

УДК 577.1;575.1

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРАНСКРИПТОВ ТЕЛОМЕРНОГО РЕТРОЭЛЕМЕНТА *HeT-A* И КОДИРУЕМОГО ИМ БЕЛКА Gag В РАННЕМ РАЗВИТИИ *Drosophila*

© 2016 И.А. Оловников, В.В. Моргунова, А.А. Миронова,
М.Ю. Кордюкова, Е.И. Радион, О.М. Оленкина,
Н.В. Акуленко, А.И. Калмыкова*

Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва;
электронная почта: allakalm@img.ras.ru

Поступила в редакцию 30.06.16
После доработки 04.07.16

Теломера представляет собой нуклеопротеиновый комплекс на концах линейных хромосом, который защищает их от слияния и деградации. В состав теломеры входят теломерная ДНК, защитный белковый комплекс и теломерная РНК. Биогенез теломерных транскриптов в процессе развития пока далек от понимания. Теломеры *Drosophila* удлиняются с помощью транспозиций специализированных теломерных ретротранспозонов, кодирующих белки. С помощью конструкций, кодирующих маркированный теломерный белок, мы показали, что транскрипты теломерного элемента *HeT-A* взаимодействуют с кодируемым ими белком Gag-*HeT-A*. Материнские транскрипты *HeT-A* в комплексе с белком Gag-*HeT-A* формируют рибонуклеопротеиновые гранулы вокруг centrosom, центров организации микротрубочек, на этапе формирования бластомеры при нарушении сайленсинга теломерных повторов во время оогенеза. Специфичная локализация РНК *HeT-A* достигается с помощью транспорта по микротрубочкам, т.к. в условиях разрушения микротрубочек эта локализация нарушается. Апробированная в работе трансгенная система является перспективной моделью для изучения биогенеза теломерной РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: теломера, развитие, ретротранспозон *HeT-A*, *Drosophila*, теломерная РНК.

Теломеры представляют собой комплекс нуклеиновых кислот и белков, защищающих концы линейных хромосом эукариот. В состав теломер входят теломерная ДНК и связанные с ней белки, а также недавно обнаруженная теломерная РНК, считываемая с теломерных повторов. Транскрипция теломерных повторов является консервативным свойством многих организмов, однако ее роль до конца не выяснена. У млекопитающих теломерные повторы, образуемые теломеразой, транскрибируются с образованием теломерных РНК, TERRA (telomeric repeat-containing RNA), играющих важную структурную роль в формировании теломерного хроматина [1]. Основные данные о биогенезе TERRA получены *in vitro* или на культурах опу-

холевых клеток, в которых наблюдается высокое содержание TERRA. Согласно современным данным, уровень транскрипции TERRA напрямую связан с состоянием теломерного комплекса, а сами теломерные транскрипты могут связывать теломерные белки, теломеразу и компоненты, участвующие в репликации [1]. В ооцитах человека также выявлены TERRA [2], что указывает на то, что теломерные РНК играют консервативную роль в процессе оогенеза и раннего развития.

Особенностью теломерных повторов *Drosophila* является то, что они представлены ретротранспозонами типа LINE (long interspersed nuclear element), *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*, основным из которых является *HeT-A* [3]. Комплекс теломерных белков дрозофилы, являющийся функциональным аналогом шелтерина, защищает концы хромосом дрозофилы от деградации и слияния [4]. Теломерный транскриптом *Drosophila* состоит как из длинных транскриптов, соответствующих смысловой и антисмысловой цепям теломерных повторов, так и из коротких РНК, образуемых системой РНК-интерференции (РНКи) [5, 6].

Принятые сокращения: TERRA – теломерные РНК, содержащие повторы (telomeric repeat-containing RNA); РНКи – РНК-интерференция; piРНК – piRNA (Piwi interacting RNA); РНП – рибонуклеопротеин; RIP – иммунопреципитация РНК-связывающего белка (RNA-Binding Protein Immunoprecipitation); DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол.

* Адресат для корреспонденции.

