

ГЕНЕТИКА

УДК 577.218

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА HP1
С НЕТРАНСЛИРУЕМЫМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ ОБЛАСТЯМИ
РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ГРУППЫ *GYPSY* У *DROSOPHILA MELANOGASTER*****А.Р. Лавренов, Л.Н. Нефедова, А.И. Ким****Кафедра генетики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: aikim57@mail.ru*

В работе исследовано *in vitro* взаимодействие рекомбинантных белков-паралогов семейства HP1 (HP1a, HP1b и HP1c) с 5'-нетранслируемыми регуляторными областями ретротранспозонов группы *gypsy* у *Drosophila melanogaster*: *gypsy*, *Springer*, *Tirant*, *ZAM*, *Rover* и *17.6*. С использованием конкурентной ДНК подобраны условия, позволяющие добиться специфичного связывания с матрицей. Показано, что белки семейства HP1 эффективно связываются с 5'-нетранслируемой областью ретротранспозонов, имеющих в ее составе тандемные повторы. Обнаружено, что повторы абсолютно необходимы для связывания белка HP1a с 5'-нетранслируемой областью мобильных генетических элементов *Tirant* и *ZAM*. Отсутствие повторов в случае элемента *ZAM* или их число менее двух — в случае *Tirant* делает невозможным такое взаимодействие. Таким образом, наличие тандемных повторов в 5'-нетранслируемой области ретротранспозонов группы *gypsy* является важным инструментом регуляции их транспозиции гетерохроматиновыми белками.

Ключевые слова: гетерохроматиновые белки, дрозофила, *gypsy*, мобильные элементы, ретротранспозоны, нетранслируемые участки

Гетерохроматиновый белок HP1 (Heterochromatin Protein 1), кодируемый геном *Su(var)2-5*, принимает активное участие в формировании гетерохроматина и ассоциированном подавлении активности генов и мобильных генетических элементов (МГЭ). В геномах большинства эукариотических организмов имеется, по меньшей мере, один паралог гена *Su(var)2-5*, в то время как в геноме *Drosophila melanogaster* обнаружено пять паралогов гена *hpl*: *hpl1a* (*Su(var)2-5*), *hpl1b*, *hpl1c*, *hpl1d* (*rhino*), *hpl1e* [1]. Белки, кодируемые этими генами, имеют высококонсервативную сходную структуру, содержащую два ключевых домена: N-терминальный хромодомен (*chromo*), участвующий в связывании HP1 с N-концевым доменом гистона H3K9, и C-терминальный домен (*chromoshadow*), отвечающий за гомо- и гетеромеризацию HP1 [2].

Анализ экспрессии паралогов *hpl* у *D. melanogaster* выявил, что *hpl1a*, *hpl1b* и *hpl1c* экспрессируются во всех тканях взрослой мухи, а *hpl1d* и *hpl1e* — только в герминальных тканях самок и самцов соответственно [3]. Исследование хромосомной локализации белков семейства HP1 у дрозофилы показало, что паралоги HP1 имеют различное положение в хроматине: белок HP1a ассоциирован с гетерохроматином, белок HP1c обнаруживается исключительно в районах транскрипционно активного хроматина, а HP1b встречается как в гетеротак и в эухроматине [4, 5]. Белок HP1d локализован в гетерохроматине, в областях, содержащих кластеры

малых РНК. Он является важным компонентом процессинга рiРНК [1, 6]. Белок HP1e изучен мало. Известно, что он экспрессируется в герминальных тканях самцов. Предполагается, что каждый из паралогов выполняет специфичную функцию, а не дублирует уже имеющуюся. В то время как HP1a и HP1b подавляют транскрипцию генов, HP1c вызывает прямо противоположный эффект, активируя транскрипцию [4, 5]. Показано, что выключение гена *Su(var)2-5* (HP1a) является летальным [7], а инактивация гена *rhino* (HP1d) приводит к стерильности у самок [8].

Считается, что белок HP1 способен напрямую связываться с двух- и одноцепочечными молекулами ДНК, но точно установить участки взаимодействия пока не удалось. В некоторых работах утверждается, что белки HP1 связываются в основном с промоторной областью генов [9]. Отмечается, что при пониженном содержании белка HP1a у мутантов линии *D. melanogaster Su(var)2-5⁰⁵* наблюдается снижение уровней метилирования H3K27me3 в областях промоторов ряда генов, в то же время не наблюдается изменений в 3'-нетранслируемых областях тех же генов [10].

Белки семейства HP1 принимают участие не только в регуляции активности генов, но и в сайленсинге МГЭ. Подавление экспрессии МГЭ у *D. melanogaster* может осуществляться путем непосредственной компактизации участков хромосом, содержащих МГЭ, или путем РНК-интерференции.

Известно, что эти два пути тесно связаны между собой: РНК-интерференция играет важную роль в формировании гетерохроматина и, по-видимому, направляет его формирование [11]. Методом DamID было показано, что у *D. melanogaster* белки HP1 взаимодействуют с ДКП-ретротранспозонами, т.е. ретротранспозонами, содержащими длинные концевые повторы (ДКП), — 17.6, *Springer*, *McClintock* и др. [12], однако экспериментов, доказывающих непосредственное взаимодействие, довольно мало. В другой работе показали взаимодействие HP1a с ретротранспозонами, не имеющими ДКП, — *HeT-A* и *TART* [13]. Обнаружено, что HP1a ассоциирован с РНК, транскрибируемой с повторяющихся последовательностей ДКП *gypsy*, ДКП *copia* и других ДКП-ретротранспозонов [6]. Продemonстрировано прямое взаимодействие белка HP1a с 5'-нетранслируемой областью (5'-UTR, 5' untranslated region) ДКП-ретротранспозона *ZAM* в эксперименте *in vitro* [14]. Предполагается, что взаимодействие осуществляется благодаря имеющимся в повторах ретротранспозона инициаторным АТ-богатым участкам. Хромодомен HP1a напрямую узнает эти участки, образуя ДНК-белковый комплекс, от которого в обоих направлениях распространяются HP1a-ДНК-филаменты.

