

На правах рукописи

**ЮРЛОВА
АННА АЛЕКСАНДРОВНА**

**Структурные домены белка SUUR,
контролирующего позднюю репликацию
политенных хромосом *Drosophila melanogaster***

Молекулярная генетика – 03.01.07

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2010

Работа выполнена в лаборатории молекулярной цитогенетики Учреждения Российской академии наук Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск и в группе геномики Учреждения Российской академии наук Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Научный руководитель: академик РАН, доктор биологических наук профессор Жимулёв Игорь Федорович
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Омельянчук Леонид Владимирович
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

кандидат биологических наук
Елисафенко Евгений Анатольевич
Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

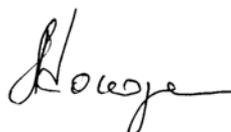
Ведущее учреждение: Институт Биологии Гена РАН, г. Москва

Защита состоится «_3_» декабря_ 2010 г._ на утреннем заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Д-003.045.02) в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8. e-mail: kokoza@mcb.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан «__» _октября_ 2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук



Е.Б. Кокоза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Время репликации ДНК в S-фазе клеточного цикла обычно коррелирует с транскрипционной активностью генов из соответствующих районов (Hagele, 1973; Schubeler et al., 2002; MacAlpine et al., 2004; Donaldson, 2005). Как правило, поздняя репликация наблюдается в транскрипционно неактивных районах хромосом, в большинстве случаев представленных прицентромерным гетерохроматином (ПГХ), которые находятся в конденсированном состоянии в интерфазных хромосомах. К поздно реплицирующимся районам относятся также и протяженные участки эухроматина (ЭХ) размером около 200-1000 т.п.н. (White et al., 2004).

У *D. melanogaster* процесс поздней репликации удобно изучать на политенных хромосомах слюнных желез, образующихся во время модифицированного клеточного цикла – эндоцикла. При эндорепликации отсутствует митоз, и G-фаза следующего цикла начинается до того, как успеет завершиться S-фаза предыдущего, поэтому многие поздно реплицирующиеся последовательности не успевают завершить репликацию к концу каждого эндоцикла и остаются недореплицированными (Gall et al., 1971; Smith and Orr-Weaver, 1991; Lilly and Spradling, 1996). Кроме районов прицентромерного гетерохроматина, есть еще около 240 районов, разбросанных по эухроматиновым плечам хромосом, в которых наблюдается поздняя репликация и часто недорепликация. Эти районы характеризуются не только поздней репликацией, но и некоторыми другими признаками, свойственными гетерохроматину, – это компактное состояние и низкий уровень транскрипции (Zhimulev et al., 2003b). Для таких районов введен термин интеркалярный гетерохроматин (ИГХ).

Недорепликация в большой степени определяется продуктом гена *SuUR* (*Suppressor of Underreplication*), который кодирует белок, специфически связывающийся с районами ПГХ и ИГХ на политенных хромосомах слюнных желез личинок конца третьего возраста (Makunin et al., 2002; Zhimulev et al., 2003b). У мутантов по гену *SuUR* (линия *SuUR^{ES}*) изменяется время репликации ДНК в поздно реплицирующихся районах – она заканчивается раньше, чем у мух дикого типа, поэтому уровень политенизации в районах ИГХ становится таким же, как и в ЭХ районах. Кроме того, происходит увеличение уровня политенизации многих последовательностей из района ПГХ, что сопровождается появлением дополнительного структурированного материала в районе хромоцентра (Belyaeva et al., 1998). В свою очередь увеличение доз гена *SuUR* приводит к увеличению уровня недорепликации в районах ИГХ (Zhimulev et al., 2003a; Belyakin et al., 2005).

Поскольку *SuUR* на сегодняшний день является единственным известным геном, способным оказывать влияние на время репликации и недорепликацию в ПГХ и ИГХ политенных хромосом слюнных желез *D. melanogaster*, было бы интересно понять, в каких еще клетках он работает, у каких видов присутствует и насколько консервативен. Еще один вопрос,

требующий ответа, – это механизм действия гена *SuUR*; отправной точкой в этом вопросе может служить изучение контроля экспрессии гена.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы было изучение влияния белка SUUR и его мутантных форм на процесс репликации ДНК, поиск функционально-значимых районов в белке. Для достижения этих целей были сформулированы следующие задачи:

- Провести детальный молекулярный анализ мутации *SuUR^{ES}*
- Провести эволюционный анализ гена *SuUR*
- Установить связь ортологов SUUR с процессом недорепликации ДНК
- Выявить консервативные районы в белке, получить точечные мутации в них, проверить влияние полученных мутаций на свойства белка.
- Исследовать влияние SUUR на процессы репликации ДНК в фолликулярных клетках ооцитов.

Научная новизна. В настоящей работе установлено, что в мутантной линии *SuUR^{ES}* присутствует два фрагмента РНК *SuUR*: один до места встройки транспозона, другой - после него. Впервые выявлено, что эктопическая экспрессия SUUR в фолликулярных клетках приводит к стерильности самок, причиной которой является подавление амплификации хорионовых генов. Эволюционный анализ гена *SuUR* у насекомых показал, что он выявляется только у двукрылых, а белок SUUR принадлежит к группе быстро эволюционирующих белков. Впервые показано, что uORF (upstream Open Reading Frame) *SuUR*, находящаяся в 5'UTR гена, является более консервативной по сравнению с ORF основного белка SUUR. На основании эволюционного анализа белка SUUR 11 видов рода *Drosophila* в нем определены консервативные участки, получены точечные направленные мутации в двух консервативных районах, на N- и C- конце белка, проведен анализ их влияния на функцию SUUR.

Положения, выносимые на защиту. На защиту выдвигаются представления о белке SUUR как быстро эволюционирующем, но сохраняющем высокую консервативность в N- и C-концевых участках, а также в uORF, обнаруженной в 5'UTR гена. Функциональная значимость консервативных районов подтверждается с помощью направленных мутаций в N-концевом домене, которые приводят к ослаблению эффектов белка SUUR на процесс репликации и структуру хромосом.

Практическая ценность. Показано, что продукт гена *SuUR* может влиять на процессы репликации ДНК не только в слюнной железе, но и в фолликулярных клетках яичников. Проведенный анализ белка SUUR позволил выявить эволюционную консервативность его структурно-функциональных доменов. Данные о структуре продукта гена *SuUR* будут использованы для дальнейшего получения функционально значимых мутаций. Выявление высоко консервативной uORF в 5'UTR *SuUR* служит базой для изучения механизмов контроля трансляции гена.

Апробация работы. Результаты работы были представлены в виде постеров на: 45-ой международной конференции по исследованию

дрозофилы (Вашингтон, США, 2004); конференции ЕМБО/ФЕБС по структуре и динамике ядра (Ля Гранд Мот, Франция, 2005); на VIII европейском симпозиуме по изучению белков (Цюрих, Швейцария, 2009); конференции «Контроль экспрессии генов и рак» (Москва, Россия 2010), а также в виде докладов на: 3-й международной конференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома» (Новосибирск, Россия, 2002); международной конференции «Хромосома 2009» (Новосибирск, Россия, 2009).

Вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Работа по окраске политенных хромосом выполнена совместно с Т.Д. Колесниковой, клонирование и секвенирование гена *SuUR* у *D. erecta* проведено совместно с И.В. Макуниным. Анализ разломов на политенных хромосомах слюнных желез проводили совместно с Е.С. Беляевой.

Объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, а также выводов и списка цитируемой литературы, в которые входит 161 ссылка. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц, 22 рисунка и приложение на 5 страницах.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 статей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии мух. Используемые в работе линии мух описаны в справочнике Lindsley, Zimm, 1992, в базе данных FlyBase (flybase.bio.indiana.edu/), а также в статьях Belyaeva et al., 1998; Makunin et al., 2002; Yurlova et al., 2009.

Работа с нуклеиновыми кислотами. Все эксперименты, связанные с выделением и анализом нуклеиновых кислот, проводили с использованием методов описанных в руководстве (Sambrook and Russell, 2001) или в соответствии с рекомендациями фирм-производителей Qiagen, Promega и др.

Работа с бактериями и плазмидами. Работу с бактериями и плазмидами проводили по стандартным протоколам, описанным в сборниках (Маниатис и др., 1984; Мазин и др., 1990), с небольшими модификациями. Конструкции, содержащие точечные замены, были получены ПЦР-опосредованным мутагенезом (Intine and Nazar, 1998).

Работа с белками. При иммуноокрашивании политенных хромосом следовали рекомендациям, изложенным в статье Pile and Wassarman (2002), при Вестерн-блот гибридизации – рекомендациям фирмы Amersham.

Компьютерный анализ данных. Для выявления экзон-интронной структуры использовали BLAT. При анализе белков использовали программы: ClustalW, K-Estimator, SAPS, MotifScan, Predict Protein.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика мутации *SuUR^{ES}*

Открытие у *D. melanogaster* Е.С. Беляевой в 1998 мутации *SuUR^{ES}* дало широкие возможности для изучения структуры и состава

гетерохроматиновых районов, поскольку в мутантной линии районы ИГХ практически полностью политенизируются, а район хромосомы становится более структурированным. Мутация $SuUR^{ES}$ не вызывает летальности, она возникла в результате инсерции ретротранспозона *diver* (размером около 6 т.п.н.) в 4 экзон гена (Kolesnikova et al., 2006). При проведении Нозерн-блот гибридизации в линии $SuUR^{ES}$ продукт гена $SuUR$ не выявляется (Makunin et al., 2002). Для проверки этих данных мы применили более чувствительный метод ОТ-ПЦР, для которого была использована РНК, выделенная из яичников линии *w; ru h SuUR^{ES}*. Было показано наличие кДНК-ового продукта до встройки транспозона, сплайсированного как и нормальная кДНК $SuUR$, а также присутствие кДНК $SuUR$ после встройки транспозона. С использованием различных комбинаций праймеров из транспозона и из гена было показано, что как с 5'-, так и с 3'-конца гена образуется гибридная кДНК, состоящая из гена и транспозона. Через 100-200 п.н. от начала встройки кДНК обрывается, кДНК, которая образуется с 3'-конца, начинается во встройке и идет дальше в ген. Таким образом, в линии $SuUR^{ES}$ присутствуют 2 фрагмента мРНК $SuUR$, перекрывающие всю мРНК этого гена. Можно предположить, что продукт после встройки ретротранспозона нарабатывается с LTR промотора ретротранспозона. У *D. melanogaster* количество ретротранспозонов в эухроматиновой части генома намного меньше, чем в известных геномах млекопитающих, но при этом у нее наблюдается большое разнообразие мобильных элементов, среди которых LTR ретротранспозоны являются наиболее представленной группой (Kaminker et al., 2002). Более того, в геноме дрозофилы значительная часть мобильных элементов транскрибируется (Deloger et al., 2009). К сожалению, на вопрос, образуется ли с этой РНК белковый продукт, имеющиеся у нас в наличии антитела не позволяют ответить.

2. Обнаружение гена $SuUR$ у других видов, его эволюционная характеристика

Ранее проведенный поиск по базам данных не выявил гомологов гена $SuUR$ у других организмов (Makunin et al., 2002). При *in situ* гибридизации фрагмента кДНК $SuUR$ на политенные хромосомы и при Саузерн-блот гибридизации геномной ДНК разных видов дрозофилы с кДНК гена $SuUR$ сигнал был выявлен только у видов подгруппы *melanogaster*, наиболее отдаленным из которых был *D. erecta* (Рис. 1А). Мы амплифицировали и определили последовательность геномной ДНК и кДНК $SuUR$ для *D. erecta*, что позволило установить экзон-интронную структуру. Сайты сплайсинга оказались консервативны между *D. melanogaster* и *D. erecta*. Также мы использовали предсказанные последовательности для гена $SuUR$ тех видов, чьи геномы доступны на сайте UCSC Genome Browser: *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. mojavensis*, *D. virilis* и *D. grimshawi* (Рис. 1А). Во время работы мы столкнулись с тем, что структура гена $SuUR$ для пяти видов дрозофилы из

девяти отличается в предсказаниях, выполненных разными программами. Для этих видов мы наработали кДНК *SuUR* и определили экзон-интронную структуру или использовали аннотацию близкородственных видов.

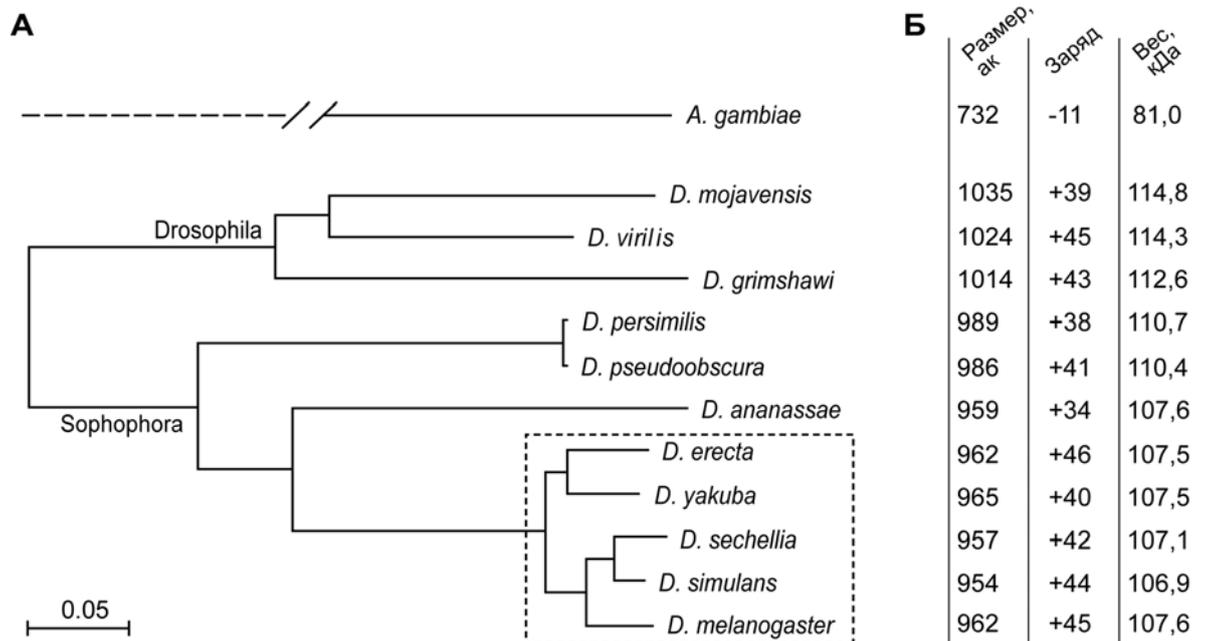


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа белка SUUR (А), и основные свойства белка у каждого вида (Б). Пунктирным квадратом выделены виды подгруппы *melanogaster*.