Транскрипты теломерных ретротранспозонов являются матрицей для обратной транскрипции, что приводит к удлинению теломер. В доставке РНК *HeT-A* к теломере принимает участие РНК-связывающий белок Gag-HeT-A, кодируемый мРНК *HeT-A* [7]. Показано, что Gag-HeT-A в комплексе с транскриптом *HeT-A* способен локализоваться на теломере [8] и взаимодействовать с одним из белков теломерного комплекса, Ver, гомологом теломерного белка дрожжей Stn1, ингибитора теломеразы [7]. Нокдаун белка Gag-HeT-A в культуре клеток приводил к появлению слившихся хромосом, что является признаком дисфункции теломер [9]. Эти данные указывают на то, что белок Gag-HeT-A является специфичным компонентом теломерного хроматина, более того, способным связываться с РНК *HeT-A*, что делает этот белок привлекательной мишенью исследования теломерного комплекса у *Drosophila*.

Несмотря на очевидные различия строения теломер у млекопитающих и дрозофилы, основные их компоненты функционально аналогичны. Так, удлинение происходит преимущественно в герминальных клетках с помощью обратной транскриптазы с использованием РНК-матрицы, причем теломеразы и ретротранспозазы мобильных элементов филогенетически и функционально родственны [10, 11]. У млекопитающих мобильные элементы LINE-1 способны перемещаться на теломеры, имитируя поведение *HeT-A* у *Drosophila* [12], а также необходимы для удлинения теломер в раковых клетках [13]. У некоторых насекомых, например, у шелкопряда *Bombyx mori*, в теломерах присутствуют как теломеразные повторы, так и ретротранспозонные, что является промежуточным этапом перехода между этими взаимозаменяемыми способами удлинения теломер [14]. Транскрипция теломер и образование коротких теломерных РНК также происходят в обоих таксонах и, по-видимому, играют сходные роли [5, 15–18]. Говоря о теломерных белковых факторах, между млекопитающими и дрозофилой также наблюдается много общего [4]. Учитывая эти сходства, мы использовали *Drosophila* в качестве модельной системы для исследования теломерных РНК в герминальных тканях самок и в раннем развитии.

Исследуя теломеры в яичниках и раннем развитии дрозофилы, мы показали, что уровень транскрипции теломерных РНК тесно связан с формированием защитного теломерного комплекса [19]. В норме экспрессия теломерных повторов в яичниках сильно подавлена за счет различных механизмов сайленсинга, таких как система с участием piРНК (Piwi interacting RNA) и сборка специфичного для теломер репрессивно-

го хроматина. Нарушения работы факторов, ингибирующих экспрессию теломерного повтора дрозофилы *HeT-A* в яичниках, приводило к высокому уровню летальности эмбрионов, сопровождавшемуся митотическими нарушениями, а именно образованием теломерных мостиков, мультиполярных веретен деления и свободных центросом [19]. Показано, что материнские теломерные РНК, образующиеся в питающих клетках яичника при дисфункции теломер, транспортируются в ооцит и оказываются в эмбрионах, где скапливаются вокруг центросом. Мы предполагаем, что теломерные транскрипты могут играть особую роль в раннем развитии при формировании бластодермы. В клетках человека выявлена колокализация некоторых теломерных белков, таких как TRF1 и танкираза, с центросомами [20, 21], что указывает на возможность функционального взаимодействия между митотическим аппаратом и теломерами. Однако механизм этого взаимодействия пока неясен.

Целью данной работы было исследование феномена привлечения материнских теломерных РНК к центросомам и создание системы для выявления возможных белков-партнеров, с которыми взаимодействуют теломерные РНК в раннем эмбриогенезе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание конструкции pUASTattB-HeT-A-NA-FLAG. Для создания конструкции pUASTattB-HeT-A ПЦР-продукты 34v-37v и 36v-20v, амплифицированные с геномной ДНК линии *y¹; cn¹ bw¹ sp¹*, были обработаны эндонуклеазами рестрикции BglII, XmaI и XmaI, XbaI соответственно и лигированы одновременно между сайтами BglII, XbaI вектора pUASTattB. Последовательности, кодирующие NA и FLAG, были встроены в полученную плазмиду на 3'-конец открытой рамки считывания белка Gag следующим образом: ПЦР-продукты HeTA_CHIP_ORFS – 26v и 39v-24v, амплифицированные на матрице pUASTattB-HeT-A, были смешаны и использованы в перекрывающейся ПЦР с праймерами HeTA_CHIP_ORFS и 24v. Полученный ампликон был обработан эндонуклеазой рестрикции BstAPI и лигирован в pUAST-HeTΔBstAPI, BstAPI. Последовательности праймеров представлены в таблице.

