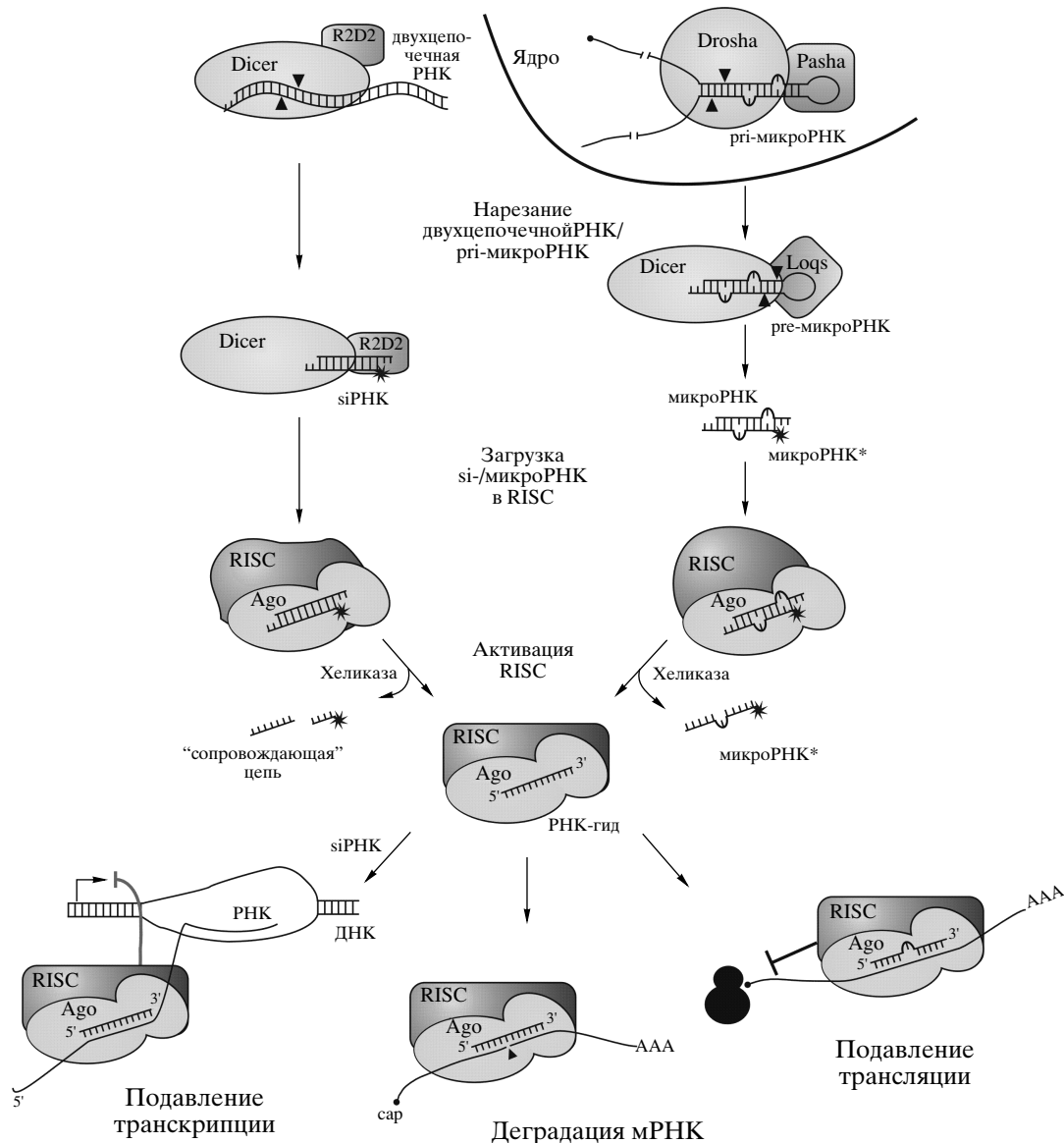


Рис. 1. Механизм РНК-сайленсинга с участием siРНК и микроРНК.

(*) – цепь siРНК и микроРНК, не вошедшая в эффекторный комплекс RISC; остальные обозначения см. в тексте.

Рассмотрение функций РНКи, оперирующей на разных уровнях экспрессии генов, показывает ее значимость в процессах развития и дифференцировки эукариот. Полагают, что механизмы РНКи являются древним приобретением в ходе эволюции эукариот. Роль РНКи, рудименты которой обнаруживаются и у архей (Parker et al., 2005), в подавлении генов у эукариот обсуждается во многих обзорах (Hannon, 2002; Meister, Tuschl, 2004; Cerutti, Casas-Mollano, 2006).

ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ siРНК И микроРНК

При описании путей процессинга предшественников siРНК и микроРНК будем пользо-

ваться номенклатурой, принятой для белков дрозофилы, которым соответствуют белки-ортологи разных представителей эукариот (нематод, млекопитающих, растений и других организмов). Образование siРНК в результате процессинга длинной дцРНК было подробно изучено на системах *in vitro* у дрозофилы (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001a). Пути процессинга предшественников коротких РНК представлены на рис. 1. ДцРНК разрезается эндорибонуклеазой Dicer (от англ. "dice" – резать на мелкие кусочки) (Bernstein et al., 2001) на дуплексы размером 21–23 н. п., содержащие на 3'-конце два выступающих нуклеотида, а на 5'-конце – фосфат (Elbashir et al., 2001b). Образующиеся siРНК включаются в эффекторный комплекс (RISC –

RNA-induced silencing complex), связываясь с его ключевым компонентом – белком семейства Argonaute (Ago) (Hammond et al., 2000, 2001). Помимо Ago комплекс RISC содержит ряд вспомогательных белков с неизвестной функцией. siРНК доставляется в RISC с помощью комплекса Dicer с РНК-связывающим белком-помощником R2D2 (Liu et al., 2003), который определяет, какая из двух комплементарных цепей siРНК станет эффективной, т.е. РНК-гидом (guide), взаимодействующим с мРНК-мишенью (Tomari et al., 2004b). При формировании активного RISC другая цепь siРНК, комплементарная РНК-гиду (сопровождающая, passenger), распадается (Matranga et al., 2005). РНК-гид находит комплементарную последовательность мРНК, а белок Ago катализирует ее разрезание. В геноме эукариот закодированы несколько вариантов Ago, в том числе те, которые не обладают нуклеазной активностью, но тем не менее, как показывает генетический анализ, вовлечены в РНК-сайленсинг (Parker, Barford, 2006). siРНК может также участвовать в подавлении транскрипции генов, взаимодействуя с комплементарной новообразованной РНК (Schramke et al., 2005) (рис. 1) и вызывая модификацию гистонов, характерную для неактивного хроматина (Buhler et al., 2006; Irvine et al., 2006). Такой механизм воздействия siРНК на уровне хроматина пока показан только у дрожжей *S. pombe*.

МикроРНК возникают из транскриптов, способных образовывать двухцепочечную шпильку, подвергающуюся процессингу (см. обзор: Bartel, 2004). Гены микроРНК могут находиться между другими генами или составлять часть последовательности интронов других генов. Они транскрибируются с образованием рге-микроРНК (primary miRNA) размером до 1000 нуклеотидов, участок которой содержит комплементарные последовательности, складывающиеся в шпильку (рис. 1) (Bartel, 2004). Комплекс эндорибонуклеазы Drosha с дцРНК-связывающим кофактором Pasha (так называемый микропроцессор) (Denli et al., 2004) вырезает шпильку с образованием рге-микроРНК (precursor of miRNA) размером 70 нуклеотидов. Рге-микроРНК при участии экспортина-5 (Yi et al., 2003) выходит в цитоплазму, где комплекс Dicer с дцРНК-связывающим белком-помощником Loqs (Forstemann et al., 2005) вырезает зрелые микроРНК длиной 21–23 нуклеотида. Как правило, микроРНК животных взаимодействуют с 3'-нетранслируемой областью мРНК-мишени, образуя в отличие от siРНК частично некомплементарные дуплексы, что приводит к подавлению трансляции мРНК. МикроРНК растений часто полностью комплементарны своим мишеням и, как и siРНК, вызывают деградацию мРНК (Hutvagner, Zamore, 2002; Bartel V., Bartel D., 2003). Возникновение в процессе эволюции многоклеточных эукариот генов микроРНК привело к по-

явлению новой регуляторной системы, в которой ключевую роль играют некодирующие РНК. Мишенями системы микроРНК оказываются жизненно важные гены, многие из которых кодируют факторы транскрипции, регулирующие апоптоз, скорость роста и клеточную дифференцировку.