Показано, что ДКП-ретротранспозоны группы *gypsy* с тремя открытыми рамками считывания (эрантивирсы) обладают специфичностью интеграции в определенные последовательности ДНК. Группа *gypsy* подразделяется на три подгруппы в зависимости от специфичности интеграции: *ZAM*, *Idefix* и *gypsy* [15]. Кроме того, некоторые ДКП-ретротранспозоны ассоциированы с гетерохроматином. В частности, инсерции ретротранспозона *ZAM* у *D. melanogaster* обнаруживаются преимущественно в районах гетерохроматина [16].

Известно, что 5'-UTR ДКП-ретротранспозонов содержат tandemные повторы разного нуклеотидного состава, роль которых в регуляции активности этих МГЭ слабо изучена. Целью данной работы стало исследование роли tandemных повторов в 5'-UTR ДКП-ретротранспозонов подгрупп *ZAM*, *Idefix* и *gypsy* группы *gypsy* *D. melanogaster* во взаимодействии с ключевыми белками семейства HP1 — HP1a, HP1b и HP1c.

Материалы и методы

Получение рекомбинантных белков HP1a, HP1b и HP1c. Для амплификации полноразмерных копий генов семейства *hp1* использовали пары праймеров: HP1a (5'-TATATACATATGATGGGCAAGA AAA-3' и 5'-TTAATTCTCGAGATCTTCATTATCA-3'), HP1b (5'-TATATACATATGGCCGAATTCTCAG-3' и 5'-TTAATTCTCGAGGTCATCCGCATCC-3'), HP1c (5'-TATATACATATGGTTAAAAACGAGC-3' и 5'-TTAATTCTCGAGTTGATTTTCCGCC-3'). Клонирование генов проводили в плазмиде для экспрессии и очистки белков pET30 (Novagen, Германия)

по сайтам рестрикции *NdeI* и *NotI*. Рестриктицию проводили с применением рестриктаз *NdeI* и *NotI* фирмы (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколам производителя. Для лигирования с вектором использовали ДНК-лигазу фага T4 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы.

Для получения рекомбинантных белков штамм *Escherichia coli* BL21 трансформировали рекомбинантными плазмидами pET30::hp1a, pET30::hp1b и pET30::hp1c, содержащими полноразмерные копии генов *hp1a*, *hp1b* и *hp1c* соответственно. Выделение и очистка белков проводилась по методике, описанной нашей лабораторией ранее в статье Кузьмина и др. [17].

Диализ растворов белков проводили в диализных трубках SERVAPOR (Serva, Германия). 1 мл раствора белка в буфере для элюции с колонки HisTrap FF диализовали против 200 мл раствора (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 7,4) при 4°C в трех сменах буфера: по 3 ч в двух первых сменах и ночь в последней смене. Выпавший осадок отделяли центрифугированием в течение 30 мин на охлаждаемой центрифуге 5415R (Eppendorf, Германия) при 12000 g, супернатант собирали и использовали в дальнейшей работе.

Измерение концентрации белка проводили с помощью набора реактивов "Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination" (Sigma, США) по протоколу фирмы.

Фрагменты ДНК ретротранспозонов получали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Матрицей для ПЦР служила хромосомная ДНК, выделенная из особей *D. melanogaster* лабораторной линии SS из коллекции кафедры генетики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Для амплификации использованы пары праймеров, подобранные в программе UGENE (ugene.net) к области, охватывающей ДКП и нетранслируемую область МГЭ: *Springer* (5'-TTAACTAAGTTAACCG-3' и 5'-ATGACTCGCTCATGG-3'); 17.6 (5'-GTTCTTGAGCCATTT-3' и 5'-TGACATATTCACAT-3'); *gypsy* (5'-AACAATAACAATG-3' и 5'-CCCAACTCATTGGTT-3'); *Rover* (5'-TAACATAATATGCT-3' и 5'-GACCATATTTGAGT-3'); *ZAM* (5'-TTACCGACCCATC-3' и 5'-GATCGTGTAACCT-3'); *Tirant* (5'-CGGACACTCAACC-3' и 5'-AATTCATTTGAGGTTACTTA-3' — для полноразмерного фрагмента регуляторной области); (5'-GTCGACTGAAAGTGACTAGGA-3' и 5'-CGGTACAGTACGTGGTGTATT-3' — для амплификации участков, содержащих разное количество tandemных повторов (6 полиморфных вариантов)). Для поиска tandemных повторов использовали компьютерную программу Tandem Repeats Finder (tandem.bu.edu). Для амплификации конкурентной ДНК использовали праймеры CG4680

(5'-GAACTTCGATGGCAGTGATC-3' и 5'-GGTTGCCAATGCTCTTGAAC-3'; 5'-ATGGATCCCCGAGTTCGTG-3' и 5'-СТАСТТСТТССАAGCACTAGC-3').

ПЦР проводили с использованием Taq-полимеразы (Евроген, Россия) (2,5 ед/мкл), концентрация MgCl₂ – 2,5 мМ, каждого праймера – 0,4 мкМ. ПЦР проводили в амплификаторе ТП4-ПЦР-01 “Терцик” (ДНК-Технология, Россия). Схема этапов ПЦР: предварительный этап плавления ДНК – 2 мин при 95°C; 30 циклов – плавление 30 сек при 95°C, отжиг праймеров 1 мин при 55–60°C (в зависимости от температуры плавления праймеров) и синтез 1–2 мин (в зависимости от длины фрагмента) при 72°C; заключительная инкубация 10 мин при 72°C.

Фрагменты ДНК, которые планировали использовать для связывания, выделяли из агарозного геля с помощью набора Cleanup Mini (Евроген, Россия), в соответствии с протоколом, приложенным к набору.