Культура клеток и линии *Drosophila*. Транфекцию линии эмбриональных клеток дрозофилы Schneider 2 (S2) проводили с помощью реагента FuGENE 6 («Roche», Швейцария). Для проведения трансгенеза использовали линию

Праймеры, использованные в работе

Мишень	Название праймера	Последовательность праймера
pUASTattB-HeT-A-NA-FLAG	20v	GATCAATCTAGAAACTTTGCTGGTGGAGGTACGG
	24v	CCTTTATTTATGGGCCATCG
	26v	CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCAGCGTAATCGGGCACGTCATAAG-GGTAGTTGGATGTATCCATGTCAAG
	34v	GATCAAAGATCTCGTTCGCTTGCCAAAGACTCT
	36v	TTCTGACGATGAGGTACTTTCA
	37v	CTCTATTAGCTAAGCTTGTGTG
	39v	GACTACAAGGACGACGATGACAAGTAATCTTACAACACTTATATATTC
	HeTA_CHIP_ORFs	CCAGGCAAGCGGACAAACGA
<i>rp49</i>	rp49-f	ATGACCATCCGCCAGCATAAC
	rp49-r	GCTTAGCATATCGATCCGACTGG
<i>HeT-A ORF</i>	HeT-A-ORF-f	GGAGTGATGAGCGGCGGAAA
	HeT-A-ORF-r	CCAGGCAAGCGGACAAACGA
<i>HeT-A-NA</i>	HeT-A-NA-f	AATCCCAACTCACAAAAAGGCC
	HeT-A-NA-r	GTCCTTGTAGTCAGCGTAATCG
<i>TART-A</i>	TART-A-f	AATGAACTTTGTCTGCCCTCCCA
	TART-A-r	ATCTGTCTACTGTCCGCCTTCGCTA
<i>I-элемент</i>	I-el-f	ACAAAATCACTTCAAAAACATACCAATCCC
	I-el-r	GCATCCCTCAACTTCTCCTCCACAG

24862 (Bloomington Drosophila Stock Center). Для активации транскрипции в клетках S2 экспрессионная плаزمида pUASTattB-HeT-A-NA-FLAG была котрансфицирована с плазмидой-драйвером pAC-GAL4. Для активации транскрипции HeT-A-NA-FLAG в мухах в геном трансгенной линии была генетически введена конструкция, содержащая активатор экспрессии GAL4 (w^{1118} , P{GAL4-nos.NGT}40, Bloomington Stock Center). Для получения герминального нокдауна гена *spnE* была генетически введена конструкция для экспрессии двуцепочечной РНК этого гена (линия 103913, Vienna Drosophila Resource Center).

Вестерн-блот-анализ и иммуноокрашивание, совмещенное с детекцией РНК. Для вестерн-блот-анализа тотальные экстракты яичников разделяли в 8%-ном ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («GE Healthcare», США). Визуализацию сигнала осуществляли с использованием системы Immun-Star AP Detection System («Bio-Rad», США). Иммуноокрашивание, совмещенное с РНК FISH (fluorescence *in situ* hybridization), проводилось, как описано ранее [19]. В работе использовали следующие антитела:

a/FLAG («Sigma», США), a/HA («Cell Signaling», США), a/ α -тубулин («Sigma», США), a/ γ -тубулин («Sigma», США), a/mouse-Alexa 488 («Life Technologies», США), a/mouse-Alexa 546 («Life Technologies», США), a/rabbit-Alexa 546 и 633 («Life Technologies», США). ДНК окрашена DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Съемка проводилась на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 510 Meta («Zeiss», Германия).

Анализ количества РНК. RIP (RNA-Binding Protein Immunoprecipitation). Тотальную РНК выделяли из яичников трехдневных мух с использованием реагента TRIzol («Life Technologies», США). Обратная транскрипция (ОТ) проводилась с 6-нуклетидным праймером случайной последовательности и ревертазой SuperScriptII («Life Technologies», США) согласно рекомендациям производителя. Геноспецифичные праймеры, использованные для количественной ПЦР (ОТ-кПЦР), представлены в таблице.