В процессинге предшественников микроРНК и siРНК могут принимать участие белки, сходные по механизму действия или даже идентичные. Например, Loqs и Dicer могут участвовать в РНК-сайленсинге, зависящем как от микроРНК, так и от siРНК (Lee et al., 2004; Forstemann et al., 2005). В геноме человека существует единственный ген, кодирующий Dicer и участвующий в процессинге как дцРНК, так и рге-микроРНК. Поэтому пути подавления экспрессии генов с помощью разных типов коротких РНК, “узнающих” одни и те же или разные мишени, могут регулироваться одними и теми же факторами. Следовательно, зависящие от микроРНК и siРНК пути не следует рассматривать как непересекающиеся автономные способы негативной регуляции экспрессии генов. Описанию механизмов сайленсинга с помощью коротких РНК посвящен ряд обзоров (Hannon, 2002; Аравин и др., 2002а, б; Meister, Tuschl, 2004; Клёнов, Гвоздев, 2005; Котельников и др., 2006).

Механизм РНКи, по-видимому, возник в эволюции как способ борьбы с вирусной инфекцией или с вредными для генома мобильными элементами. ДцРНК может образовываться при репликации генома РНК-вирусов, при двунаправленной транскрипции мобильного элемента с участием собственного “смыслового” и внешнего или собственного “антисмыслового” промотора, а также при транскрипции ДНК-транспозонов с инвертированными повторами (Гвоздев, 2003). Такая дцРНК, гомологичная вирусам и мобильным элементам, может инициировать подавление их экспрессии.

Рассмотрение механизмов созревания коротких РНК и их воздействия на мишени, содержащие гомологичные им нуклеотидные последовательности, показывает, что гены, контролируемые эти типы РНК-сайленсинга, могут кодировать различные РНК-связывающие белки, включая РНК-хеликазы (Котельников и др., 2006). РНК-хеликазным доменом обладает и Dicer – ключевой белок процессинга предшественников микроРНК и siРНК. Как известно, РНК-хеликазы могут не только расплетать дцРНК, но и участвовать в перестройке рибонуклеопротеидных комплексов, способствуя диссоциации РНК и белка (Jankowsky et al., 2001). Наши данные, представленные в настоящей работе, показывают роль генов, кодирующих РНК-хеликазы и белок семейства Argonaute, в сайленсинге мобильных элементов и tandemных геномных повторов в герминативных клетках *D. melanogaster*.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ РНКи В ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГРАНУЛАХ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

Совсем недавно в соматических клетках были обнаружены дискретные цитоплазматические тельца (P-bodies, processing bodies), содержащие ферменты деградации мРНК и белковый комплекс, удаляющий с 5'-конца мРНК кэп (cap), необходимый для инициации трансляции (Sheth, Parker, 2003). Затем было показано, что в Р-тельцах концентрируются белки семейства Argonaute, являющиеся ключевыми компонентами комплекса RISC, а также микроРНК (Liu et al., 2005a; Rehwinkel et al., 2005). Оказалось, что мРНК не обязательно деградирует в Р-тельцах. Здесь мРНК может храниться, откуда под влиянием разных воздействий (например, голодания или окислительного стресса) переходит в полирибосомы и активно транслируется (Bhattacharyya et al., 2006; Bruno, Wilkinson, 2006). В присутствии микроРНК, подавляющей трансляцию, в Р-тельцах наблюдается накопление мРНК-мишени (Liu et al., 2005b). Р-тельца часто располагаются около ядерной оболочки, вблизи ядерных пор, чтошний раз подчеркивает возможность их участия в регуляции трансляции и хранении новообразованной мРНК, покидающей ядро. Таким образом, Р-тельца рассматриваются как динамичные цитоплазматические структуры, в которых локализуются компоненты системы РНКи, обеспечивающие временное прекращение трансляции, возможно, не сопровождающееся распадом мРНК.

Известно, что контроль трансляции мРНК во времени и в пространстве характерен для герминативных клеток и прежде всего имеет место в развивающемся ооците (Wilhelm, Smibert, 2005). Эти процессы особенно тщательно исследованы на дрозофиле, где белкам, концентрирующимся в цитоплазматических гранулах герминативных клеток, отводится существенная роль в процессах созревания ооцита. Задолго до обнаружения цитоплазматических Р-телец соматических клеток в герминативных клетках были описаны перинуклеарные гранулы, которые можно рассматривать как структурно-функциональный вариант Р-телец соматических клеток.

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ПЕРИНУКЛЕАРНЫЕ И ПОЛЯРНЫЕ ГРАНУЛЫ В ГЕРМИНАТИВНЫХ КЛЕТКАХ

Присутствие так называемых перинуклеарных и полярных гранул считается характерным и эволюционно консервативным признаком герминативных клеток самых разных представителей эукариот – дрозофилы, нематоды, млекопитаю-

щих (Extavour, Akam, 2003). Эти гранулы были впервые описаны И.И. Мечниковым в герминативных клетках насекомых (цит. по: Anderson, Kedersha, 2006). При развитии дрозофилы и нематоды сегрегация материнских полярных гранул в примордиальные герминативные клетки, происходящая вскоре после оплодотворения, определяет образование будущих герминативных клеток. В то же время у млекопитающих гранулы появляются в предшественниках герминативных клеток значительно позднее, и их образование зависит от становления соответствующих сигнальных путей (Extavour, Akam, 2003). Нарушение образования перинуклеарных и полярных гранул приводит к стерильности особей. У нематоды *Caenorhabditis elegans* в так называемых Р-бластомерах – предшественниках герминативных клеток – обнаруживаются Р-гранулы (буква Р в названии Р-телец и Р-гранул нематоды совпала случайно), маркирующие герминативную плазму (Kawasaki et al., 1998). Как правило, Р-гранулы, как и Р-тельца в соматических клетках, ассоциированы с наружной поверхностью ядерной оболочки. Р-гранулы нематоды при образовании бластомеров сегрегируют в результате асимметричных делений в клетки-предшественники зародышевого пути, тогда как бластомеры-родоначальники соматических тканей лишены этих гранул. Система РНКи нематоды связана с Р-гранулами, поскольку удалось наблюдать в соматических клетках образование Р-гранул, характерных для герминативных клеток, на фоне вызванного мутациями резкого усиления активности РНКи (Wang et al., 2005). Эти мутации направляли экспрессию определенных генов в соматических клетках по пути, характерному только для герминативных клеток.

Структура, морфология и биохимические характеристики перинуклеарных гранул, содержащих рибонуклеопротеины, лучше всего исследованы в оогенезе дрозофилы. На рис. 2 изображены стадии оогенеза дрозофилы и показано присутствие перинуклеарных гранул в питающих клетках, откуда синтезируемые белки и РНК поступают в формирующийся ооцит. На поздних стадиях оогенеза на заднем полюсе ооцита формируются полярные гранулы (St Johnston, Nusslein-Volhard, 1992). После оплодотворения участок герминативной плазмы, содержащий полярные гранулы, индуцирует в задней части развивающегося эмбриона образование полярных клеток-предшественников будущих герминативных тканей. Позднее полярные гранулы исчезают, и в примордиальных герминативных клетках появляются перинуклеарные гранулы, которые сохраняются на стадии личинки и куколки, представляя собой электронно-плотную структуру, окружающую как облако (nuage) пространство ядра. Гранулы nuage, находясь в перинуклеарном пространстве цитоплазмы, как и Р-тельца сома-

тических клеток и Р-гранулы нематоды, часто ассоциированы с ядерными порами. Близость к ядерным порам может говорить о роли пиаге в образовании и перестройке рибонуклеиновых комплексов непосредственно в процессе их транспорта из ядра в цитоплазму (Findley et al., 2003). В линии герминативных клеток самок дрозофилы пиаге сохраняется в питающих клетках до тех пор, пока их содержимое будет продолжать переходить в ооцит. В ооците пиаге исчезает, когда на его заднем полюсе появляются полярные гранулы. Хотя присутствие в полярных и перинуклеарных гранулах общих белковых компонентов может говорить в пользу превращения пиаге в полярные гранулы, специальные исследования показали, что гранулы пиаге могут перемещаться из питающих клеток через кольцевые каналы в ооцит, но никогда не превращаются непосредственно в полярные гранулы (Snee, Macdonald, 2004).

ПЕРИНУКЛЕАРНЫЕ ГРАНУЛЫ И СИСТЕМА РНК-САЙЛЕНСИНГА

Общими компонентами перинуклеарных и полярных гранул являются следующие белки: *Vasa*, *Tudor*, *Valois* и *Aubergine*. Мутации в соответствующих генах обладают материнским эффектом стерильности, поэтому первые три из упомянутых генов получили названия королевских династий, прекративших свое существование из-за отсутствия потомства. Гены *vasa* и *tudor* кодируют РНК-хеликазу (Liang et al., 1994) и РНК-связывающий белок соответственно (Thomson, Lasko, 2004), непосредственное участие которых в системе РНКи не показано. Белок *Valois* необходим для привлечения в гранулы белка *Tudor* (Anne, Mechler, 2005). Ген *aubergine* кодирует белок семейства Argonaute, представители которого принимают то или иное участие в РНК-сайленсинге (см. выше). Мутанты дрозофилы, лишённые белков *Vasa* и *Aubergine*, не способны образовывать полярных гранул и стерильны.