У других видов ген *SuUR* не аннотирован. Однако поиск по BLAST выявил слабое сходство белка SUUR с белком ENSANGP00000027713.1 комара *A. gambiae* (мРНК AGAP005819, координаты chr2L:21,832,968-21,835,239, AgamP3 genome assembly). Но гомология очень слабая, около 25% (E-value $7e^{-6}$), и ограничивается N-концевой частью (ак 51-276), остальная часть белка сильно изменена, что делает сравнение полноразмерных белков невозможным. При этом белок комара короче, чем белок SUUR дрозофилы, в его средней части отсутствуют заряженные кластеры, а суммарный заряд -11, тогда как у разных видов дрозофилы около +40; в 5'UTR гена, кодирующего белок ENSANGP00000027713.1, не обнаружено uORF. Одним из аргументов в пользу того, что белок ENSANGP00000027713 у *A. gambiae* – это сильно мутировавший гомолог SUUR, является то, что у *D. melanogaster* за 3'-концом гена *SuUR* находится ген *CG6310*, аналогично у комара за 3'-концом ENSANGP00000027713 находится ген ENSANGT00000010378.2 (координаты: chr2L:21,835,318-21,836,802 AgamP3 genome assembly), гомолог *CG6310*. В свою очередь, поиск по BLAST комариного белка против транслированных ДНК-последовательностей (tBLASTp) выявил с высоким уровнем достоверности (E value e^{-25} and e^{-22}) гомологов у комара желтой лихорадки (*Aedes aegypti*) и южного домашнего комара (*Culex quinquefasciatus*). У других насекомых, не относящихся к двукрылым, чьи геномы секвенированы, ортолога SUUR найдено не было. Поиск по BLAST белка SUUR некоторых видов *Drosophila*

и Anopheles выявил также белок млекопитающих ERCC6, который нужен при восстановлении парных разрывов во время транскрипции (Troelstra et al., 1992). Мутации в ERCC6 приводят к синдрому Коккэйна, проявляющемся в атрофии зрительных нервов, глухоте и умственной отсталости (Mallery et al., 1998; Laugel et al., 2008).

3. Эволюционная характеристика консервативной uORF

При сравнении геномной ДНК *SuUR D. melanogaster* с геномной ДНК других видов *Drosophila* оказалось, что 5'UTR гена, где предположительно находится uORF, высококонсервативна. Характер замен в этой области соответствует расположению замен в кодирующей части – трехбуквенные делеции и инсерции, замены нуклеотидов по третьей позиции. У разных видов длина предсказанного белка из 5' UTR гена *SuUR* варьирует от 62 ак у *D. mojavensis* до 72 ак у *D. erecta* (у *D. melanogaster* 68 ак), у всех у них также есть 3 или 4 вложенные более короткие uORF. Для многих организмов (млекопитающие, растения, дрожжи) показана регуляция трансляции с основной рамки считывания за счет uORF. Для *D. melanogaster* на основании сравнительного анализа геномов 12 видов дрозофилы предсказано лишь 44 гена с консервативными uORF (Hayden and Bosco, 2008).

Для всех 11 видов дрозофилы было проведено попарное выравнивание самого длинного белка из uORF и подсчет числа идентичных аминокислот в нем. Для *D. melanogaster*, *D. simulans* и *D. yakuba* идентичность составляет 100%, это особенно интересно на фоне того, что сам белок SUUR не является консервативным. Если степень идентичности между видами *D. melanogaster* и *D. ananassae* для белка SUUR составляет 66,2%, то для uORF эта идентичность 76,5%. Размер межцистронного пространства варьирует у разных видов, от 6 п.н. у *D. erecta* до 56 п.н. у *D. virilis*, для *D. melanogaster*, *D. simulans* и *D. yakuba* оно составляет 20 п.н. Длина uORF и межцистронное пространство являются основными параметрами, от которых зависит эффективность реинициации на основной ORF. У гена *SuUR* эти величины являются средними. Предположительно, контроль уровня экспрессии белка SUUR при помощи uORF может объяснить то, что этот белок присутствует в организме дрозофилы в небольшом количестве.

4. Выявление белка SUUR у других видов дрозофилы

У большинства видов *Drosophila* на давленных препаратах политенных хромосом слюнных желез присутствуют разломы и слабые точки (Zhimulev, 1998). Это может указывать на то, что в этих районах существует недорепликация и на возможную роль гена *SuUR* в осуществлении этого процесса. Вестерн-блот анализом было показано наличие белка SUUR у 1-24 часовых эмбрионов эволюционно близкого к *D. melanogaster* вида *D. simulans* и отдаленного вида *D. ananassae*. В качестве контроля использовали линию heat shock SUUR (*H7-X*; *H7-3*), в которой наблюдается мажорный сайт около 130 кДа. Необходимо отметить, что кроме мажорного сайта на

вестерне присутствуют дополнительные слабые сигналы меньшего размера, которые, скорее всего, являются деградированными формами белка. Согласно ранее полученным данным (Makunin et al., 2002), в С-части белка находятся последовательности, обеспечивающие нестабильность белка.

Локализовать белок SUUR на политенных хромосомах слюнных желез личинок третьего возраста нескольких представителей рода *Drosophila* методом иммуноокрашивания нам не удалось, несмотря на то, что для этого были получены и использованы антитела на наиболее консервативную N-концевую часть (ак 1-197) белка (Рис. 3). Отсутствие белка SUUR на хромосомах других видов представляется достаточно странным, поскольку у *D. melanogaster* разломы в районах ИГХ связаны именно с недорепликацией ДНК в этих районах, вызванной наличием там белка SUUR (Belyaeva et al., 1998; Makunin et al., 2002; Zhimulev et al., 2000). Можно предположить, что связывание белка с политенными хромосомами слюнных желез других видов менее стабильно, т.к. в ядрах фолликулярных клеток в области хромоцентра SUUR выявляется на давленных препаратах как из яичников *D. melanogaster*, так и *D. simulans*, в то время как в мутантной линии *SuUR^{ES}* сигнала не наблюдается (Рис. 2).