Для проведения RIP получали тотальный лизат культуры клеток S2 после котрансфекции конструкциями, содержащими HeT-A-NA-FLAG и трансаактиватор GAL4 под промотором гена

актина. В качестве контроля использовали не-трансфицированные клетки S2. Контрольный и опытный экстракты были проинкубированы с анти-НА магнитными частицами («Pierce», США). Процедура иммунопреципитации с последующим выделением РНК и ОТ-ПЦР проводилась, как описано ранее [22]. В реакции обратной транскрипции использовались 6-нуклеотидный праймер со случайной последовательностью (random primer) и ревертаза SuperScript IV («Life Technologies», США) согласно рекомендациям производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия трансгенного теломерного белка Gag-HeT-A. Для исследования локализации и функциональных партнеров теломерных РНК и белков была получена конструкция, содержащая полноразмерный ретротранспозон *HeT-A*, кодирующий маркированный белок Gag-HeT-A. Для этого полноразмерная геномная копия *HeT-A* была клонирована в вектор pUAST-attB, содержащий дрожжевой промотор UAS, индуцируемый за счет тканеспецифичной экспрессии трансактиватора GAL4-VP16. Полученная конструкция модифицирована таким образом, что кодируемый ею белок Gag содержит C-концевые пептиды НА (hemagglutinin) и FLAG (конструкция HeT-A-NA-FLAG, рис. 1, а). Эксперимент по трансфекции культуры клеток *Drosophila* S2 с помощью полученной конструкции с последующим вестерн-блот-анализом выявил белок Gag-HeT-A-NA-FLAG ожидаемого размера (рис. 1, б). Данная конструкция была использована для трансгенеза линии мух, содержащих сайт посадки attP, с помощью сайт-специфической рекомбиназы фага phiC31.

Экспрессия полученной трансгенной копии *HeT-A* в герминальных клетках была проверена с помощью ОТ-кПЦР на тотальной РНК, выделенной из яичников трансгенной линии в норме и на фоне нокдауна с помощью РНК-интерференции (РНКи) РНК-хеликазы Spindle-E (SpnE), компонента системы сайленсинга с участием рiРНК. Известно, что система с участием рiРНК ингибирует транскрипцию ретротранспозонов, включая теломерные, в яичниках дрозофилы [5, 23]. Использование праймеров, специфичных для трансгенной копии и геномных копий *HeT-A*, показало, что уровень экспрессии трансгенной копии сравним с уровнем экспрессии геномных копий, причем при нокдауне *spnE* происходит дерепрессия как эндогенных, так и трансгенной копии *HeT-A* (рис. 1, в). Однако рекомбинантный белок Gag-HeT-A-NA-FLAG выявляется с

помощью вестерн-блот-анализа в яичниках трансгенных мух только на фоне РНКи нокдауна белка SpnE (рис. 1, г). Иммуноокрашивание яичников трансгенных мух на фоне нокдауна *spnE* выявило накопление белка Gag-HeT-A-NA в питающих клетках и ооците, что указывает на то, что белок или комплекс РНК *HeT-A* с белком транспортируется из питающих клеток в ооцит (рис. 2, см. цветную вклейку). Такая локализация была показана ранее для белка Gag-HeT-A, кодируемого эндогенными повторами *HeT-A* [7, 24]. Таким образом, получена трансгенная конструкция, содержащая полноразмерный теломерный повтор *HeT-A*, паттерн экспрессии которого сходен с эндогенными теломерными повторами *HeT-A*.

мРНК *HeT-A* взаимодействует с кодируемым ею белком Gag-HeT-A. Ранее было показано, что на фоне мутаций компонентов системы рiРНК в яичниках происходит гиперэкспрессия *HeT-A*, в результате в ооците накапливаются транскрипты *HeT-A* и белок Gag-HeT-A [7, 24, 25]. Коллокализация транскриптов *HeT-A* с белком Gag-HeT-A вблизи теломер наблюдалась в пролиферирующих соматических клетках дрозофилы [7]. Gag является РНК-связывающим белком и взаимодействует со своей мРНК-матрицей во время трансляции согласно принципу так называемого «цис-предпочтения» [26, 27]. Мы решили проверить с помощью метода RIP, происходит ли взаимодействие РНК *HeT-A* с кодируемым ею белком. Для этого была проведена иммунопреципитация с использованием иммобилизованных антител к эпитопу НА и лизатов клеток S2, контрольных и трансфицированных конструкцией HeT-A-NA-FLAG (рис. 3, а). Затем была очищена РНК, копреципитирующаяся с белками, и проанализирована с помощью ОТ-ПЦР (рис. 3, б). Заметного обогащения преципитатов транскриптами ретротранспозонов *I*-элемент и *TART* не наблюдалось. В то же время было выявлено значительное обогащение РНК *HeT-A* в преципитате из клеток, экспрессирующих Gag-NA, что указывает на связывание РНК *HeT-A* с белком Gag-HeT-A.