Перинуклеарные гранулы содержат специфичные для них белки *Maelstrom* (Findley et al., 2003) и *Gustavus* (Styhler et al., 2002). Последний непосредственно взаимодействует с РНК-хеликазой *Vasa*; *Maelstrom* участвует в процессинге или посттрансляционной модификации *Vasa*. Таким образом, образование перинуклеарных гранул представляет собой достаточно сложный, по-видимому, последовательный процесс сборки разных белковых комплексов, обладающих РНК-связывающими свойствами и способных специфично взаимодействовать друг с другом и с разными типами РНК в этих частицах. Р-гранулы нематоды, собирающиеся в сложные структуры около ядерных пор (Pitt et al., 2000), соответствующие пиаге дрозофилы, судя по обнаружению у тех

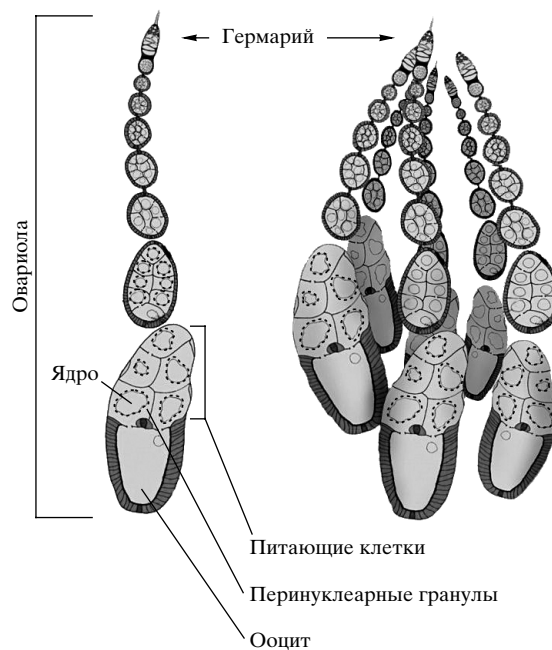


Рис. 2. Оогенез у дрозофилы. Перинуклеарные гранулы, окружающие ядра, в питающих клетках.

и других гомологичных хеликаз и РНК-связывающих белков (Kawasaki et al., 1998).

Начинают накапливаться данные, показывающие, что белки перинуклеарных гранул контролируют распределение известных белков системы РНКи в герминативных клетках. Мутация *maelstrom* приводит к тому, что белок *Ago2* в яйцниках дрозофилы начинает концентрироваться в перинуклеарных гранулах, содержащих *Vasa*, хотя в норме *Ago2* равномерно распределяется по цитоплазме питающих клеток (Findley et al., 2003). Распределение *Dicer* в этом случае также изменяется: равномерно распределенный в цитоплазме, как и *Ago2*, он концентрируется около ядер в составе дискретных гранул, которые отличны от перинуклеарных гранул с их специфическими белковыми маркерами и с характерным, достаточно плотным окаймлением ядерной оболочки со стороны цитоплазмы. Перечисленные, несколько отрывочные, наблюдения позволяют заключить, что гранулярная структура пиаге имеет непосредственное отношение к процессу РНК-сайленсинга.

Образование перинуклеарных гранул контролируется белком *Spn-E*, по-видимому, представляющим собой РНК-хеликазу (Gillespie, Berg, 1995). Локализация *Spn-E* в перинуклеарных гранулах не показана, но обнаружено, что мутация *spn-E* вызывает диссоциацию белка *Maelstrom* из гранул (Findley et al., 2003). Известно также, что *spn-E* контролирует в семенниках дрозофилы сайленсинг тандемно повторяющихся генов *Stellate*

(Aravin et al., 2001, 2004). Ген *spn-E* необходим для образования или стабилизации коротких РНК, комплементарных повторам *Stellate* (Aravin et al., 2004). Кроме того, было обнаружено, что мутации *spn-E* нарушают в яичниках дрозофилы искусственную РНКи, вызванную инъекцией дцРНК (Kennerdell et al., 2002). Перечисленные наблюдения показывают участие гена *spn-E* и кодируемой им РНК-хеликазы как в процессах РНК-сайленсинга, так и в образовании и поддержании структуры перинуклеарных гранул. Ген *armitage*, кодирующий другую РНК-хеликазу, также вовлечен в образование перинуклеарных гранул (Cook et al., 2004). Показано тесное соседство белка Armitage с гранулами и, кроме того, в опытах *in vitro* было обнаружено, что в отсутствие этого белка в лизатах яичников не может образовываться активный комплекс RISC (Tomari et al., 2004a). Хотя механизм функционирования РНК-хеликаз в РНК-сайленсинге в цитоплазматических герминативных гранулах неизвестен, их участие предсказуемо, учитывая способность этих белков не только расплетать дцРНК, но и диссоциировать рибонуклеопротеидные комплексы (Jankowsky et al., 2001; Linder et al., 2001).

Перинуклеарные гранулы, или *puage*, обнаружены и в мужских герминативных клетках дрозофилы, где они сохраняются в процессе дифференцировки, по крайней мере до стадии сперматоцита. Исследование в мужских герминативных клетках мышей хроматидных телец – структур, подобных *puage* и формирующих перинуклеарные образования, показали их связь с процессами РНК-сайленсинга (Kotaja et al., 2006). Хроматидные тельца обладают сходством с Р-тельцами соматических клеток: в обоих типах гранул обнаруживаются белки Ago, Dicer, а также микроРНК. Dicer в хроматидных тельцах связан с белком, гомологичным Vasa у дрозофилы. Все это позволило заключить, что хроматидные тельца являются компартментами хранения и процессинга РНК. Предполагается, что эти тельца могут функционировать как компартменты, обслуживающие пути функционирования микроРНК.

Инициатором образования полярных гранул на заднем полюсе ооцита *D. melanogaster* является РНК-связывающий белок Oskar. Скорее всего, Oskar, концентрирующийся на заднем полюсе ооцита, привлекает белки, входящие в состав полярных гранул, прежде всего белок Vasa, после чего рекрутируются остальные белки полярных гранул, присутствие которых определяет формирование герминативной плазмы ооцита. Возможно, что в регуляции трансляции белка Oskar, являющегося ключевым при образовании полярных гранул, также принимает участие система РНК-сайленсинга. Регуляция трансляции Oskar в процессе созревания ооцита была изучена особенно тщательно (Wilhelm, Smibert, 2005). Только

после того как мРНК Oskar, направляемая системой микротрубочек, переместится к заднему полюсу ооцита, начинается ее трансляция. Таким образом, локализация мРНК и ее трансляция жестко координированы. По-видимому, регуляция трансляции Oskar осуществляется на этапе элонгации (Braat et al., 2004). Полагают, что на более ранних стадиях развития ооцита трансляция мРНК Oskar подавляется по механизму РНК-сайленсинга, возможно, с участием микроРНК, а на более поздних стадиях отложенную трансляцию осуществляют несколько (не менее шести) связывающихся с РНК и друг с другом белков (Braat et al., 2004; Wilhelm, Smibert, 2005). Мутации в генах *aub*, *maelstrom* и *spn-E*, контролирующих образование перинуклеарных гранул, приводят к преждевременной эктопической трансляции мРНК Oskar в передних, а не в задних отделах развивающегося ооцита, что сопровождается катастрофическими нарушениями в развитии эмбриона. Эктопическая трансляция Oskar вне заднего полюса ооцита приводит к нарушению образования полярных гранул и, следовательно, герминативной плазмы. В полярных гранулах дрозофилы находится белок Dicer, участвующий в образовании микроРНК. Здесь же обнаружен белок Piwi, относящийся к семейству Argonaute (Megosh et al., 2006). Таким образом, приведенные данные показывают, что как перинуклеарные, так и полярные гранулы содержат белки системы РНК-сайленсинга.

Выше мы указывали, что короткие РНК могут участвовать не только в подавлении трансляции, но и в регуляции экспрессии генов на уровне хроматина. Известно, что ряд белков системы РНК-сайленсинга, в том числе тех, которые входят в состав цитоплазматических герминативных гранул, локализуется и в клеточном ядре (Cox et al., 2000; Robb et al., 2005). Наши данные показывают, что подавление активности мобильных элементов в герминативных клетках может осуществляться с помощью коротких РНК на транскрипционном уровне.