Связывание белков HP1 с 5'-UTR ретротранспозонов методом гель-шифт. Связывание белка с ДНК проводили в пробирке объемом 0,5 мл в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl, 0,5 М KCl pH 7,4 в течение 30–60 мин при 0°C. Очищенные фрагменты (100 нг) смешивали с 8 мкг белка. В некоторых экспериментах, проведенных на нетранслируемой области элементов ZAM и Tirant, использовали концентрацию белка 0,125 мкг/мкл. В смеси присутствовала конкурентная проба ДНК – ампликат гена CG4680. Связывание анализировали в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Оценка эффективности связывания проводилась визуально, после окрашивания ПААГ в растворе бромистого этидия. Об образовании ДНК-белковых комплексов можно было судить по снижению количества целевых фрагментов и появлению ДНК-белковых комплексов, обладающих низкой электрофоретической подвижностью в геле.

В качестве контроля использовался бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США). Белок добавлялся в реакционную смесь вместо HP1 до конечной концентрации 0,5 мкг/мкл.

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что у *D. melanogaster* ретровирусы (эрантивирусы) с тремя открытыми рамками считывания (ОРС) и производные от них ДКП-ретротранспозоны группы *gypsy* с двумя ОРС проявляют специфичность в отношении выбора ДНК-мишени [15], в связи с чем ДКП-ретротранспозоны группы *gypsy* можно разделить на три подгруппы: *gypsy*, *ZAM* и *Idefix*. ДКП-ретротранспозоны подгруппы *Idefix* встраиваются в ТА-повторы (от 3 до 20 динуклеотидов), ДКП-ретротранспозоны подгруппы *gypsy* – преимущественно встраиваются в последовательность 5'-АТАТАТ-3', а ДКП-ретротранспозоны подгруппы *ZAM* предпочитают для встраивания мишень 5'-GCGCGC-3'.

Известно, что инсерции ДКП-ретротранспозонов обнаруживаются преимущественно в гетерохроматине [18]. Мы решили выяснить, различаются ли представители трех подгрупп ретротранспозонов группы *gypsy* по способности связываться с гетерохроматиновыми белками семейства HP1. Проанализировав последовательности ДКП-ретротранспозонов *Springer*, *gypsy*, *Rover*, *17.6*, *Tirant* и *ZAM* в секвенированном геноме *D. melanogaster*, мы обнаружили, что пять из них имеют tandemные повторы в 5'-UTR (таблица). По биоинформатическим данным, у элемента *Springer* в нетранслируемой области tandemные повторы отсутствуют, а элемент *gypsy* содержит наименьшее число повторов среди представленных элементов и наименьшую их протяженность. МГЭ *Tirant* – единственный МГЭ с варьирующим числом повторов (до шести). Примечательно, что и у *ZAM*, и у *Tirant* повторы характеризуются меньшим содержанием нуклеотидов А/Т, чем у других ДКП-ретротранспозонов.

Для исследования взаимодействия 5'-UTR ДКП-ретротранспозонов с гетерохроматиновыми белками нами были выделены и очищены белки HP1a, HP1b и HP1c (рис. 1А). Далее были поставлены эксперименты по связыванию этих белков с ДНК ДКП-ретротранспозонов *in vitro*. В качестве контроля использовали бычий сывороточный аль-

Таблица

Содержание и нуклеотидный состав tandemных повторов в нетранслируемых областях ДКП-ретротранспозонов группы *gypsy*

МГЭ	Длина tandemного повтора	Число повторяющихся модулей в нетранслируемой области	Длина области, занимаемой tandemными повторами (п.н.)	Содержание А/Т в tandemных повторах
<i>Springer</i>	–	0	–	–
<i>gypsy</i>	109	2	229	73,36%
<i>Rover</i>	151	3	462	76,84%
<i>17.6</i>	6	39	251	96,85%
<i>Tirant</i>	102	1–6	102–610	54,10%
<i>ZAM</i>	307	2,3	699	65,76%