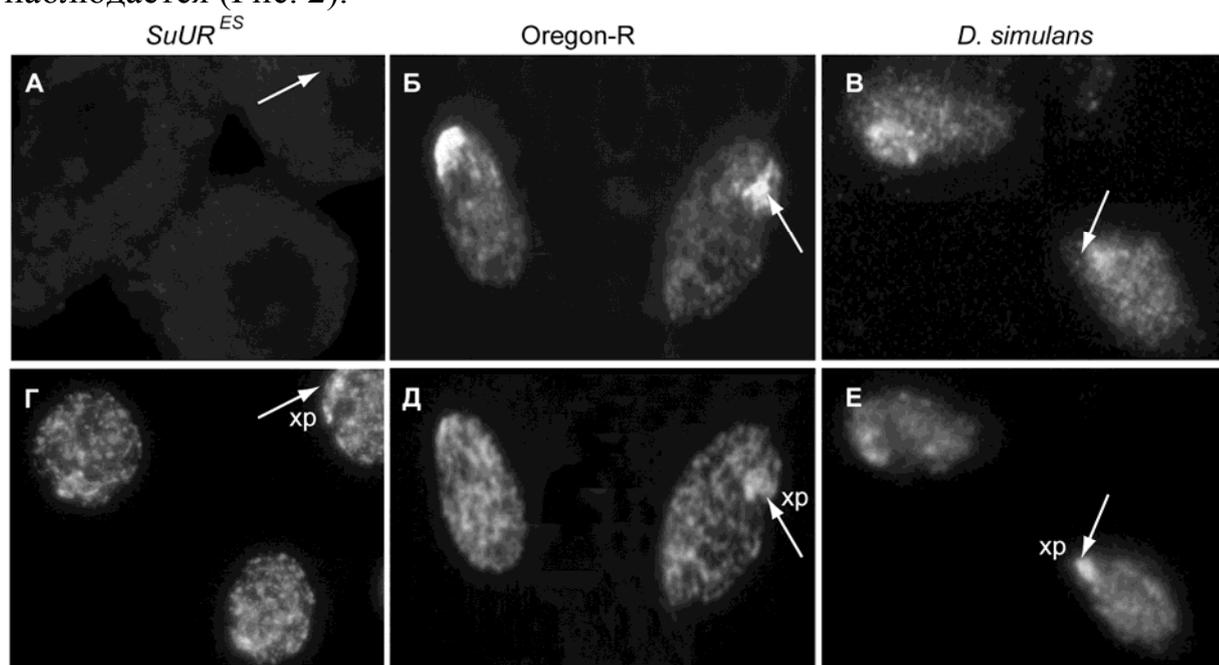


Рисунок 2. Иммунодетекция белка SUUR в фолликулярных клетках овариов. А, Г – *SuUR^{ES}*; Б, Д - *D. melanogaster* (Oregon-R); В, Е - *D. simulans*; А, Б, В – иммуноокрашивание антителами E45 к белку SUUR; Г, Д, Е – окраска Хёкстом. В линии с мутацией *SuUR^{ES}* белок в фолликулярных клетках овариов не выявляется. Стрелкой обозначен хромоцентр (хр).

Для подтверждения влияния SUUR на недорепликацию ДНК у *D. simulans*, самки линии *ABI-GAL4>UAS-SuUR₁₋₄₈₅*, которая гомозиготна по драйверу, активному в слюнных железах с раннего развития, и по трансгену, экспрессирующему N-концевой фрагмент *SUUR₁₋₄₈₅*, были скрещены с самцами *D. simulans*. Этот фрагмент (*SUUR₁₋₄₈₅*) обладает доминантно-

негативным эффектом при экспрессии в слюнных железах с раннего развития (под драйвером *ABI*) на фоне нормального *SUUR*, что проявляется в возникновении фенотипа *SuUR^{ES}*, а именно полного исчезновения разломов на хромосомах (Kolesnikova et al., 2005). Его экспрессия под драйвером *ABI-GAL4* у гибридов *D. melanogaster* х *D. simulans* приводит также к исчезновению разломов на обоих гомологах. Это является свидетельством того, что разломы у этих двух видов появляются вследствие одинакового механизма, в котором задействован белок *SUUR*.

5. Эволюционный анализ белка *SUUR* у дрозофилы, скорость замен в белке

С целью выявления консервативных районов в белке было проведено сравнение ортологов *SUUR* 11 видов *Drosophila*, которое выявило большое количество аминокислотных замен, делеций и инсерций даже у эволюционно близких видов. Чтобы узнать скорость замен в гене *SuUR*, было посчитано количество синонимичных (K_s) и несинонимичных замен (K_a) на сайт (кодон) для видов подгруппы *melanogaster* при использовании пакета программ *K-Estimator* (Comeron, 1999). Из анализа были исключены отдаленные виды из-за неоднозначности в выравнивании, особенно в средней части белка. Количество несинонимичных замен на сайт в гене *SuUR* между *D. melanogaster* и *D. yakuba* составляет 0.052, что очень близко к тому значению K_a , которое характеризует быстро эволюционирующие гены (Schmid and Tautz, 1997). Соотношение количества синонимичных и несинонимичных замен (K_a/K_s) в белке *SUUR* варьирует от 0,16 до 0,23 внутри подгруппы *melanogaster*. Значение K_a/K_s для ортологов *D. melanogaster* и *D. simulans* равно 0,16 позволяет предположить, что около половины из 1850 дрозофила-специфических белков эволюционируют под большим давлением отбора, чем *SUUR* (Zhang et al., 2007). В этой же работе показано, что дрозофила-специфические белки подвержены меньшему давлению отбора, по сравнению с белками, у которых есть ортологи в отдаленных видах.

Необходимо отметить, что, несмотря на столь высокую скорость замен, размер и заряд белка *SUUR* сохраняются практически неизменными в ходе эволюции (Рис. 1). Предсказание вторичной структуры белка, сделанное программой *Protein Prediction* для двух наиболее эволюционно отдаленных видов *D. melanogaster* и *D. grimshawi*, очень сходно. Филогенетическое дерево, построенное для белка *SUUR* в общем соответствует дереву, полученному на основании анализа всего генома (Stark et al., 2007): *D. yakuba* и *D. erecta* группируются вместе, а ветка с *D. pseudoobscura* короче (Рис. 1).

Сами замены в белке распределены неравномерно (Рис. 3А). Наиболее консервативным является N-конец *SUUR*, он содержит минимальное количество замен, в нем отсутствуют делеции и инсерции даже у отдаленных видов дрозофилы. Средняя часть белка *SUUR*: (у *D. melanogaster* она представлена ак 280-581), в которой находятся отрицательно и положительно

заряженные кластеры (Рис. 3), является наименее консервативной. У двух эволюционно отдаленных видов *D. mojavensis* и *D. virilis*, кроме замен в этом районе появились большие инсерции. Важно отметить, что, несмотря на столь высокий уровень замен в первичной структуре этого района, касающихся, в том числе, и заряженных аминокислот, большая часть которых не является консервативными сама по себе, отрицательно и положительно заряженные кластеры у всех проанализированных видов дрозофилы сохраняются. Возможно, это связано с тем, что именно заряд, а не аминокислотная последовательность в этом районе важны для функционирования белка.

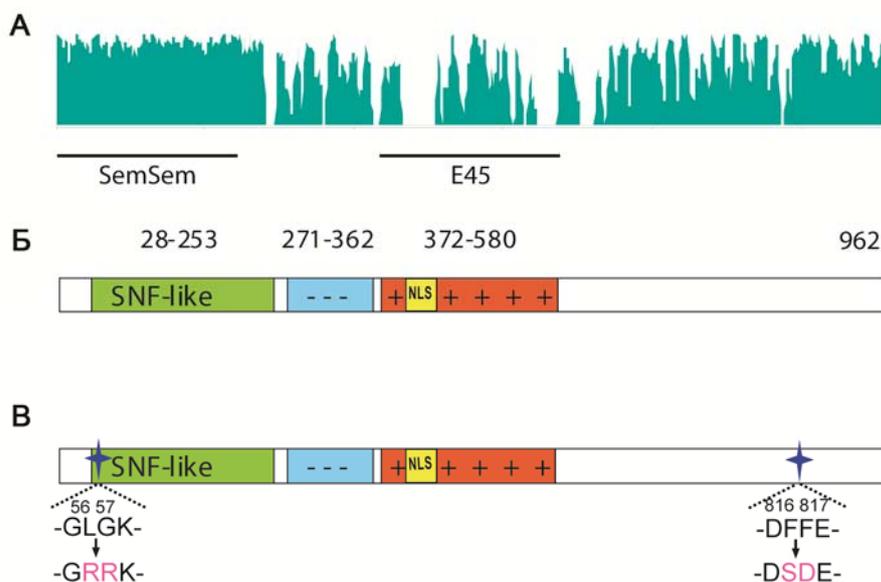


Рисунок 3. Эволюционно консервативные домены белка SUUR. А – профиль консервативности, основанный на анализе последовательности белка SUUR 11 видов дрозофилы; прямой линией отмечены фрагменты, против которых были получены поликлональные антитела E45 и SemSem. Б – доменная организация белка, «SNF-like» - район с гомологией к АТФ-азному домену, «- -» – отрицательно заряженный кластер, «+ +» – положительно заряженный кластер, NLS – сигналы ядерной локализации. В – положение точечных мутаций в N- и С-концах белка; на рисунке отмечены аминокислоты, которые были заменены.