РНК-САЙЛЕНСИНГ И ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕРМИНАТИВНЫХ ТКАНЯХ ДРОЗОФИЛЫ

Мутации в генах *spn-E* и *aub*, контролирующих систему РНК-сайленсинга, приводят к накоплению транскриптов мобильных элементов (Aravin et al., 2001; Kogan et al., 2003). Кроме того, подобное действие оказывают мутации в генах *armitage* и *piwi*, кодирующие соответственно предсказываемую РНК-хеликазу (Cook et al., 2004) и один из белков семейства Argonaute (Cox et al., 1998). Известно также, что мутации в гене *piwi* приводят к дерепрессии множественных копий трансгенов и

Дерепрессия ретротранспозонов в яичниках *D. melanogaster* у гомозигот по мутациям в генах системы РНКи

Мутации	Оценка количества транскриптов (ОТ-ПЦР)					Гибридизация <i>in situ</i>
	ДКП-содержащие элементы					
<i>spn-E</i>	<i>copia</i> ^{2,6}	<i>mdg1</i> ^{4,6,7}	<i>GATE</i> ⁵	<i>roo</i> ⁴	<i>gypsy</i> ⁴	<i>GATE</i> ⁵
<i>armi</i>	<i>copia</i> ⁶	<i>mdg1</i> ⁴		<i>roo</i> ⁴	<i>gypsy</i> ⁴	
<i>piwi</i>	<i>copia</i> ^{3,6}	<i>mdg1</i> ^{4,6}		<i>roo</i> ⁴		<i>copia</i> ³ <i>mdg1</i> ³
	LINE-элементы					
<i>spn-E</i>	<i>HeT-A</i> ^{1,2,4,6}	<i>TAHRE</i> ⁶		<i>I</i> -элемент ^{2,4,6}		<i>HeT-A</i> ² <i>I</i> -элемент ²
<i>armi</i>	<i>HeT-A</i> ^{2,4,6}			<i>I</i> -элемент ^{2,4}		<i>HeT-A</i> ² <i>I</i> -элемент ²
<i>piwi</i>	<i>HeT-A</i> ^{1,4,6}	<i>TAHRE</i> ⁶		<i>I</i> -элемент ^{4,6}		
<i>aub</i>	<i>HeT-A</i> ^{1,4}			<i>I</i> -элемент ⁴		<i>HeT-A</i> ^{1,2} <i>I</i> -элемент ²

Примечания. Дерепрессия обнаружена методом гибридизации *in situ* в питающих клетках яичников (*GATE*), питающих клетках и в развивающемся ооците яичников (*copia*, *HeT-A*, *I*-элемент), гермари и сперматогониях семенников (*mdg1*). Источники: ¹ Savitsky et al., 2006; ² Vagin et al., 2004; ³ Kalmykova et al., 2005; ⁴ Vagin et al., 2006; ⁵ Kogan et al., 2003; ⁶ Клёнов, неопубл. данные; ⁷ Aravin et al., 2001.

снижают количество коротких РНК, соответствующих этим трансгенам (Pal-Bhadra et al., 2002). Мутация в гене *armitage* снимает репрессию генов *Stellate* в семенниках, что подтверждает участие соответствующего белка в РНК-сайленсинге (Tomari et al., 2004a). Дерепрессию мобильных элементов под влиянием упомянутых мутаций оценивали двумя методами: по количеству кДНК, образуемой с помощью обратной транскриптазы на транскриптах этих элементов (ОТ-ПЦР), или же с помощью гибридизации *in situ*. Количество транскриптов мобильных элементов увеличивалось в несколько раз в яичниках особей, гомозиготных по мутациям, по сравнению с гетерозиготами, несущими только один мутантный аллель. Гибридизация *in situ* с мечеными олигонуклеотидными зондами, соответствующими тому или иному мобильному элементу, позволила обнаружить резкое увеличение уровня транскриптов как в питающих клетках, так и в ооцитах (Vagin et al., 2006). Обнаруживается дерепрессия ретротранспозонов разных типов, как содержащих длинные концевые повторы (ДКП) (*mdg1*, *copia* и *GATE*), так и без ДКП типа LINE (*I*-элемент и *HeT-A*) (таблица).

Особый интерес представляют исследования сайленсинга LINE-элементов. Перемещения *I*-элемента в яичниках дрозофилы, вызванные определенными направлениями скрещиваний, приводят к всплеску мутаций и стерильности самок (явление гибридного дисгенеза) (см. обзор: Bucheton et al., 2002). Поскольку гибридный дисгенез может определять изоляцию популяций дро-

зофил в природе, представляется важным выяснить, каким образом система РНК-сайленсинга может контролировать эти события. Ретротранспозон *HeT-A*, также относящийся к LINE-элементам, является главным теломерным мобильным элементом дрозофилы, присоединяющимся к концам хромосом и обеспечивающим стабильность генома (Pardue, DeBaryshe, 2003; Viessmann et al., 2005). Дрозофила не обладает теломеразой, и теломерные ретротранспозоны дрозофилы в отличие от других типов мобильных элементов можно рассматривать как полезные – необходимые для поддержания структуры концов хромосом и стабильности генома. Было обнаружено, что высокий уровень экспрессии *HeT-A* в герминативных клетках, вызванный нарушением РНК-сайленсинга при мутациях *spn-E* и *armitage* (Vagin et al., 2004), сопровождается на фоне мутации *spn-E* также резким увеличением частоты присоединения этого элемента к поврежденному концу хромосомы (Savitsky et al., 2006). Следовательно, система РНК-сайленсинга может участвовать в поддержании стабильности генома, поскольку поврежденные концы хромосом, лишенные нормальной теломерной структуры, могут сливаться, вызывая нарушения расхождения хромосом и возникновение новых хромосомных разрывов.

Тандемно повторенные ретротранспозоны *HeT-A* находятся на самом конце хромосомы. Проксимальнее, в зоне перехода к генам, специфичным для данной хромосомы, располагаются тандемные повторы TAS (telomere associated sequences), составляющие теломерный гетерохроматин

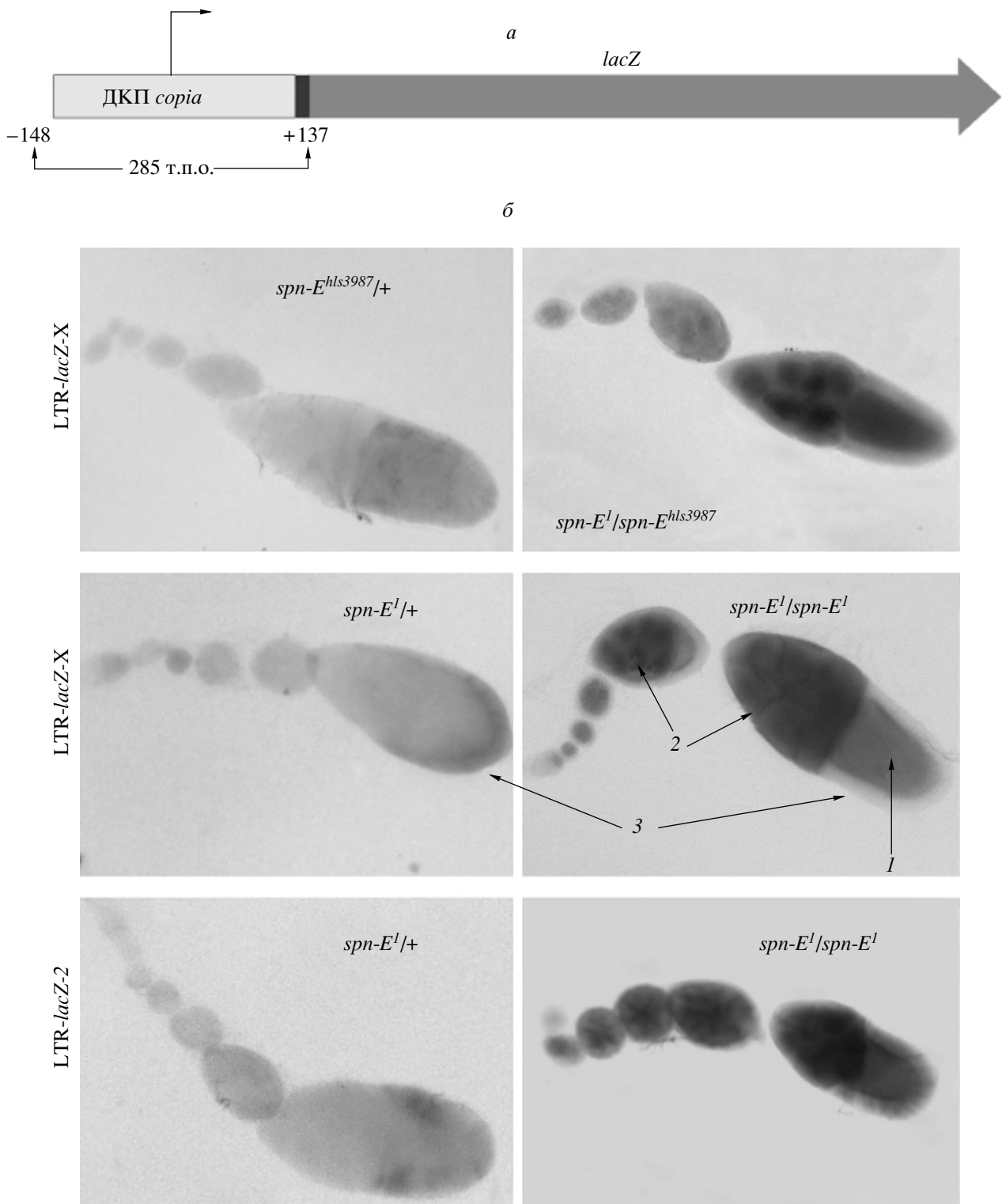


Рис. 3. Активация экспрессии гена-репортера *lacZ*, кодирующего β -галактозидазу, под контролем длинного концевго повтора (ДКП) *copia* в ооцитах особей дрозофилы, гомозиготных по мутации *spn-E*: *а* – схема структуры трансгена *LTR-lacZ*; *б* – окраска овариол на активность β -галактозидазы (трансген *LTR-lacZ* находится в хромосоме X (*LTR-lacZ-X*) или 2 (*LTR-lacZ-2*). 1 – цитоплазма ооцита; 2 – питающие клетки; 3 – слой фолликулярных клеток.