Локализация РНК *HeT-A* вокруг centrosом зависит от микротрубочек. РНК *HeT-A* была обнаружена в цитоплазме синцития рядом с centrosомами в эмбрионах на стадии, предшествующей началу зиготической транскрипции, при нарушении сайленсинга теломерных повторов в герминальных клетках яичника [19]. Следовательно, материнские теломерные РНК передаются потомству, однако их предназначение неизвестно. Механизм привлечения транскриптов *HeT-A* к centrosоме в раннем эмбриогенезе также неизвестен. Centrosомы являются цент-

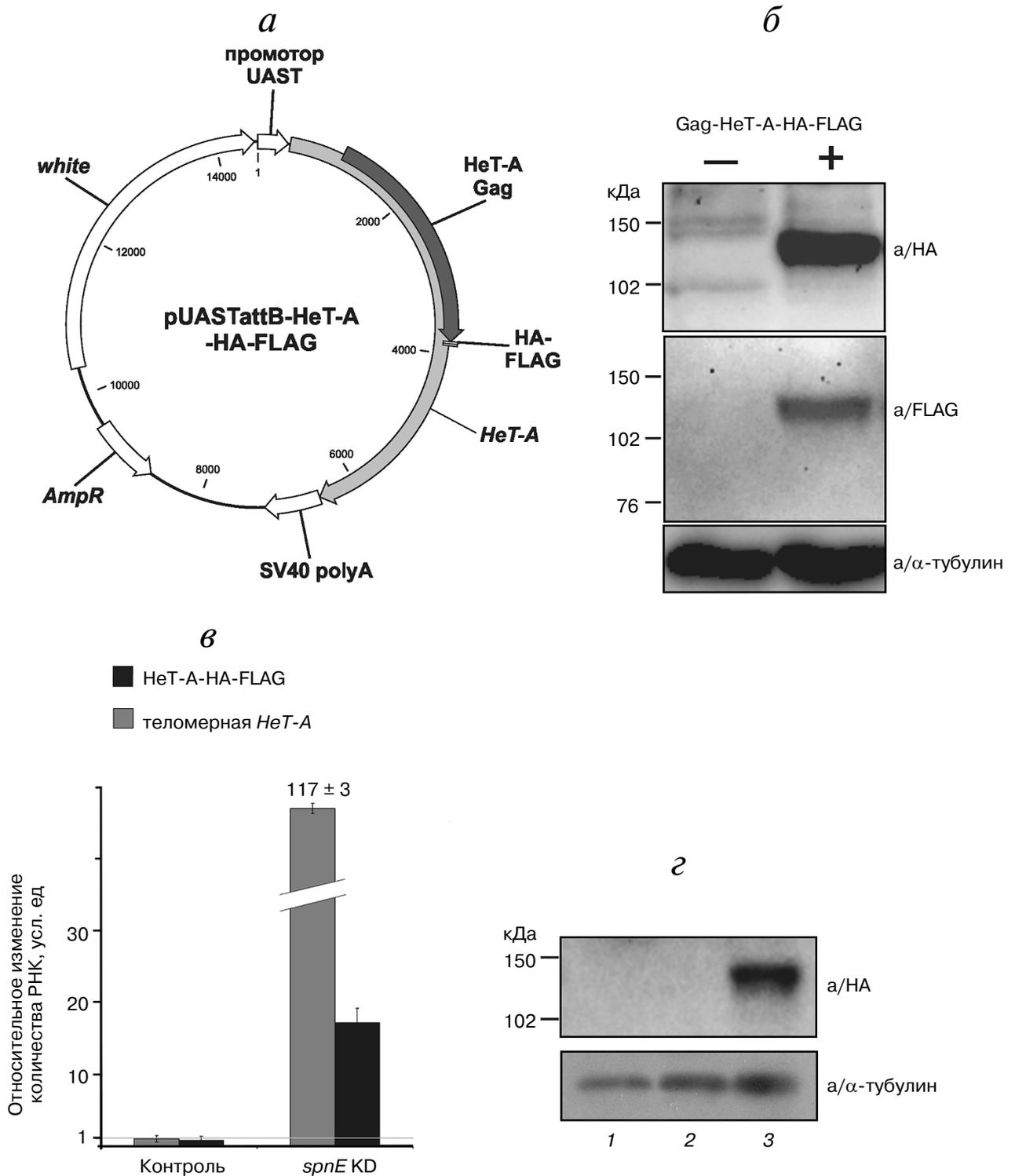


Рис. 1. Экспрессия трансгенной копии *HeT-A* в культуре клеток и яичниках *Drosophila*. *а* – Схема трансгенной конструкции pUASTattB-HeT-A-HA-FLAG; *б* – вестерн-блот-анализ экстрактов культуры нетрансфицированных клеток S2 (–) и клеток после трансфекции плазмидой, экспрессирующей Gag-HeT-A-HA-FLAG (+), с использованием антител к эпитопам HA, FLAG и α-тубулину в качестве контроля нанесения; *в* – сравнение количества транскриптов эндогенных *HeT-A* и трансгенного элемента *HeT-A* с помощью ОТ-кПЦР в тотальной РНК, выделенной из яичников трансгенной линии в норме (контроль) и на фоне РНКи нокдауна гена *spnE* (*spnE* KD); *г* – вестерн-блот-анализ экстрактов яичников контрольной линии *uw* (1) и трансгенной линии HeT-A-HA-FLAG в норме (2) и на фоне герминального РНКи нокдауна гена *spnE* (3) с использованием антител к эпитопу HA и α-тубулину в качестве контроля нанесения