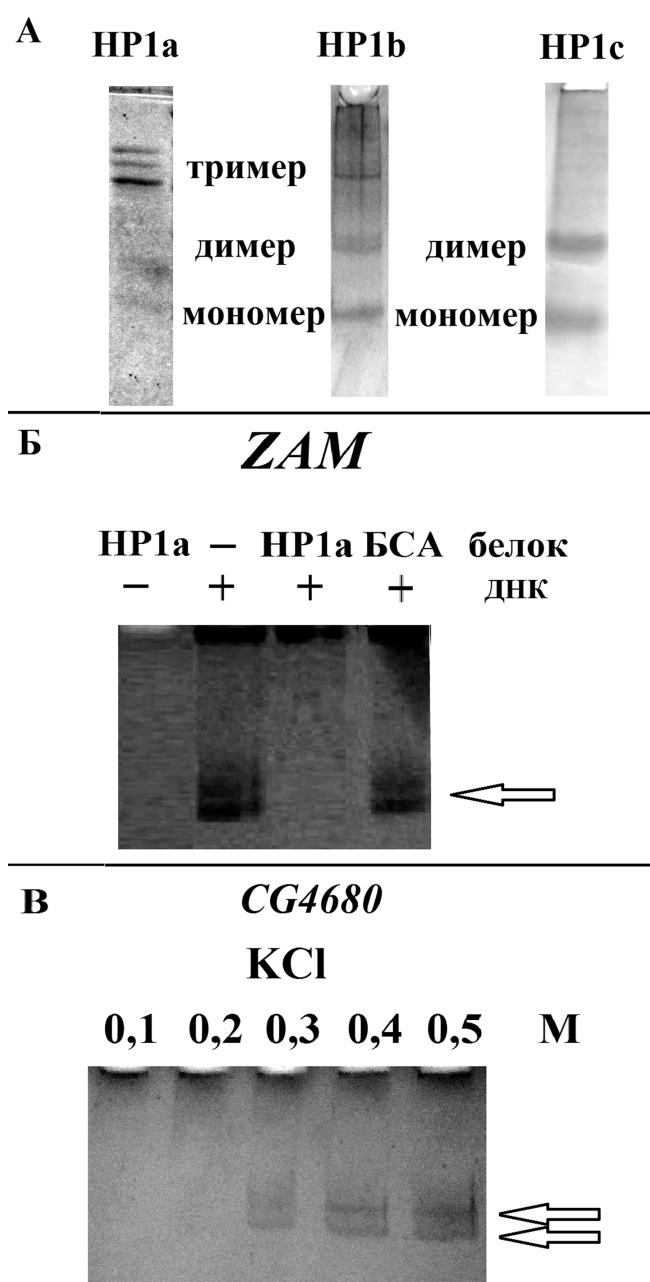


Рис. 1. А — электрофореграмма белков HP1a, HP1b и HP1c. Белок HP1a представлен в виде тримера и димера, HP1b — в трех вариантах макромолекулярных комплексов (моно-, ди- и тример); HP1c представлен в виде мономера и димера. Б — контрольная электрофореграмма. Связывание белка HP1a с амплификатами элемента *ZAM*. Знаком “+” обозначено присутствие в пробе ДНК; “—” — отсутствие. Во всех пробах использовался 0,5 М KCl. В — электрофореграмма эффективности связывания белка HP1a с амплификатами гена *CG4680* (900 и 1100 п.н.) при различной концентрации KCl (от 0,1 до 0,5 М). БСА — бычий сывороточный альбумин

бумин, который добавляли к матрице вместо белка HP1a (рис. 1Б). В качестве матрицы для связывания использовали амплификаты, содержащие 5'-UTR элементов *ZAM*, *Tirant*, *17.6*, *Rover*, *gypsy* и *Springer* (рис. 2). Для исследования взаимодействия использовали метод анализа изменения электрофоретической подвижности ДНК в ПААГ (гель-шифт). Помимо целевых фрагментов в общую смесь

для связывания добавляли конкурирующую ДНК, с которой ДНК-белковые комплексы образовываться не должны. Конкурирующая ДНК выступает контролем, подтверждающим, что исследуемый белок связывается специфически, игнорируя конкурента. В качестве конкурирующей ДНК использовали амплификат гена *D. melanogaster CG4680*, полученный с двух пар праймеров таким образом, чтобы образовывались фрагменты двух близких размеров — 900 и 1100 п.н. (рис. 1В). Этим мы проверяли возможность избирательного связывания белка HP1a с фрагментами разной длины. В ходе проведения экспериментов было обнаружено, что при низкой ионной силе раствора (0,1–0,2 М KCl) белок HP1a эффективно (неспецифично) связывается с конкурирующей ДНК (рис. 1В). Однако при концентрации KCl 0,4–0,5 М связывание конкурирующей ДНК с белком HP1a не происходит. При этом никакой избирательности белка HP1a в отношении длины ДНК мы не обнаружили. В дальнейших экспериментах по связыванию использовали 0,5 М KCl. В работе [19] исследовали стабильность комплексов ДНК-HP1 в различных составах солей. При высоких концентрациях KCl стабильность снижалась. Однако в наших экспериментах высокая концентрация KCl не влияла на стабильность ДНК-белковых комплексов, образованных белком HP1 и регуляторными областями ретротранспозонов, в отличие от ситуации с комплексами, образованными при участии контрольных фрагментов ДНК.

Кроме этого, было исследовано влияние различных концентраций белка HP1a на силу связывания. В результате проведенных экспериментов выявлено, что белок HP1a в концентрации 0,5 мкг/мкл способен связываться с 5'-UTR всех исследуемых МГЭ. Однако предпочтительнее HP1a связывается с нетранслируемыми областями элементов, содержащими тандемные повторы, богатые А/Т-последовательностями (*Tirant*, *ZAM*, *rover* и *17.6*). Хуже всего прошло связывание белка HP1a с 5'-UTR МГЭ *Springer*, не содержащей повторов (рис. 2). На электрофореграмме можно заметить неполное истощение его целевого продукта. Отметим, что используемая нами конкурирующая ДНК не содержит в своем составе повторяющихся последовательностей.

Анализ связывания белков HP1b и HP1c показал, что оба белка способны образовывать ДНК-белковые комплексы с регуляторными областями МГЭ *gypsy*, *Springer*, *Rover* и *17.6* (рис. 2). Однако в случае белка HP1c связывание с фрагментами происходит слабее в сравнении с опытами, проведенными с белками HP1a и HP1b. Примечательно, что только в случае элементов *ZAM* и *Tirant* сила связывания белков HP1a, HP1b и HP1c с матрицей была одинаковой: белок HP1c образовывал ДНК-белковые комплексы с той же эффективностью, что и HP1b и HP1a.