(Biessmann et al., 2005). Нам удалось показать, что количество транскриптов TAS также заметно увеличивается в яйчиках мутантов *spn-E*. Возможно, что TAS играют роль в подавлении экспрессии соседствующих с ними элементов *HeT-A*, если предполагать их *цис*-действие в качестве гетерохроматиновых блоков на рядом расположенные повторы *HeT-A*. Таким образом, система РНК-сайленсинга, контролируемая геном *spn-E*, может быть вовлечена в двойной контроль за состоянием теломеры, оказывая репрессирующее действие как на повторы TAS, так и на примыкающие к ним ретротранспозоны.

Контроль за перемещениями с помощью системы РНК-сайленсинга был показан не только для теломерных ретротранспозонов, но и для ретротранспозонов, ограниченных ДКП. Так, транспозиции *mdg1* резко активировались в семенниках у гомозигот при нарушении РНК-сайленсинга, вызванного мутацией в гене *piwi*, кодирующем белок семейства Argonaute (Kalmykova et al., 2005). Возникающие при этом новые инсерции *mdg1* наследовались в следующем поколении.

Полученные результаты касаются естественной регуляции экспрессии эндогенных ретротранспозонов, представленных в геноме множеством копий. Нам удалось показать также влияние мутаций в генах *spn-E*, *armitage* и *piwi* на экспрессию гена-репортера в единичной трансгенной конструкции, где уровень экспрессии β -галактозидазы определялся прилежащим ДКП элементом *copia*. На фоне указанных мутаций уровень активности β -галактозидазы увеличивался в 9–13 раз. При выявлении активности фермента гистохимическим методом усиление активности наблюдали в питающих клетках и ооците, но не в соматических фолликулярных клетках яйцевой камеры яйчика (рис. 3). В других соматических клетках мутантов, включая ткань мозга, имагинальные диски и слюнные железы, заметного изменения активности β -галактозидазы не было отмечено. Эти результаты указывают на особую роль РНК-сайленсинга в герминативных клетках. Высокая специфичность системы РНК-сайленсинга в отношении мобильных элементов в герминативных клетках обеспечивается активной экспрессией соответствующих белков и высокой концентрацией *gasi*РНК.

Систему РНК-сайленсинга, направленную на подавление экспрессии мобильных элементов, можно рассматривать как сложившуюся в эволюции вида в результате совместной эволюции мобильного элемента и генома хозяина. Это представление подкрепляется результатами наших исследований, проведенных совместно с лабораторией М.Б. Евгеньева (ИМБ РАН) на линии *D. melanogaster*, содержащей искусственно введенный мобильный элемент *Penelope* (Pyatkov et al., 2002),

населяющий геном другого вида – *Drosophila virilis* (Evgen'ev et al., 1997). *Penelope* относится к особому классу ретротранспозонов (Pyatkov et al., 2004). Элемент был инъецирован в эмбрионы *D. melanogaster* на ранних стадиях развития в район расположения примордиальных герминативных клеток, после чего он интегрировался в геном *D. melanogaster*, где экспрессировался и размножился (Pyatkov et al., 2002). Для исследования возможного влияния РНК-сайленсинга на поведение чужеродного мобильного элемента в геном *D. melanogaster*, содержащий несколько копий *Penelope*, были введены мутации *spn-E* или *armi*. У особей, гомозиготных по этим мутациям, не было обнаружено увеличения экспрессии *Penelope*, хотя в этих линиях сильно увеличивалось количество транскриптов *HeT-A*. Полученный результат можно объяснить тем, что при кратковременном “сожительстве” *Penelope* с чужим геномом еще не успели возникнуть и установиться те системы РНК-сайленсинга, которые у *D. melanogaster* существуют в отношении собственных ретротранспозонов.

Механизм сайленсинга мобильных элементов с участием системы РНКи остается малоизученным. Неясно, как образуются *gasi*РНК, соответствующие мобильным элементам и другим геномным повторам. Полагают, что в случае ДНК-транспозонов, обладающих концевыми инвертированными повторами, транскрипты этих элементов будут содержать на концах комплементарные последовательности, складывающиеся в двухцепочечную шпильку, процессинг которой может приводить к образованию коротких РНК (Гвоздев, 2003; Sijen, Plasterk, 2003). Возникает вопрос, необходима ли смысловая, а не только антисмысловая транскрипция мобильных элементов для подавления их экспрессии. Необходимо ли образование инициатора сайленсинга – *dic*РНК, предполагаемого предшественника коротких эффекторных РНК, нарезаемых белком Dicer? Недавно было обнаружено, что Dicer у *D. melanogaster* не нужен для сайленсинга ретротранспозонов с помощью *gasi*РНК (Vagin et al., 2006). Эти результаты позволили предполагать, что путь процессинга *gasi*РНК ретротранспозонов отличен от ранее изученных способов процессинга *si*РНК и микроРНК с участием белка Dicer.

Схема участия *gasi*РНК в РНК-сайленсинге, основанная на результатах исследования компактизации гетерохроматина повторяющихся элементов дрожжей *S. pombe*, показана на рис. 4. Предполагается, что *gasi*РНК, соответствующие этим повторам, могут гибридизоваться с гомологичными последовательностями новообразованной РНК в процессе случайной транскрипции этих участков гетерохроматина (Buhler et al., 2006). В результате двухцепочечные участки РНК привлекают белковый комплекс сайленсинга, осу-

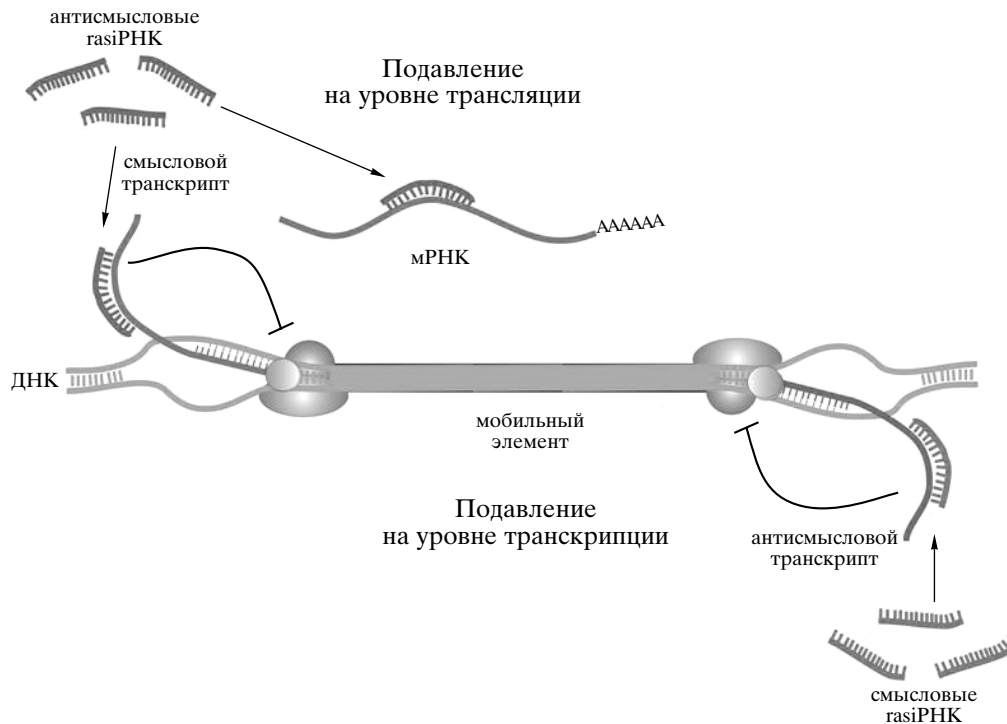


Рис. 4. Участие коротких смысловых и антисмысловых gsiРНК в репрессии геномных повторов на уровне хроматина.