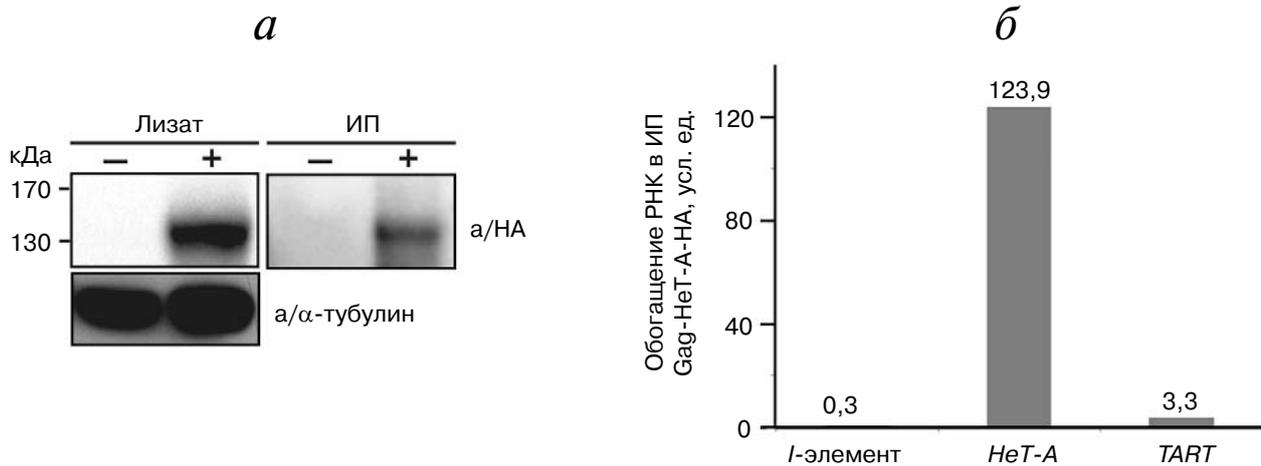


Рис. 3. мРНК *HeT-A* взаимодействует с кодируемым ей белком Gag-HeT-A. *a* – Вестерн-блот-анализ тотальных лизатов (лизат) и иммунопреципитатов (ИП) культуры нетрансфицированных клеток S2 (–) и клеток после трансфекции плазмидой, экспрессирующей Gag-HeT-A-NA-FLAG (+), с использованием антител к эпитопу НА; α -тубулин использован в качестве контроля нанесения; *б* – ОТ-кПЦР РНК, полученной из анти/НА-иммунопреципитата (ИП) из культуры нетрансфицированных (контроль) и трансфицированных (опыт) клеток S2. Представлено соотношение количества копреципитированной РНК I-элемента, *HeT-A* и *TART*, нормализованной на контрольный транскрипт *rp49*, в опыте к контролю

рами полимеризации микротрубочек в процессе митоза, необходимыми для правильного расхождения хромосом. Минус-концы микротрубочек ассоциированы с центросомой. Специфическими маркерами микротрубочек и центросом являются α - и γ -тубулин соответственно. Мы предположили, что локализация РНК *HeT-A* вблизи центросом зависит от микротрубочек. Действительно, в эмбрионах, обработанных колцемидом (реагентом, разрушающим микротрубочки), наблюдалось исчезновение скоплений гранул РНК *HeT-A* вблизи центросом (рис. 4, *a*; см. цветную вклейку). Это указывает на то, что РНК *HeT-A* перемещается к центросоме по микротрубочкам.