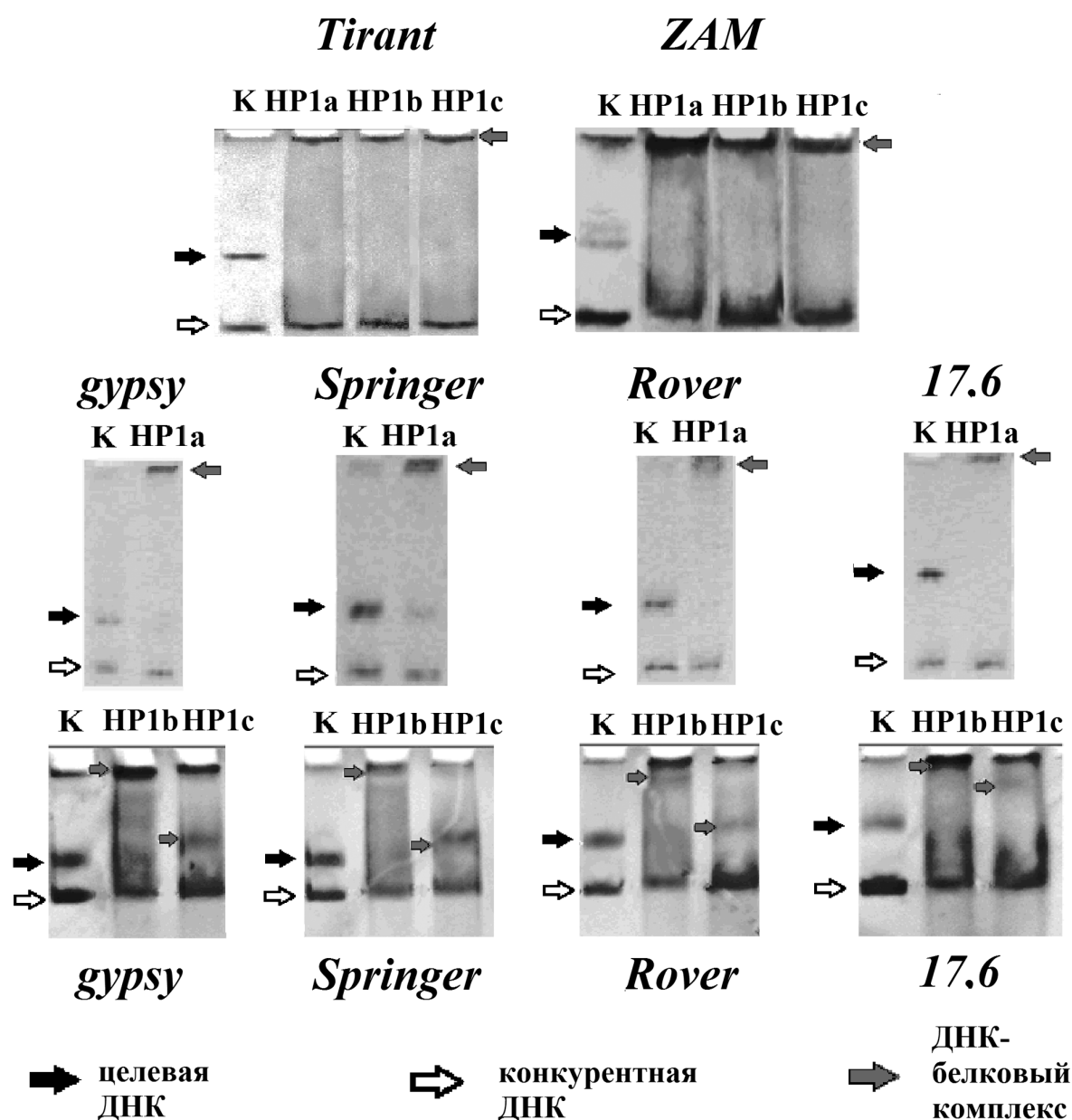


Рис. 2. Анализ гель-шифт связывания белков семейства HP1 с регуляторными участками ДКП-ретротранспозонов группы *gypsy*. Связывание белков HP1a, HP1b и HP1c с регуляторными участками элементов группы *gypsy* (*gypsy*, *Springer*, *Tirant*, *ZAM*, *Rover* и *17.6*). Концентрация белка во всех пробах – 0,5 мкг/мкл. Во всех пробах использовался 0,5 М KCl

Таким образом, 5'-UTR всех исследованных элементов, кроме *Springer*, хорошо связываются в белком HP1a, и это, очевидно, обусловлено наличием повторов в 5'-UTR. Два из шести исследованных МГЭ (*ZAM* и *Tirant*) одинаково эффективно связываются как с белком-маркером гетерохроматина (HP1a), так и с белком-маркером эухроматина (HP1c).

Для того чтобы определить концентрацию белка в пробе, достаточную для эффективного связывания с матрицей, мы провели эксперименты по связыванию 5'-UTR *ZAM* (содержит три повторяющихся модуля) и *Springer* (не содержит повторов) с разведениями белка HP1a (рис. 3). Обнаружено, что ПЦР-фрагмент ДНК, содержащий 5'-UTR элемента *ZAM* с тремя повторяющимися модуля-

ми, образует комплексы с HP1a уже при концентрации белка 0,125 мкг/мкл. В то же время полное связывание амплификата 5'-UTR элемента *Springer* обнаруживается только при концентрации белка 0,25 мкг/мкл. Таким образом, мы установили, что элемент *Springer* обладает наименьшим сродством к белкам семейства HP1 среди элементов его группы, поскольку для образования ДНК-белковых комплексов со всеми специфичными молекулами ДНК (амплификаты элемента *Springer*) требуется большее количество белка.

Мы предположили, что в случае с *ZAM* и *Tirant* важную роль при связывании с белками HP1 играет наличие крупных и множественных tandemных повторов в регуляторных областях элементов соответственно. Для подтверждения нашего предпо-