ществляющий модификацию гистонов, прежде всего метилирование лизина 9 гистона H3 (указан номер аминокислоты от N-конца молекулы). Эта модификация рассматривается как характерный признак неактивного конденсированного хроматина (Richards, Elgin, 2002).

Анализ библиотек, содержащих клонированные последовательности gsiРНК ретротранспозонов (данные получены совместно с А.А. Аравиным), позволил обнаружить ожидаемое резкое снижение количества gsiРНК в яйчиках особей, где экспрессия ретротранспозонов была активирована вследствие мутации в гене *spn-E*. Библиотеки содержали как смысловые, так и антисмысловые последовательности gsiРНК. Поэтому остается открытым вопрос, всегда ли активным агентом сайленсинга являются только антисмысловые gsiРНК или же определенную роль играют и смысловые gsiРНК. Поскольку мобильные элементы могут транскрибироваться в двух противоположных направлениях, нельзя исключить, что смысловые gsiРНК также участвуют в подавлении транскрипции ретротранспозонов, взаимодействуя с антисмысловыми транскриптами (рис. 4). В последнем случае наряду с подавлением антисмысловой вполне возможно и подавление смысловой транскрипции за счет распространения компактизованной структуры хроматина по хромосоме. Мы показали, что при вызванной мутациями дерепрессии ретротранспозона *coria* и

I-элемента активируются как их смысловая, так и антисмысловая транскрипции. Однако в случае теломерного ретротранспозона *HeT-A* его дерепрессия сопровождалась резким увеличением только количества смыслового транскрипта, тогда как антисмысловая транскрипция продолжала оставаться на очень низком уровне. Возможно, что вклад смысловых и антисмысловых gsiРНК в регуляцию экспрессии разных ретротранспозонов различен. Остается невыясненным вопрос, осуществляется ли сайленсинг ретротранспозонов дрозофилы на уровне трансляции или же в основном имеет место регуляция экспрессии этих элементов на уровне хроматина.

Прямые оценки состояния хроматина мобильных элементов в норме и при мутациях, вызывающих их дерепрессию, доказывают возможность участия gsiРНК в транскрипционном сайленсинге мобильных элементов в герминативных тканях дрозофилы. Дерепрессия мобильных элементов сопровождалась увеличением чувствительности хроматина к обработке выделенных ядер ДНКазой I (Клёнов, 2005). Это один из хорошо известных тестов, обнаруживающих положительную корреляцию между чувствительностью хроматина к ДНКазе и его транскрипционной активностью. Характеристики хроматина мобильных элементов в герминативных тканях в норме и при дерепрессии были получены и с помощью другого, сейчас широко распространенного, метода им-

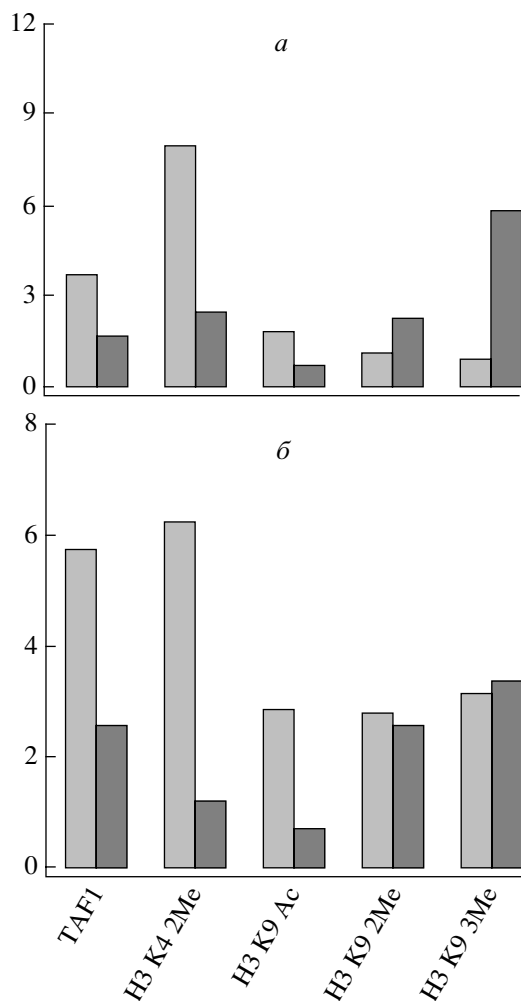


Рис. 5. Дерепрессия хроматина ретротранспозонов в результате мутации *spn-E* в ооцитах; содержание активных модификаций гистона H3 увеличивается.

В хроматине открытой рамки считывания *HeT-A* (а) и промотора *I*-элемента (б) оценивали содержание модифицированных гистонов (гистона H3, диметилированного по лизину 4 (H3 K4 2Me); ацетилированного по лизину 9 (H3 K9 Ac); ди- и триметилированного по лизину 9 (H3 K9 2Me, H3 K9 3Me)), а также фактора транскрипции TAF1.

Анализ проводили для гомо- (□) и гетерозигот (■) *spn-E*; высота столбиков указывает относительное содержание в хроматине маркера гистонов или TAF1 относительно контрольного гена – алкогольдегидрогеназы *adh*.

мунопреципитации хроматина. Здесь используют антитела, специфичные к определенным модификациям гистонов, которые позволяют извлекать фрагменты хроматина, обогащенные теми или иными модифицированными молекулами гистонов. Затем ДНК, входящую во фракцию хроматина, взаимодействующую с антителами, подвергают амплификации с помощью специфических праймеров. Было обнаружено, что в хроматине ряда ретротранспозонов (рис. 5) при их дерепрессии увеличивается содержание димет-

тилированного лизина 4 и ацетилированного лизина 9 гистона H3 (Клёнов, 2005). Обе модификации известны как маркеры активного хроматина (Bernstein et al., 2002; Lachner et al., 2003). Метод иммунопреципитации хроматина показал также, что мутации увеличивают содержание фактора транскрипции TAF1, являющегося компонентом TFIID РНК-полимеразы II (Albright, Tjian, 2000). Отметим, что увеличение количества ацетилированного лизина 9 в ряде случаев (для *I*-элемента) не сопровождалось эквивалентным убыванием диметилированного лизина 9 (маркер неактивного хроматина), хотя для отдельной молекулы гистона H3 эти модификации являются альтернативными. Полученный результат можно объяснить тем, что используемый метод анализа хроматина отражает лишь тотальное содержание модифицированных молекул гистонов, возможно располагающихся в разных нуклеосомах и, следовательно, в разных молекулах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В цитоплазме соматических и герминативных клеток эукариот локализованы перинуклеарные гранулы, тесно связанные с ядерными порами и, по-видимому, являющиеся местом перестройки рибонуклеопротеинов, выходящих из ядра в цитоплазму. Вероятно, гранулы представляют собой те цитоплазматические компартменты, в которых происходит замещение одних РНК-связывающих белков другими, что обеспечивает как временное маскирование мРНК, так и трансляцию РНК в определенное время и в нужном месте развивающегося ооцита. Исследования последних лет показали, что гранулы содержат компоненты системы РНК-сайленсинга (РНКи), участвующей в негативной регуляции трансляции. Гранулярный компонент, содержащий компоненты системы РНКи, особенно развит в герминативных клетках, представляя собой, например, перинуклеарные гранулы в клетках яичника насекомых или хроматидные тельца в сперматоцитах млекопитающих. Наряду с процессами регуляции трансляции, обеспечивающей образование специфических белков в нужное время и в нужном месте развивающегося ооцита, в герминативных клетках развита система сайленсинга мобильных элементов, перемещения которых здесь особенно опасны. Хотя мы обнаружили, что РНК-сайленсинг мобильных элементов осуществляется преимущественно в герминативных клетках, роль гранулярного аппарата в этом процессе остается неясной. Интересно, что одни и те же гены, кодирующие, например, РНК-хеликазы, участвуют как в образовании цитоплазматических перинуклеарных гранул, так и в подавлении экспрессии мобильных элементов в ядре на уровне хроматина. Это можно объяснить тем, что отдель-

ные белки системы РНК-сайленсинга могут функционировать как в пути образования микроРНК, регулирующих трансляцию мРНК морфогенов (факторов транскрипции, компонентов сигнальных путей и др.) в цитоплазматических гранулах, так и *gasi*РНК, подавляющих экспрессию мобильных элементов, вероятно, в ядре. Подобным же образом пути образования микроРНК и *si*РНК из длинных *ds*РНК (см. рис. 1) не являются изолированными друг от друга – белок Loqs может участвовать в обоих процессах (Forstemann et al., 2005). Такой “перекрестный разговор” обеспечивает новые возможности регуляции, что имеет место, например, при взаимодействиях разных сигнальных путей.