РНК теломерного элемента *HeT-A* и кодируемый им белок Gag-HeT-A колокализуются в ранних эмбрионах вокруг центросом. Гиперэкспрессия теломерных транскриптов, которая происходит при нарушении работы теломерных белков в яичниках, сопровождается скоплением транскриптов *HeT-A* в виде крупных гранул вблизи центросом на стадии формирования бластодермы [19]. Предполагается, что в состав таких гранул входят белки, природа которых пока неясна. Мы предположили, основываясь на наших данных о взаимодействии РНК *HeT-A* и Gag-HeT-A, что гранулы представляют собой рибонуклеопротеиновые (РНП) частицы, в состав которых входит РНК *HeT-A* и белок Gag-HeT-A. Было проведено иммуноокрашивание с помощью антител к эпитопу НА, совмещенное с РНК-FISH (зонд к *HeT-A*), на 0–2-часовых эмб-

рионах трансгенной линии, кодирующей Gag-HeT-A-NA-FLAG, на фоне РНКи нокдауна гена *spnE*. Было обнаружено, что РНК ретроэлемента *HeT-A* в ранних эмбрионах на стадии синцития колокализуется с кодируемым им белком Gag-HeT-A и формирует множественные РНП-гранулы вокруг центросом (рис. 4, *б*; см. цветную вклейку), не перекрываясь с компонентом центросом, γ -тубулином. На стадии метафазы эти скопления более плотные и расположены ближе к центросоме, а на стадии анафазы они распределены более рыхло и удалены от центросом. Мы предполагаем, что комплекс РНК и белка, кодируемых теломерным элементом *HeT-A*, транспортируется по астральным микротрубочкам (не связанным с кинетохором) в сторону их минус-конца, который направлен к центросоме. На такой механизм транспорта указывает динамичный характер распределения РНК и белка *HeT-A*, которые выглядят как плотные гранулы, локализующиеся вокруг центросом, на стадии метафазы митоза и как «вспышки салюта» на стадии анафазы, что указывает на их радиальное движение от центросомы. Возможно, такое динамичное поведение РНП-частиц *HeT-A* связано с процессами сборки–разборки микротрубочек на разных этапах клеточного цикла.

В ходе исследования локализации теломерной РНК в раннем развитии дрозофилы при нарушении сайленсинга теломерных повторов в процессе оогенеза мы обнаружили, что материнские транскрипты теломерных повторов *HeT-A*

в комплексе с белком Gag-HeT-A, кодируемым этими повторами, привлекаются к centrosомам с помощью микротрубочек на стадии формирования бластомеры. Нарушения работы теломер, происходящие, в частности, при нарушении рiРНК-сайленсинга, могут привести к неправильной сегрегации хромосом. Не исключено, что направленный транспорт теломерных транскриптов и кодируемых ими белков, гиперпродукцируемых при таких нарушениях, в бластомеру эмбриона служит одним из сигналов к выбраковке дефектных ядер – процесса, гарантирующего нормальное развитие. Поскольку мы не наблюдали ассоциации теломерных транскриптов и белков с теломерами в митотических ядрах бластомеры, можно предположить, что их функция здесь не связана с теломерами напрямую. Используемая в работе трансгенная

полноразмерная копия *HeT-A* и кодируемый ею белок, маркированный искусственными эпитопами, являются перспективными молекулярными орудиями для исследования предполагаемых белков-партнеров теломерной РНК в раннем эмбриогенезе в норме и при нарушении функции теломер.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-14-10167) и РНФ (грант № 16-04-00090, руководитель Оловников И.А.) с использованием оборудования Центра клеточных и генных технологий ИМГ РАН.