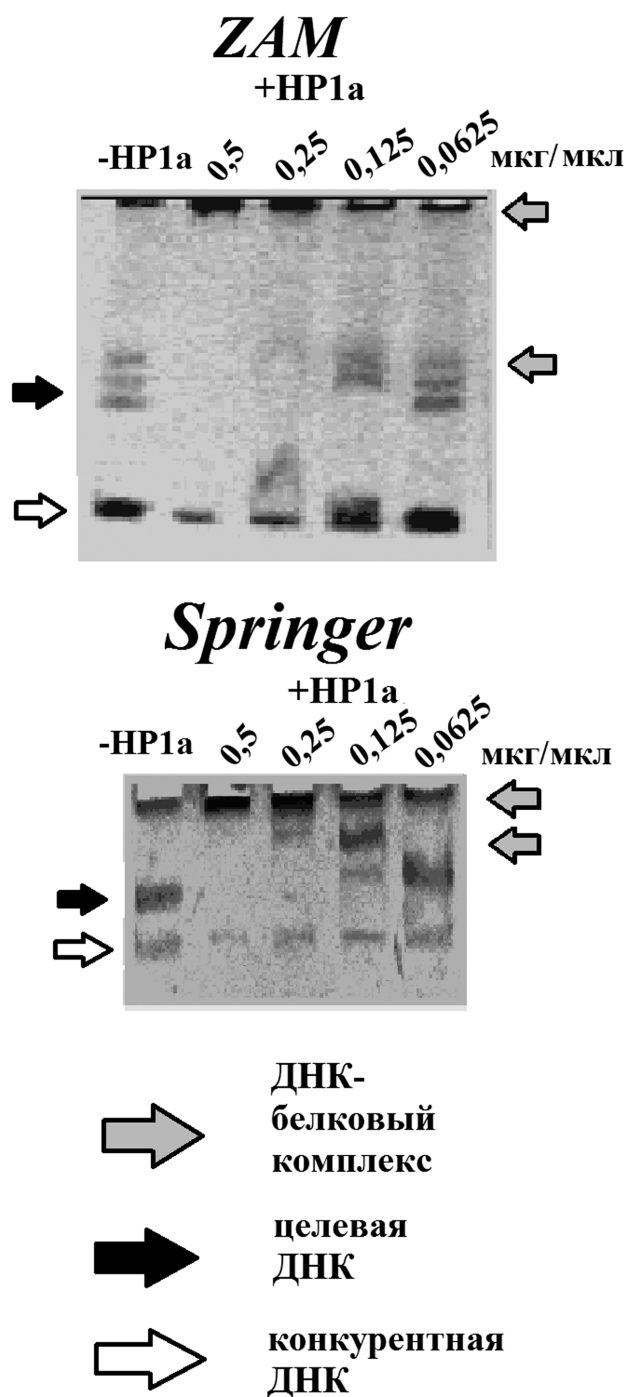


Рис. 3. Связывание белка HP1a в различных разведениях (0,5 мкг/мкл, 0,25 мкг/мкл, 0,125 мкг/мкл и 0,0625 мкг/мкл белка) с элементами *ZAM* и *Springer*. Три ампликата элемента *ZAM* на электрофореграмме представляют собой фрагменты, содержащие разное количество tandemных повторов (от 1 до 3).

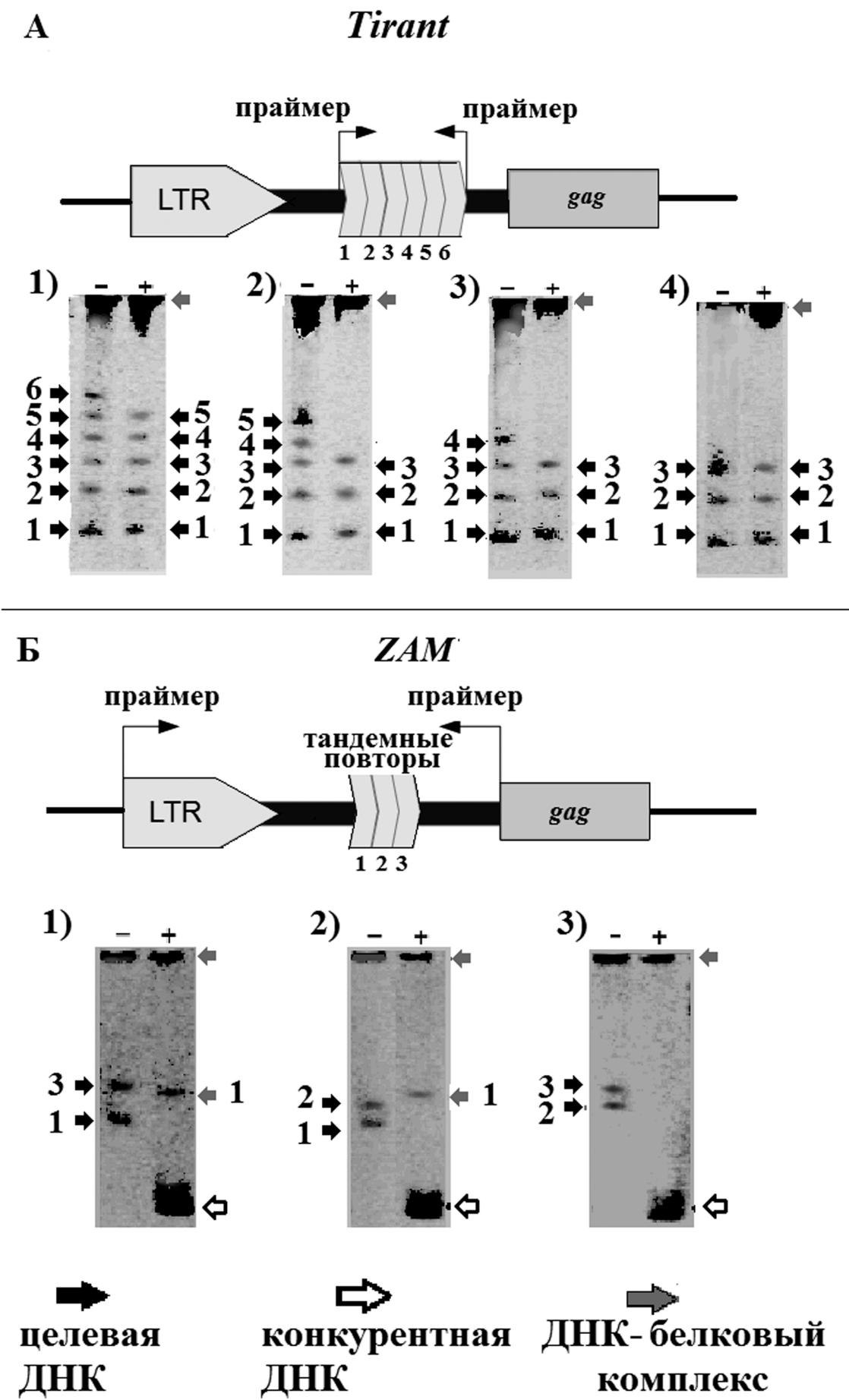
Во всех пробах использовался 0,5 М KCl

ложения мы провели серию экспериментов по связыванию различного числа tandemных повторов 5'-UTR *Tirant* и *ZAM* с белком HP1a.