Таким образом, в герминативных клетках присутствует развитый аппарат контроля не только трансляции мРНК, например с помощью микроРНК, но и транскрипции мобильных элементов, осуществляемого при участии *gasi*РНК – специализированного класса коротких РНК. *gasi*РНК длиннее (25–26 нуклеотидов), чем микроРНК и *si*РНК (21–23 нуклеотида) и образуются из РНК-предшественника, по-видимому, без участия белка Dicer, необходимого для процессинга микроРНК и *si*РНК (Vagin et al., 2006). Процессинг *gasi*РНК, как и *pri*-микроРНК (рис. 1), скорее всего осуществляется в ядре, где *gasi*РНК направлены на транскрипционный сайленсинг мобильных элементов. Вероятно, процессы образования *gasi*РНК компартиментализованы в ядре, подобно, например, процессам созревания во внутриядерных тельцах Кахалы малых РНК, участвующих в сплайсинге (Dundr, Misteli, 2001). Компоненты ядерных частиц, содержащих *gasi*РНК, могут переходить в цитоплазму, включаясь в состав перинуклеарных гранул. Здесь *gasi*РНК могли бы участвовать и в подавлении трансляции мРНК мобильных элементов.

На пути исследования молекулярной природы загадочных перинуклеарных и полярных гранул цитоплазмы герминативных клеток делаются первые шаги. Вопрос об их ядерных предшественниках остается совершенно невыясненным. Исследования в этом направлении представляются особенно актуальными, поскольку их результаты могут пролить свет на механизмы РНК-сайленсинга как в ядре, так и в цитоплазме герминативных клеток. Особый интерес представляет исследование механизма процессинга *gasi*РНК и выяснение природы плейотропизма мутаций, которые одновременно нарушают раннее эмбриональное развитие, сборку перинуклеарных гранул и сайленсинг мобильных элементов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аравин А.А., Вагин В.В., Наумова Н.М. и др. Феномен РНК-интерференции и развитие организма // *Онтогенез*. 2002а. Т. 33. № 5. С. 349–360.
- Аравин А.А., Клёнов М.С., Вагин В.В. и др. Роль двухцепочечной РНК в подавлении экспрессии генов у эукариот // *Молекуляр. биология*. 2002б. Т. 36. № 2. С. 240–251.
- Гвоздев В.А. Мобильные гены и явление РНК-интерференции // *Генетика*. 2003. Т. 39. № 2. С. 151–156.
- Клёнов М.С. Роль РНК-интерференции в подавлении транскрипции ретротранспозонов и тандемных повторов у *D. melanogaster*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ИМБ РАН, 2005. 25 с.
- Клёнов М.С., Гвоздев В.А. Формирование гетерохроматина: роль коротких РНК и метилирования ДНК // *Биохимия*. 2005. Т. 70. № 11. С. 1445–1458.
- Котельников Р.Н., Шниз С.Г., Калмыкова А.И. и др. Белки, связывающие РНК, в процессах РНК-интерференции // *Молекуляр. биология*. 2006. Т. 40. № 4. С. 1–14.
- Albright S.R., Tjian R. TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas // *Gene*. 2000. V. 242. № 1–2. P. 1–13.
- Anderson P., Kedersha N. RNA granules // *J. Cell Biol.* 2006. V. 172. № 6. P. 803–808.
- Anne J., Mechler B.M. Valois, a component of the nuage and pole plasm, is involved in assembly of these structures, and binds to Tudor and the methyltransferase Capsuleen // *Development*. 2005. V. 132. № 9. P. 2167–2177.
- Aravin A.A., Naumova N.M., Tulin A.V. et al. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline // *Curr. Biol.* 2001. V. 11. № 13. P. 1017–1027.
- Aravin A.A., Lagos-Quintana M., Yalcin A. et al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development // *Devel. Cell*. 2003. V. 5. № 2. P. 337–350.
- 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. № 15. P. 6742–6750.
- Bao N., Lye K.W., Barton M.K. MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome // *Devel. Cell*. 2004. V. 7. № 5. P. 653–662.
- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell*. 2004. V. 116. № 2. P. 281–297.
- Bartel B., Bartel D.P. MicroRNAs: at the root of plant development? // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. № 2. P. 709–717.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // *Nature*. 2001. V. 409. № 6818. P. 363–366.
- Bernstein B.E., Humphrey E.L., Erlich R.L. et al. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 13. P. 8695–8700.
- Bhattacharyya S.N., Habermacher R., Martine U. et al. Relief of microRNA-mediated translational repression in hu-

- man cells subjected to stress // *Cell*. 2006. V. 125. № 6. P. 1111–1124.
- Biessmann H., Prasad S., Walter M.F. et al.* Euchromatic and heterochromatic domains at *Drosophila* telomeres // *Biochem. Cell Biol.* 2005. V. 83. № 4. P. 477–485.
- Braat A.K., Yan N., Arn E. et al.* Localization-dependent oskar protein accumulation; control after the initiation of translation // *Devel. Cell*. 2004. V. 7. № 1. P. 125–131.
- Bruno I., Wilkinson M.F.* P-bodies react to stress and non-sense // *Cell*. 2006. V. 125. № 6. P. 1036–1038.
- Bucheton A., Busseau I., Teninges D. I* Elements in *Drosophila melanogaster* // *Mobile DNA II*. Washington: ASM Press, 2002. P. 796–812.
- Buhler M., Verdel A., Moazed D.* Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing // *Cell*. 2006. V. 125. № 5. P. 873–886.
- Cerutti H., Casas-Mollano J.A.* On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man // *Curr. Genet.* 2006. V. 50. № 2. P. 81–99.
- Cook H.A., Koppetsch B.S., Wu J. et al.* The *Drosophila* *SDE3* homolog *armitage* is required for oskar mRNA silencing and embryonic axis specification // *Cell*. 2004. V. 116. № 6. P. 817–829.
- Cox D.N., Chao A., Baker J. et al.* A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal // *Genes Devel.* 1998. V. 12. № 23. P. 3715–3727.
- Cox D.N., Chao A., Lin H.* piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells // *Development*. 2000. V. 127. № 3. P. 503–514.
- Denli A.M., Tops B.B., Plasterk R.H. et al.* Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex // *Nature*. 2004. V. 432. № 7014. P. 231–235.
- Dundr M., Misteli T.* Functional architecture in the cell nucleus // *Biochem. J.* 2001. V. 356. Pt 2. P. 297–310.
- Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T.* RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs // *Genes Devel.* 2001a. V. 15. № 2. P. 188–200.
- Elbashir S.M., Martinez J., Patkaniowska A. et al.* Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate // *EMBO J.* 2001b. V. 20. № 23. P. 6877–6888.
- Evgen'ev M.B., Zelentsova H., Shostak N. et al.* Penelope, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 1. P. 196–201.
- Extavour C.G., Akam M.* Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation // *Development*. 2003. V. 130. № 24. P. 5869–5884.
- Findley S.D., Tamanaha M., Clegg N.J. et al.* *Maelstrom*, a *Drosophila* spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1 homolog, Aubergine, in nuage // *Ibid.* 2003. V. 130. № 5. P. 859–871.
- Forstemann K., Tomari Y., Du T. et al.* Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. № 7. P. e236.
- Gillespie D.E., Berg C.A.* Homeless is required for RNA localization in *Drosophila* oogenesis and encodes a new member of the DE-H family of RNA-dependent ATPases // *Genes Devel.* 1995. V. 9. № 20. P. 2495–2508.
- Hammond S.M., Bernstein E., Beach D. et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells // *Nature*. 2000. V. 404. № 6775. P. 293–296.
- Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A. et al.* Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi // *Science*. 2001. V. 293. № 5532. P. 1146–1150.
- Hannon G.J.* RNA interference // *Nature*. 2002. V. 418. № 6894. P. 244–251.
- Hutvagner G., Zamore P.D.* A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex // *Science*. 2002. V. 297. № 5589. P. 2056–2060.
- Irvine D.V., Zaratiegui M., Tolia N.H. et al.* Argonaute slicing is required for heterochromatic silencing and spreading // *Ibid.* 2006. V. 313. № 5790. P. 1134–1137.
- Jankowsky E., Gross C.H., Shuman S. et al.* Active disruption of an RNA-protein interaction by a DEXH/D RNA helicase // *Ibid.* 2001. V. 291. № 5501. P. 121–125.
- Kalmykova A.I., Klenov M.S., Gvozdev V.A.* Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 6. P. 2052–2059.
- Kawasaki I., Shim Y.H., Kirchner J. et al.* PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in *C. elegans* // *Cell*. 1998. V. 94. № 5. P. 635–645.
- Kennerdell J.R., Yamaguchi S., Carthew R.W.* RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on *aubergine* and *spindle-E* // *Genes Devel.* 2002. V. 16. № 15. P. 1884–1889.
- Kogan G.L., Tulin A.V., Aravin A.A. et al.* The *GATE* retrotransposon in *Drosophila melanogaster*: mobility in heterochromatin and aspects of its expression in germline tissues // *Mol. Genet. Genomics*. 2003. V. 269. № 2. P. 234–242.
- Kotaja N., Bhattacharyya S.N., Jaskiewicz L. et al.* The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 8. P. 2647–2652.
- Lachner M., O'Sullivan R.J., Jenuwein T.* An epigenetic road map for histone lysine methylation // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. Pt 11. P. 2117–2124.
- Lee Y.S., Nakahara K., Pham J.W. et al.* Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways // *Cell*. 2004. V. 117. № 1. P. 69–81.
- Liang L., Diehl-Jones W., Lasko P.* Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities // *Development*. 1994. V. 120. № 5. P. 1201–1211.
- Linder P., Tanner N.K., Banroques J.* From RNA helicases to RNPases // *Trends Biochem. Sci.* 2001. V. 26. № 6. P. 339–341.
- Lippman Z., May B., Yordan C. et al.* Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small