А. В. Пиндюрин с соавторами показали, что в дрожжевой двугибридной системе фрагмент белка SUUR (ак 339-671), большей частью перекрывающийся с заряженным районом, способен взаимодействовать с другим гетерохроматиновым белком HP1 (Рис. 7 Д) (Pindyurin et al., 2008). Оказалось, что этот район очень быстро эволюционирует. Даже предположительная последовательность, которая имеет гомологию к пентануклеотиду, отвечающему за связывание с HP1 (LRVSL, ак 429-433), остается неизменной только у двух видов дрозофилы - *D. yakuba* и *D. erecta*, у остальных она сильно изменена. Поиск в SUUR известных белковых мотивов, проведенный с использованием программ PredictProtein и MotifScan, выявил в средней части белка сигналы ядерной локализации I или

II типа для всех видов кроме *D. mojavensis*. Также в средней части белка для 5 видов от *D. melanogaster* до *D. ananassae* был предсказан АТ-hook мотив.

В С-концевой части белка не было обнаружено известных мотивов, хотя она и является более консервативной, чем средняя часть.

6. Получение точечных мутаций в консервативных районах белка SUUR

На основании результатов множественного выравнивания SUUR были получены точечные замены консервативных аминокислот в двух районах белка SUUR *D. melanogaster*. В наиболее консервативной N-концевой части я заменила L57 на R57 и G58 на R58, получив белок, в дальнейшем упоминаемый как SUUR_{Nmut} (Рис. 3 В). Эти две аминокислоты находятся внутри района с гомологией к мотиву Walker A белков группы SWI2/SNF2. Мотивы Walker A и B образуют АТФ-связывающий карман, поэтому они высоко консервативны. Несмотря на то, что на сегодняшний день нет экспериментальных данных, показывающих, что SUUR может связывать АТФ, было показано, что эктопическая экспрессия N-концевых фрагментов SUUR способна вызывать доминантно-негативный эффект и удалять эндогенный белок с политемных хромосом слюнных желез (Kolesnikova et al., 2005). Это дает возможность предположить, что в N-конце SUUR может быть заложена структурная или каталитическая функция.

Ранее было показано, что при эктопической экспрессии укороченного фрагмента белка - SUUR₁₋₇₇₉ не происходит подавления эндорепликации и возникновения недорепликации в слюнных железах (Kolesnikova et al., 2005); скорее всего это связано с тем, что тот домен белка, который приводит к возникновению недорепликации, находится за пределами фрагмента SUUR₁₋₇₇₉. Был выбран один из консервативных участков в С-конце белка, в нем заменили две ароматических ак F816 и F817 на маленькие ак S816 и D817, получив, таким образом, SUUR_{Cmut}.

Конструкции, содержащие мутированную кДНК *SuUR* в векторе для рUAST, были секвенированы и трансформированы в эмбрионов линии *u w* вместе с источником транспозазы рл 25.7 *ws* (так же, как это было ранее сделано для немутированной кДНК *SuUR*). Несколько независимых трансгенных линий были получены для каждой конструкции.

7. Белок SUUR подавляет амплификацию кластера хорионов генов в фолликулярных клетках

Большое количество работ, посвященных белку SUUR, было проведено с использованием системы эктопической экспрессии *UAS-GAL4* (Brand and Perrimon, 1993). Например, было показано, что белок SUUR подавляет политемизацию в районах прицентромерного и интеркалярного гетерохроматина политемных хромосом слюнных желез *D. melanogaster*, приводя к недорепликации и разломам в этих районах. По-видимому, уменьшение размера слюнных желез при эктопической экспрессии в них SUUR с ранних стадий эмбриогенеза также вызвано влиянием белка на

репликацию во время эндоцикла. Также было выявлено, что эктопическая экспрессия *SUUR* в фолликулярных клетках яичников приводит к стерильности самок, что может быть вызвано нарушением амплификации хорионовых генов.

Для экспрессии *UAS-SuUR* в фолликулярных клетках был использован драйвер *c323-GAL4*, экспрессирующий *GAL4* активатор с 6 стадии развития овария до того, как начинается амплификация хорионовых генов (Manseau et al., 1997). Большая часть мух *c323-GAL4>UAS-SuUR* погибала на стадии личинки, а выжившие взрослые самки были стерильны. Некоторые из них откладывали редкие яйца с сильно разрушенной хорионовой оболочкой или без нее. В работах Спрадлинга с соавторами (Lilly and Spradling, 1996) было показано, что отсутствие хорионовой оболочки на яйце может быть вызван нарушением амплификации хорионовых генов. Одна из линий, содержащих *UAS-SuUR* инсерцию, - F9-F9-2 демонстрировала максимальное количество выживших самок при скрещивании с драйверной линией *c323-GAL4*, она и была использована при проведении последующих экспериментов по выявлению причины стерильности.

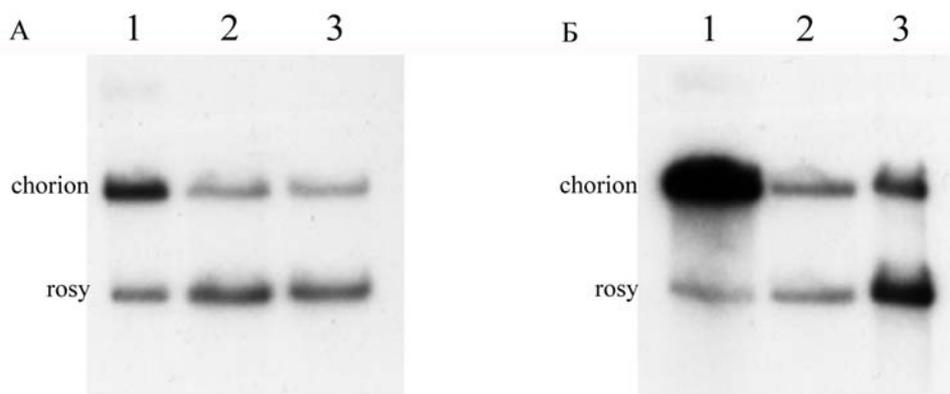


Рисунок 4. Эктопическая экспрессия *UAS-SuUR* в фолликулярных клетках подавляет амплификацию хорионовых генов. Количественная Саузерн-блот гибридизация. А - геномная ДНК, выделенная из фолликулярных клеток яйцевых камер на стадии 10В линии Oregon R (1), *c323-GAL4 >UAS-SuUR* (2) и имагинальных дисков линии Oregon R (3), была гибридизована с фрагментом хорионного гена *Cr 15* (chorion). Б - результаты аналогичной гибридизации с фолликулярными клетками со стадий 11-14.