Ранее было показано, что у *D. melanogaster* лабораторной линии SS из коллекции кафедры генетики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова присутствуют все возможные полиморфные варианты МГЭ *Tirant*, различающиеся количеством повторов в 5'-UTR [20]. С использованием праймеров, локализованных вблизи области tandemных повторов, мы провели амплификацию фрагментов *Tirant*, включающих 5'-UTR, используя в качестве матрицы геномную ДНК дрозофил линии SS. В результате амплификации мы получили набор фрагментов 5'-UTR, содержащих от одного до шести повторяющихся модулей по 102 п.н. Далее мы выделяли и очищали каждый из ПЦР-фрагментов и составляли их смеси. Всего было составлено четыре смеси. Первая смесь содержала все шесть возможных вариантов 5'-UTR (от самого длинного до самого короткого). Каждая последующая смесь отличалась от предыдущей отсутствием самого длинного фрагмента (рис. 4А).

При связывании белка HP1a с набором всех возможных полиморфных вариантов 5'-UTR МГЭ *Tirant* ДНК-белковые комплексы образовывались с ДНК-фрагментами, содержащими шесть tandemно повторяющихся модулей (рис. 4А1). Если мы убирали из общей смеси фрагмент, содержащий шесть повторяющихся модулей, связывание и образование ДНК-белковых комплексов происходило с ампликатами, имеющими четыре и пять повторяющихся модулей, а связывания с оставшимися ампликатами (1–3 повторяющихся модуля) не происходило (рис. 4А2). Похожая картина наблюдалась при удалении из смеси фрагмента с пятью повторяющимися последовательностями: несвязавшимися оставались ампликаты с 1–3 повторами, а связывание происходило с фрагментом, имеющим четыре повторяющихся модуля (рис. 4А3). Наконец, при тех же концентрациях HP1a и отсутствии ампликатов с четырьмя, пятью и шестью повторяющимися модулями связывания с оставшимися ампликатами (1–3 повторяющихся модуля) не происходило (рис. 4А4). Результат эксперимента говорит о том, что трех повторов недостаточно для эффективного связывания с белком HP1. Отметим, что избирательность связывания не зависит от длины фрагмента, это мы доказали с использованием фрагментов конкурирующей ДНК разной длины (рис. 1В).

Рис. 4. Связывание белка HP1a с ампликатами, содержащими различное число tandemных повторов в 5' UTR мобильных генетических элементов *Tirant* и *ZAM*. А1 – шесть ампликатов, содержащих от 1 до 6 tandemных повторов в 5' UTR *Tirant*; А2 – от 1 до 5 повторов в 5' UTR *Tirant*; А3 – от 1 до 4 повторов в 5' UTR *Tirant*; А4 – от 1 до 3 повторов в 5' UTR *Tirant*; Б1 – связывание белка HP1a с двумя вариантами ампликатов 5' UTR *ZAM*, содержащими три повторяющихся модуля и один повторяющийся модуль соответственно, Б2 – с двумя вариантами ампликатов 5' UTR *ZAM*, содержащими два повторяющихся модуля и один повторяющийся модуль соответственно, Б3 – с двумя вариантами ампликатов 5' UTR *ZAM*, содержащими три повторяющихся модуля и два повторяющихся модуля соответственно. Цифры рядом со стрелками соответствуют количеству tandemно повторяющихся модулей в 5' UTR. “+” – присутствие в пробе белка; “–” – отсутствие



Подобная картина наблюдалась и с элементом *ZAM*. Мы составляли разные комбинации амплификатов, содержащих от одного до трех повторяющихся модулей (тандемных повторов) длиной 307 п.н. в нетранслируемой области *ZAM*. Во всех трех экспериментах HP1a связывался полностью с фрагментами, имеющими два и три повторяющихся модуля (рис. 4Б). Амплификат с одним повторяющимся модулем связывался слабее, что наблюдали на электрофореграмме как небольшое смещение ПЦР-продукта (рис. 4Б1, Б2).