- interfering RNA and histone modification // *PLoS Biol.* 2003. V. 1. № 3. P. e67.
- Liu J., Rivas F.V., Wohlschlegel J. et al. A role for the P-body component GW182 in microRNA function // *Nat. Cell Biol.* 2005a. V. 7. № 12. P. 1261–1266.
- Liu J., Valencia-Sanchez M.A., Hannon G.J. et al. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies // *Ibid.* 2005b. V. 7. № 7. P. 719–723.
- Liu Q., Rand T.A., Kalidas S. et al. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway // *Science.* 2003. V. 301. № 5641. P. 1921–1925.
- Matranga C., Tomari Y., Shin C. et al. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes // *Cell.* 2005. V. 123. № 4. P. 607–620.
- May B.P., Lippman Z.B., Fang Y. et al. Differential regulation of strand-specific transcripts from *Arabidopsis* centromeric satellite repeats // *PLoS Genet.* 2005. V. 1. № 6. P. e79.
- Megosh H.B., Cox D.N., Campbell C. et al. The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination // *Curr. Biol.* 2006. V. 16. № 19. P. 1884–1894.
- Meister G., Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA // *Nature.* 2004. V. 431. № 7006. P. 343–349.
- Mello C.C., Conte D., Jr. Revealing the world of RNA interference // *Ibid.* 2004. V. 431. № 7006. P. 338–342.
- Pal-Bhadra M., Bhadra U., Birchler J.A. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila* // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. № 2. P. 315–327.
- Pardue M.L., DeBaryshe P.G. Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres // *Ann. Rev. Genet.* 2003. V. 37. P. 485–511.
- Parker J.S., Barford D. Argonaute: a scaffold for the function of short regulatory RNAs // *Trends Biochem. Sci.* 2006. V. 31. № 11. P. 622–630.
- Parker J.S., Roe S.M., Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex // *Nature.* 2005. V. 434. № 7033. P. 663–666.
- Pitt J.N., Schisa J.A., Priess J.R. P granules in the germ cells of *Caenorhabditis elegans* adults are associated with clusters of nuclear pores and contain RNA // *Devel. Biol.* 2000. V. 219. № 2. P. 315–333.
- Pyatkov K.I., Shostak N.G., Zelentsova E.S. et al. Penelope retroelements from *Drosophila virilis* are active after transformation of *Drosophila melanogaster* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 25. P. 16150–16155.
- Pyatkov K.I., Arkhipova I.R., Malkova N.V. et al. Reverse transcriptase and endonuclease activities encoded by Penelope-like retroelements // *Ibid.* 2004. V. 101. № 41. P. 14719–14724.
- Rehwinkel J., Behm-Ansmant I., Gatfield D. et al. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing // *RNA.* 2005. V. 11. № 11. P. 1640–1647.
- Reinhart B.J., Bartel D.P. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats // *Science.* 2002. V. 297. № 5588. P. 1831.
- Richards E.J., Elgin S.C. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects // *Cell.* 2002. V. 108. № 4. P. 489–500.
- Robb G.B., Brown K.M., Khurana J. et al. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. V. 12. № 2. P. 133–137.
- Savitsky M., Kwon D., Georgiev P. et al. Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline // *Genes Devel.* 2006. V. 20. № 3. P. 345–354.
- Schramke V., Sheedy D.M., Denli A.M. et al. RNA-interference-directed chromatin modification coupled to RNA polymerase II transcription // *Nature.* 2005. V. 435. № 7046. P. 1275–1279.
- Sheth U., Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies // *Science.* 2003. V. 300. № 5620. P. 805–808.
- Sijen T., Plasterk R.H. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi // *Nature.* 2003. V. 426. № 6964. P. 310–314.
- Snee M.J., Macdonald P.M. Live imaging of nuage and polar granules: evidence against a precursor-product relationship and a novel role for Oskar in stabilization of polar granule components // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. № 10. P. 2109–2120.
- St Johnston D., Nusslein-Volhard C. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo // *Cell.* 1992. V. 68. № 2. P. 201–219.
- Styhler S., Nakamura A., Lasko P. VASA localization requires the SPRY-domain and SOCS-box containing protein, GUSTAVUS // *Devel. Cell.* 2002. V. 3. № 6. P. 865–876.
- Thomson T., Lasko P. *Drosophila tudor* is essential for polar granule assembly and pole cell specification, but not for posterior patterning // *Genesis.* 2004. V. 40. № 3. P. 164–170.
- Tomari Y., Du T., Haley B. et al. RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant *armitage* // *Cell.* 2004a. V. 116. № 6. P. 831–841.
- Tomari Y., Matranga C., Haley B. et al. A protein sensor for siRNA asymmetry // *Science.* 2004b. V. 306. № 5700. P. 1377–1380.
- Tuschl T., Zamore P.D., Lehmann R. et al. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro* // *Genes Devel.* 1999. V. 13. № 24. P. 3191–3197.
- Vagin V.V., Klenov M.S., Kalmykova A.I. et al. The RNA interference proteins and *Vasa* locus are involved in the silencing of retrotransposons in the female germline of *Drosophila melanogaster* // *RNA Biol.* 2004. V. 1. № 1. P. 54–58.
- 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. № 5785. P. 320–324.
- Verdel A., Jia S., Gerber S. et al. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex // *Ibid.* 2004. V. 303. № 5658. P. 672–676.
- Volpe T.A., Kidner C., Hall I.M. et al. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi // *Ibid.* 2002. V. 297. № 5588. P. 1833–1837.

Wang D., Kennedy S., Conte D., Jr. et al. Somatic misexpression of germline P granules and enhanced RNA interference in retinoblastoma pathway mutants // *Nature*. 2005. V. 436. № 7050. P. 593–597.

Wilhelm J.E., Smibert C.A. Mechanisms of translational regulation in *Drosophila* // *Biol. Cell*. 2005. V. 97. № 4. P. 235–252.

Yi R., Qin Y., Macara I.G. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs // *Genes Devel*. 2003. V. 17. № 24. P. 3011–3016.

Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A. et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals // *Cell*. 2000. V. 101. № 1. P. 25–33.

Role of Short RNAs in Regulating the Expression of Genes and Mobile Elements in Germ Cells

M. S. Klenov, A. D. Stolyarenko, S. S. Ryazansky,
O. A. Sokolova, I. N. Konstantinov, and V. A. Gvozdev

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Akademika Kurchatova Sq. 2, Moscow, 123182 Russia

E-mail: gvozdev@img.ras.ru, asyastol@rambler.ru

Abstract—Two main types of short RNAs, 21 to 25 nucleotides long, are involved in the negative regulation of gene expression in eukaryotes: microRNAs and small interfering RNAs (siRNAs) of the RNA interference system. MicroRNAs predominantly suppress the translation of mRNA targets, while siRNAs not only prevent mRNA translation and/or lead to mRNA degradation, but are also involved in the regulation of gene expression at the transcriptional level. In germ cells translational regulation of gene expression plays a significant role and its mechanism has been extensively studied in oogenesis of *Drosophila*. The role of heterochromatinization and chromatin compaction, which can repress the expression of mobile elements and other repeated elements of the genome, was studied to a lesser extent. Activation and transposition of mobile elements accompanied by mutations and chromosome rearrangements are especially dangerous in germline cells. It has been proposed that a specialized class of short RNAs, repeat associated siRNAs (rasiRNAs), can be involved in repression of the expression of mobile elements in *Drosophila* germ cells. Here we describe the findings on subcellular ribonucleoprotein structures characteristic of germ cells: perinuclear and polar granules containing proteins of the RNA interference and microRNA maturation system. Also, we present our own results revealing the role of genes of the RNA interference system in mobile element silencing in *Drosophila*.

Key words: short RNAs, mobile elements, perinuclear granules, polar granules, germ cells, oogenesis.