Для оценки влияния эктопической экспрессии *SUUR* в фолликулярных клетках на амплификацию хорионовых генов методом количественной Саузерн-блот гибридизации было проведено измерение уровня амплификации ДНК в районе хорионного локуса на 3 хромосоме (66D) в фолликулярных клетках самок. Измерения проводились на двух стадиях: 10В и 11-14. В качестве зондов были использованы: фрагмент из района хорионного локуса 66D, в котором хорионовые гены амплифицируются в 60-80 раз (Calvi et al. 1998), и ген *rosy* (87D9), который не подвергается амплификации. Нормировка проводилась по диплоидным клеткам имагинальных дисков (Рис. 4). Было показано, что на стадии 10В в линии

Oregon-R уровень амплификации ДНК хорионовых генов (*chorion*) в 9 раз выше, чем у гена *rosy*, не подвергающегося амплификации, в то время как для самок *c323-GAL4>UAS-SuUR* это значение равно 1,1. На стадиях 11-14 уровень амплификации хорионовых генов составлял 26 для линии Oregon-R и 3 для мух *c323-GAL4>UAS-SuUR*. Итак, эктопическая экспрессия SUUR в фолликулярных клетках подавляет амплификацию хорионовых генов уже на стадии 10B, в то время, когда у мух дикого типа в хорионовом локусе на хромосоме 3 она только начинается, но не ингибирует ее полностью, так как в яйцевых камерах *C323-GAL4>UAS-SuUR* уровень амплификации хорионовых генов увеличивается от 1,1 на стадии 10B до 3 на стадиях 11-14.

8. Влияние замен в белке SUUR на эндорепликацию и амплификацию хорионовых генов

Как было сказано выше, для каждой конструкции было синтезировано несколько независимых линий. Для конструкции *UAS-SuUR_{Nmut}* было получено более 10 линий, содержащих встройки во 2-ю, в 3-ю и в X-хромосому. Мы выбрали три линии, содержащие встройку во 2-ю хромосому и ввели мутацию *SuUR^{ES}* в 3-ю хромосому. Для конструкции *UAS-SuUR_{Cmut}* было получено 3 независимые линии, две из них содержали встройку во 2-ю хромосому и одна в 3-ю. Эффекты введенных точечных мутаций в белок SUUR были протестированы в системе эктопической экспрессии *UAS-GAL4* по тому же принципу, что и сам SUUR.

Постоянная сильная экспрессия белка SUUR с ранних стадий развития в слюнных железах под контролем драйвера *ABI-GAL4* приводит к супрессии эндорепликации и маленькой слюнной железе (Volkova et al., 2003). Экспрессия *SUUR_{Nmut}* под контролем *ABI-GAL4* вызывает лишь частичное подавление недорепликации: у личинок *ABI-GAL4>UAS-SuUR_{Nmut}* ядра слюнных желез были больше, чем ядра у личинок *ABI-GAL4>UAS-SuUR* с эктопической экспрессией нормального белка, но меньше чем ядра слюнных желез линии дикого типа Oregon R (Рис. 5). Было проверено четыре независимых линии, несущих трансген *UAS-SuUR_{Nmut}*, которые оказывали сходный эффект на эндорепликацию в ядрах слюнных желез.

Эктопическая экспрессия *UAS-SuUR* в фолликулярных клетках под контролем драйвера *C323-GAL4* вызывает полную стерильность самок за счет подавления амплификации хорионовых генов (Volkova et al., 2003). Эктопическая экспрессия *SUUR_{Nmut}* при этих же условиях вызывает неполную стерильность у самок: было поставлено около 30 скрещиваний, в которых проанализировали 10 линий, в двух скрещиваниях (в разных линиях) появлялись одиночные потомки.

Мутация в N-конце белка вызвала ослабление еще одного эктопического свойства SUUR. При повсеместной экспрессии *SUUR_{Nmut}* в 4 из 10 проанализированных линий *da-GAL4>UAS-SuUR_{Nmut}* в потомстве появлялись взрослые единичные самки, тогда как повсеместная экспрессия SUUR приводила к гибели всех потомков на 1-2 личиночной стадии.

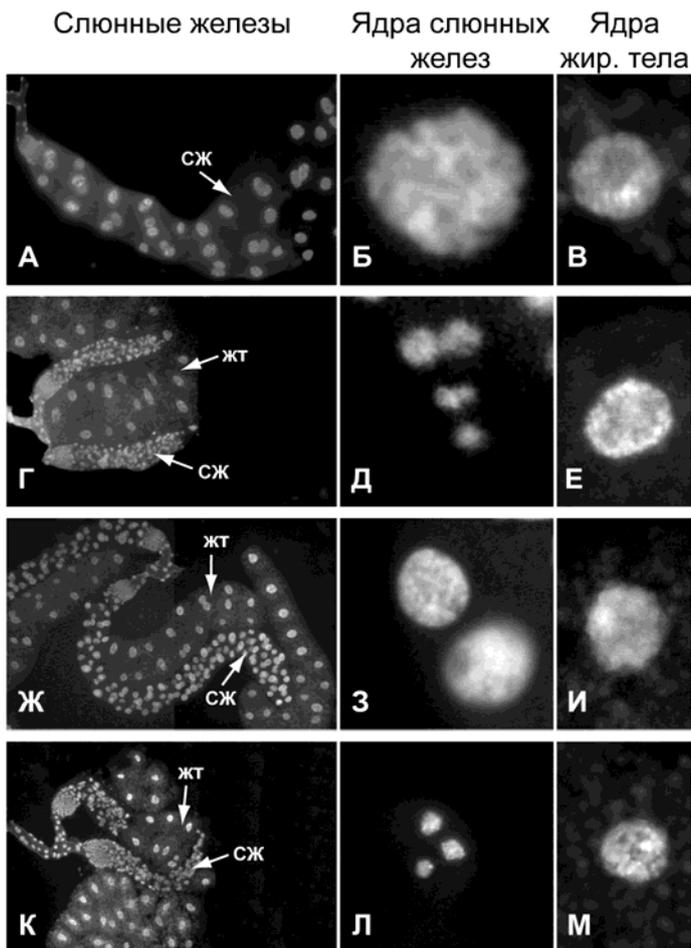


Рисунок 5. Влияние точечных замен в белке SUUR на его способность супрессировать политенизацию при сверхэкспрессии с ранних стадий развития. Ядра слюнных желез (СЖ) и жирового тела (ЖТ) были окрашены DAPI и сняты при одном увеличении. А-В – Oregon R. Эктопическая экспрессия SUUR в СЖ под контролем драйвера *AB1-GAL4* вызывает супрессию политенизации, что приводит к образованию миниатюрной СЖ (Г), размер ядер в которой намного меньше размера ядер ЖТ (Е) и ядер СЖ дикого типа (Б). Эктопическая экспрессия $SUUR_{Nmut}$ под драйвером *AB1-GAL4* приводит к частичному подавлению политенизации (Ж). Ядра СЖ у личинок *AB1-GAL4 > UAS-SuUR_{Nmut}* (З) больше, чем у личинок *AB1-GAL4 > UAS-SuUR* (Д), они такого же размера, как и ядра ЖТ (И).

Действие эктопической экспрессии белка $SUUR_{Cmut}$ не отличается от действия полноразмерного SUUR (К-М).