Таким образом, повторы абсолютно необходимы для связывания белка HP1a с 5'-UTR МГЭ *Tirant* и *ZAM*. Отсутствие повторов в случае элемента *ZAM* или их число менее двух — в случае *Tirant* делает невозможным такое взаимодействие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klattenhoff C., Xi H., Li C., Lee S., Xu J., Khurana J.S., Zhang F., Schultz N., Koppetsch B.S., Nowosielska A., Seitz H., Zamore P.D., Weng Z., Theurkauf W.E. The *Drosophila* HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters // *Cell*. 2009. Vol. 138. N 6. P. 1137–1149.
2. Bannister A.J., Zegerman P., Partridge J.F., Miska E.A., Thomas, J.O., Allshire R.C., Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain // *Nature*. 2001. Vol. 410. N 6824. P. 120–124.
3. Vermaak D., Henikoff S., Malik H. Positive selection drives the evolution of *rhino*, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila* // *PLoS Genet*. 2005. Vol. 1. N 1. P. 96–108.
4. Abel J., Eskeland R., Raffa G.D., Kremmer E., Imhof A. *Drosophila* HP1C is regulated by an autoregulatory feedback loop through its binding partner Woc // *PLoS One*. 2009. Vol. 4. N 4. e5089.
5. Font-Burgada J., Rossell D., Auer H., Azorin F. *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and relative-of-WOC to regulate gene expression // *Gene Dev*. 2008. Vol. 22. N 21. P. 3007–3023.
6. Mohn F., Sienski G., Handler D., Brennecke J. The rhino-deadlock-cutoff complex licenses noncanonical transcription of dual-strand piRNA clusters in *Drosophila* // *Cell*. 2014. Vol. 157. N 6. P. 1364–1379.
7. Eissenberg J., Hartnett T. A heat shock-activated cDNA rescues the recessive lethality of mutations in the heterochromatin-associated protein HP1 of *Drosophila melanogaster* // *Mol. Gen. Genet*. 1993. Vol. 240. N 3. P. 333–338.
8. Volpe A.M., Horowitz H., Grafer C.M., Jackson S.M., Berg C.A. *Drosophila rhino* encodes a female-specific chromo-domain protein that affects chromosome structure and egg polarity // *Genetics*. 2001. Vol. 159. N 3. P. 1117–1134.
9. Cabrera J.R., Olcese U., Horabin J.I. A balancing act: heterochromatin protein 1a and the Polycomb group coordinate their levels to silence chromatin in *Drosophila* // *Epigenet. Chromatin*. 2015. Vol. 8:17.
10. Alekseyenko A.A., Gorchakov A.A., Zee B.M., Fuchs S.M., Kharchenko P.V., Kuroda M.I. Heterochromatin-associated interactions of *Drosophila* HP1a with dADD1, HIPPI, and repetitive RNAs // *Genes Dev*. 2014. Vol. 28. N 13. P. 1445–1460.
11. Lippman Z., Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing // *Nature*. 2004. Vol. 431. N 7006. P. 364–370.
12. Greil F., van der Kraan I., Delrow J., Smothers J.F., de Wit E., Bussemaker H.J., van Driel R., Henikoff S., van Steensel B. Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location // *Genes Dev*. 2003. Vol. 17. N 22. P. 2825–2838.
13. Perrini B., Piacentini L., Fanti L., Altieri F., Chichirelli S., Berloco M., Turano C., Ferraro A., Pimpinelli S. HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila* // *Mol. Cell*. 2004. Vol. 15. N 3. P. 467–476.
14. Minervini C.F., Marsano R.M., Casieri P., Fanti L., Caizzi R., Pimpinelli S., Rocchi M., Viggiano L. Heterochromatin protein 1 interacts with 5'UTR of transposable element ZAM in a sequence-specific fashion // *Gene*. 2007. Vol. 393. N 1–2. P. 1–10.
15. Nefedova L.N., Mannanova M.M., Kim A.I. Integration specificity of Itr-retrotransposons and retroviruses in the *Drosophila melanogaster* genome // *Virus Genes*. 2011. Vol. 42. N 2. P. 297–306.
16. Baldrich E., Dimitri P., Desset S., Leblanc P., Codipietro D., Vaury C. Genomic distribution of the retrovirus-like element ZAM in *Drosophila* // *Evolution and impact of transposable elements. Contemporary issues in genetics and evolution*, vol 6 / Ed. P. Capy. Dordrecht: Springer, 1997. P. 131–140.
17. Kuz'min I.V., Shnyriaeva A.A., Nefedova L.N., Kim A.I. Translational analysis of the *Grp* gene, a genomic homologue of the *Gag* gene of the gypsy retrotransposon of *Drosophila melanogaster* // *Russ. J. Genet*. 2011. Vol. 47. N 9. P. 1275–1277.
18. Lippman Z., Gendrel A.V., Black M., Vaughn M.W., Dedhia N., McCombie W.R., Lavine K., Mittal V., May B., Kasschau K.D., Carrington J.C., Doerge R.W., Colot V., Martienssen R. Role of transposable elements in heterochromatin

and epigenetic control // *Nature*. 2004. Vol. 430. N 6998. P. 471–476.

19. Tao Zhao, Heyduk T., Allis C.D., Eissenberg J.C. Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA *in vitro* // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. N 36. P. 28332–28338.

20. Nefedova L.N., Urusov F.A., Romanova N.I., Shmel'kova A.O., Kim A.I. Study of the transcriptional and

transpositional activities of the *Tirant retrotransposon* in *Drosophila melanogaster* strains mutant for the *flamenco* locus // *Russ. J. Genet.* 2012. Vol. 48. N 11. P. 1089–1096.

Поступила в редакцию
02.02.2018

Принята к печати
19.03.2018

GENETICS

THE STUDY OF INTERACTION OF THE HP1 FAMILY PROTEINS WITH THE UNTRANSLATED REGULATORY REGIONS OF THE *GYPSY* RETROTRANSPOSONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A.R. Lavrenov, L.N. Nefedova, A.I. Kim*

Department of Genetics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: aikim57@mail.ru

We have investigated the *in vitro* interaction of recombinant HP1 family protein paralogs (HP1a, HP1b and HP1c) and the 5' untranslated regulatory regions of *gypsy* retrotransposon group in *Drosophila melanogaster*: *gypsy*, *Springer*, *Tirant*, *ZAM*, *Rover* and *17.6*. With the use of competitive DNA, conditions for specific binding were obtained. It is shown that HP1 family proteins effectively bind to the 5' untranslated region of retrotransposons, which have tandem repeats in their composition. It has been found that repeats are absolutely necessary for binding HP1a protein to the 5' untranslated region of *Tirant* and *ZAM* mobile genetic elements. The absence of repeats in the case of *ZAM* element or their number less than two—in the case of *Tirant* makes such interaction impossible. Thus, the presence of tandem repeats in the 5' untranslated region of retrotransposons of the *gypsy* group is an important tool for regulating their transposition by heterochromatin proteins.

Keywords: heterochromatin proteins, *Drosophila*, *gypsy*, mobile elements, retrotransposons, untranslated regions

Сведения об авторах

Лавренов Антон Русланович — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-53; e-mail: overtaki@mail.ru

Нефедова Лидия Николаевна — докт. биол. наук, доц. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-53; e-mail: lidia_nefedova@mail.ru

Ким Александр Иннокентьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-53; e-mail: aikim57@mail.ru