Что касается белка $SUUR_{Cmut}$, наша надежда попасть в функционально значимые аминокислоты, замена которых оказала бы влияние на способность белка влиять на репликацию ДНК, не оправдалась. Сверхэкспрессия $SUUR_{Cmut}$ под контролем драйвера *AB1-GAL4* приводит к образованию миниатюрной слюнной железы (так же, как и в случае с нормальным SUUR) (Рис. 5 К-М). Эктопическая экспрессия $SUUR_{Cmut}$ под контролем *C323-GAL4* вызывает полную (100%) стерильность у самок. Таким образом, мутации в С-конце SUUR не нарушили способность белка влиять на эндорепликацию в слюнных железах и подавлять амплификацию хорионовых генов в фолликулярных клетках при его эктопической экспрессии.

9. Влияние мутаций на способность белка связываться с хромосомами и изменять структуру хроматина

На хромосомах личинок дикого типа белок SUUR выявляется в поздно реплицирующихся районах. Такую же картину связывания можно наблюдать при слабой мозаичной сверхэкспрессии белка, запускаемой драйвером *arm-GAL4*. У личинок *arm-GAL4 > UAS-SuUR; SuUR^{ES}* приблизительно в 20% ядер на политенных хромосомах в районах ИГХ есть разломы, и картина связывания белка с хромосомами соответствует той, которую мы наблюдаем

в ядрах слюнных желез личинок дикого типа (Kolesnikova et al., 2005). Это удобная система для экспрессии белка в количестве, близком к тому, которое есть в личинках дикого типа. При сверхэкспрессии $SUUR_{Nmut}$ в этой системе, белка на хромосомах личинок $arm-GAL4>UAS-SuUR_{Nmut}; SuUR^{ES}$ ни в районах ИГХ и ПГХ, ни в каких-либо других районах выявить не удастся. Слабые точки на хромосомах также полностью отсутствуют.

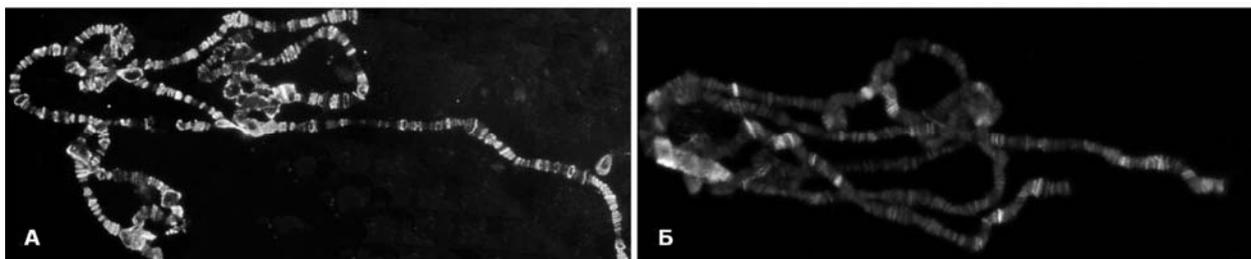


Рисунок 6. В белке $SUUR_{Nmut}$ способность специфически связываться с хромосомами при сверхэкспрессии под контролем драйвера $Sgs3-GAL4$ ослабевает. А - на политенных хромосомах $Sgs3-GAL4>UAS-SuUR; SuUR^{ES}$ белок выявляется практически во всех дисках, Б - на хромосомах $Sgs3-GAL4>UAS-SuUR_{Nmut}; SuUR^{ES}$ интенсивность связывания мутантного белка по дискам заметно слабее. Фотографии сделаны при одинаковой выдержке.

Для того, что бы ответить на вопрос о том, способен ли вообще белок $SUUR_{Nmut}$ связываться с хромосомами, был использован более сильный драйвер, активный в слюнной железе, $Sgs3-GAL4$, который начинает работать с середины третьей личиночной стадии, когда репликация в слюнных железах уже в основном завершена. На хромосомах давленных препаратов личинок $Sgs3-GAL4>UAS-SuUR; SuUR^{ES}$ присутствует четкий сигнал во всех дисках и в хромоцентре (Рис. 6 А), что же касается хромосом личинок $Sgs3-GAL4>UAS-SuUR_{Nmut}; SuUR^{ES}$, сигнал также присутствует по дискам и в хромоцентре, но он довольно слабый и нечеткий, размытый (так, как будто он еще фоном присутствует и в междисках) (Рис. 6 Б). Таким образом, мутации, повреждающие N-конец белка, сильно ослабляют его связывание с хромосомами. Эктопическая экспрессия белка $SUUR$ под драйвером $Sgs3-GAL4$ вызывает еще одно интересное свойство - в районах ИГХ политенных хромосом слюнных желез образуются специфические вздутия - «пузыри» (Zhimulev et al., 2003c). Эктопическая экспрессия белка $SUUR_{Nmut}$ при тех же условиях не приводит к появлению «пузырей» или каких-либо других видимых структурных изменений.

Итак, несмотря на то, что $SUUR$ попадает в класс быстро эволюционирующих белков и что за пределами двукрылых его гомологи не были обнаружены, в нем можно обозначить несколько высоко консервативных районов и отметить сохранение доменной структуры у представителей рода *Drosophila*. Замена двух консервативных аминокислот в мотиве с гомологией к АТФ-азному домену, приводящая к такому же эффекту в системе эктопической экспрессии, как и удаление всей N-концевой половины белка (ак 1-494), указывает на функциональную значимость этого

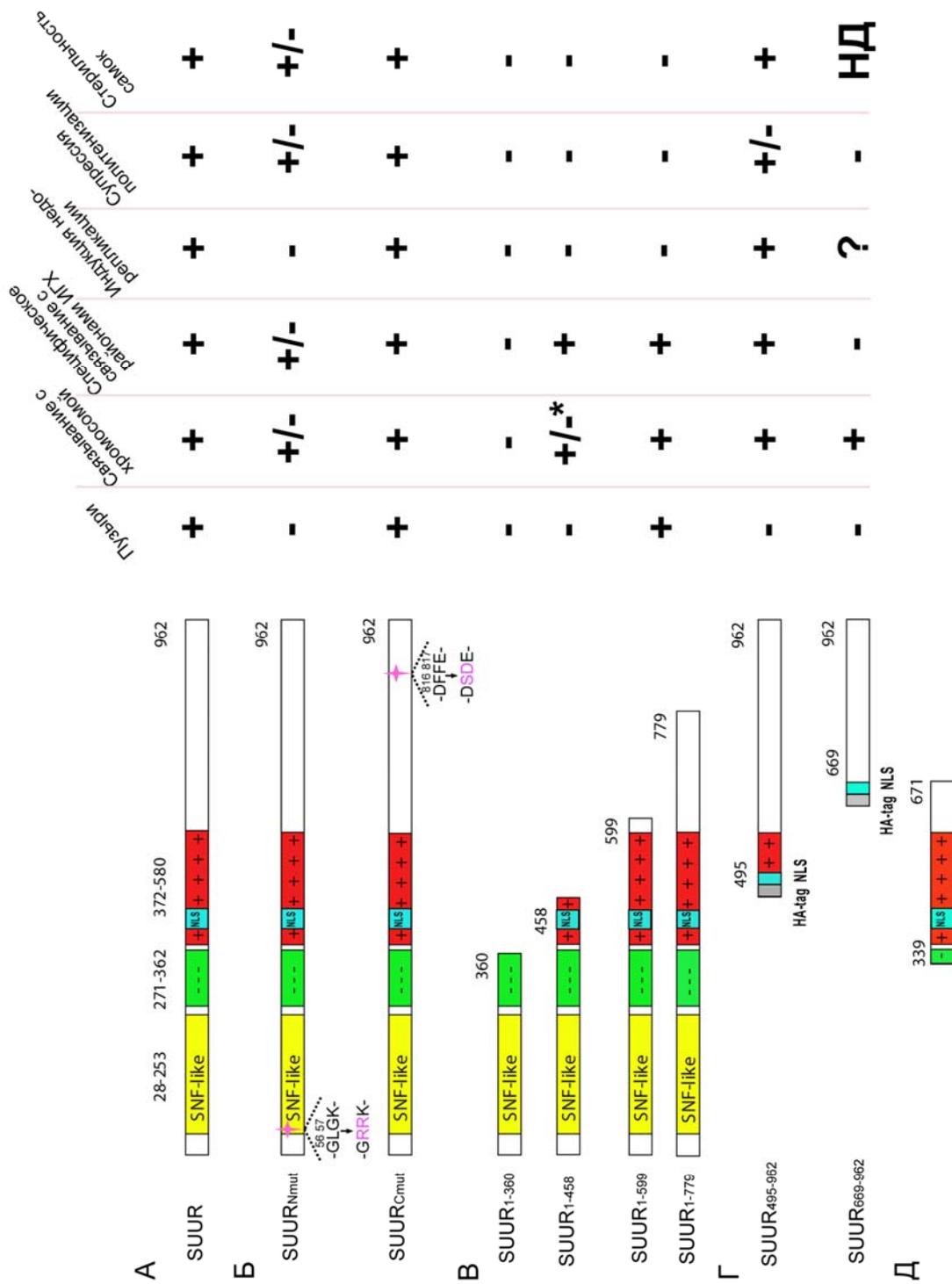


Рисунок 7. Белок SUUR и его мутантные формы, протестированные в системе оверэкспрессии. А - полноразмерный белок SUUR, Б - мутантные формы белка с заменами аминокислот в консервативных регионах, В - укороченные фрагменты белка, полученные EMS-мутагенезом (Kolesnikova et al., 2005), Г - С-концевые фрагменты белка (Kolesnikova et al., 2005), Д - фрагмент белка, для которого показано связывание с HP1 в дрожжевой двугибридной системе (Pinduglin et al., 2008). Справа представлена таблица с описанием эффектов, которые могут вызывать представленные фрагменты при оверэкспрессии в различных тканях. * - в районах прицентромерного и интеркалярного ГХ наблюдается сигнал в виде гранул. НД - нет данных.

мотива (Рис. 7). Наличие у гена *SuUR* uORF, более консервативной чем ORF самого SUUR, на фоне отсутствия в промоторной области известных регуляторных элементов, дает новые возможности для изучения регуляции этого гена.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительный анализ белка SUUR 11 видов рода *Drosophila* показал, что он содержит большое количество делеций и инсерций; соотношение числа синонимичных и несинонимичных замен позволяет отнести его к группе быстро эволюционирующих белков. Не выявлено ортологов SUUR за пределами двукрылых.
2. Последовательность uORF, находящейся в 5'UTR гена *SuUR* дрозофилы, более высоко консервативна, чем последовательность основной ORF, что предполагает ее роль в регуляции трансляции.
3. Установлено, что основные домены в белке SUUR у исследованных видов рода *Drosophila* сохраняются, при этом аминокислотные замены среди этих доменов распределены неравномерно: максимальное их количество приходится на среднюю часть белка, содержащую заряженные кластеры, однако суммарный заряд белка остается практически неизменным.
4. Показано, что наиболее консервативным является N-конец белка с гомологией к АТФ-азному домену белков группы хроматинового ремоделинга (SWI/SNF). Направленно полученные точечные замены аминокислот в этом домене, L57R и G58R, приводят к уменьшению интенсивности связывания белка с хромосомами, что в свою очередь ослабляет его влияние на процессы репликации и структуру хроматина.
5. С помощью Вестерн-блот гибридизации показано наличие белка у видов *D. simulans* и *D. ananassae*. У *D. simulans* разломы на политенных хромосомах, являющиеся маркером недорепликации, вызываются белком SUUR по тому же механизму, что и у *D. melanogaster*.
6. Методом количественной Саузерн-блот гибридизации показано, что стерильность самок дрозофилы при эктопической экспрессии белка SUUR в фолликулярных клетках ооцитов вызвана подавлением амплификации кластера хорионов генов. Таким образом, белок SUUR способен оказывать влияние на репликацию в различных тканях.
7. Установлено, что у мутантов *SuUR^{ES}* транскрибируется две мРНК: с нативного промотора до места встройки ретротранспозона в ген и после места инсерции (вероятно, с промотора транспозона). Такие усеченные мРНК не могут обеспечить синтез нормального белка, что и приводит к мутантному фенотипу.

Список публикаций по теме диссертации

1. Volkova, E.I., **Yurlova, A.A.**, Kolesnikova, T.D., Makunin, I.V., Zhimulev, I.F. Ectopic expression of the *Suppressor of Underreplication* gene inhibits endocycles but not the mitotic cell cycle in *Drosophila melanogaster* // Molec. Genet. Genomics. 2003. V.270 (5). P.387—393.
2. Колесникова Т.Д., Андреева Е.Н., Пиндюрин А.В., Ананько Н.Г., Белякин С.Н., Шлома В.В., **Юрлова А.А.**, Макунин И.В., Похолкова Г.В., Волкова Е.И. Заруцкая Е.А., Кокоза Е.Б., Семешин В.Ф., Беляева Е.С., Жимулев И.Ф. Ген *SuUR* и его участие в организации эпигенетически репрессированных районов хромосом *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2006. Т.42. № 8. С.1013-1028.
3. Жимулёв И.Ф., Беляева Е.С., Андреевкова Н.Г., Андреева Е.Н., Белякин С.Н., Болдырева Л.В., Брусенцова И. В., Волкова Е.И., Демаков С.А., Демакова О.В., Заруцкая Е.А., Зыков И. А., Кокоза Е.Б., Колесникова Т.Д., Комор У.А., Коряков Д.Е., Макунин И.В., Пиндюрин А.В., Похолкова Г.В., Семешин В.Ф., Шлома В.В., **Юрлова А.А.** Ген *SuUR* - уникальный инструмент для изучения структуры и организации хромосом и генома дрозофилы // Инф. Вестник ВОГиС. 2008. Т.12. № 1/2, С.127-149.
4. **Anna A. Yurlova**, Igor V. Makunin, Tatyana D. Kolesnikova, Olga V. Posukh, Elena S. Belyaeva and Igor F. Zhimulev. Conservation of domain structure in a fast-evolving heterochromatic SUUR protein in Drosophilids // Genetics. 2009. V.183 (1). P.119-129.
5. Макунин И.В., **Юрлова А.А.** LTR транспозоны как источник промоторов в геноме дрозофилы // Генетика. 2010. Т.46. № 9. С.1202-1204.
6. **Юрлова А.А.**, Макунин И.В., Жимулев И.Ф. Филогенетический анализ быстро эволюционирующего гена *SuUR* у насекомых // Генетика. 2010. Т.46. № 9. 1272-1275.

ЮРЛОВА
АННА АЛЕКСАНДРОВНА

**Структурные домены белка SUUR, контролирующего позднюю репликацию
политенных хромосом *Drosophila melanogaster***

Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата биологических наук.

Подписано в печать 27.10.2010. Заказ №85. Формат 60x84/16.

Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии Института катализа СО РАН
630090 Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 5