Авторы выражают благодарность Ю.А. Абрамову за помощь в генетической работе и Е.А. Михалевой за постановку эксперимента по трансфекции культуры клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Azzalin, C.M., and Lingner, J. (2015) Telomere functions grounding on TERRA firma, *Trends Cell Biol.*, **25**, 29–36.
- Reig-Viader, R., Brieno-Enriquez, M.A., Khouriauli, L., Toran, N., Cabero, L., Giulotto, E., Garcia-Caldes, M., and Ruiz-Herrera, A. (2013) Telomeric repeat-containing RNA and telomerase in human fetal oocytes, *Hum. Reprod.*, **28**, 414–422.
- Pardue, M.L., and DeBaryshe, P.G. (2003) Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres, *Annu. Rev. Genet.*, **37**, 485–511.
- Raffa, G.D., Cenci, G., Ciapponi, L., and Gatti, M. (2013) Organization and evolution of *Drosophila* terminin: similarities and differences between *Drosophila* and human telomeres, *Front. Oncol.*, **3**, 112.
- Savitsky, M., Kwon, D., Georgiev, P., Kalmykova, A., and Gvozdev, V. (2006) Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline, *Genes Dev.*, **20**, 345–354.
- Shpiz, S., Kwon, D., Rozovsky, Y., and Kalmykova, A. (2009) rasiRNA pathway controls antisense expression of *Drosophila* telomeric retrotransposons in the nucleus, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 268–278.
- Zhang, L., Beaucher, M., Cheng, Y., and Rong, Y.S. (2014) Coordination of transposon expression with DNA replication in the targeting of telomeric retrotransposons in *Drosophila*, *EMBO J.*, **33**, 1148–1158.
- Rashkova, S., Karam, S.E., Kellum, R., and Pardue, M.L. (2002) Gag proteins of the two *Drosophila* telomeric retrotransposons are targeted to chromosome ends, *J. Cell Biol.*, **159**, 397–402.
- Silva-Sousa, R., Lopez-Panades, E., Pineyro, D., and Casacuberta, E. (2012) The chromosomal proteins JIL-1 and Z4/Putzig regulate the telomeric chromatin in *Drosophila melanogaster*, *PLoS Genet.*, **8**, e1003153.
- Belfort, M., Curcio, M.J., and Lue, N.F. (2011) Telomerase and retrotransposons: reverse transcriptases that shaped genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20304–20310.
- Kopera, H.C., Moldovan, J.B., Morrish, T.A., Garcia-Perez, J.L., and Moran, J.V. (2011) Similarities between long interspersed element-1 (LINE-1) reverse transcriptase and telomerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20345–20350.
- Morrish, T.A., Garcia-Perez, J.L., Stamato, T.D., Taccioli, G.E., Sekiguchi, J., and Moran, J.V. (2007) Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres, *Nature*, **446**, 208–212.
- Aschacher, T., Wolf, B., Enzmann, F., Kienzl, P., Messner, B., Sampl, S., Svoboda, M., Mechtcheriakova, D., Holzmann, K., and Bergmann, M. (2016) LINE-1 induces hTERT and ensures telomere maintenance in tumour cell lines, *Oncogene*, **35**, 94–104.
- Fujiwara, H., Osanai, M., Matsumoto, T., and Kojima, K.K. (2005) Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori*, *Chromosome Res.*, **13**, 455–467.
- Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khouriauli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends, *Science*, **318**, 798–801.
- Bah, A., Wischniewski, H., Shchepachev, V., and Azzalin, C.M. (2012) The telomeric transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 2995–3005.
- Cao, F., Li, X., Hiew, S., Brady, H., Liu, Y., and Dou, Y. (2009) Dicer independent small RNAs associate with telomeric heterochromatin, *RNA*, **15**, 1274–1281.
- Vrbsky, J., Akimcheva, S., Watson, J.M., Turner, T.L., Daxinger, L., Vyskot, B., Aufsatz, W., and Riha, K. (2010) siRNA-mediated methylation of *Arabidopsis* telomeres, *PLoS Genet.*, **6**, e1000986.
- Morgunova, V., Akulenko, N., Radion, E., Olovnikov, I., Abramov, Y., Olenina, L.V., Shpiz, S., Kopytova, D.V., Georgieva, S.G., and Kalmykova, A. (2015) Telomeric repeat silencing in germ cells is essential for early development in *Drosophila*, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8762–8773.
- Nakamura, M., Zhou, X.Z., Kishi, S., Kosugi, I., Tsutsui, Y., and Lu, K.P. (2001) A specific interaction between the telomeric protein Pin2/TRF1 and the mitotic spindle, *Curr. Biol.*, **11**, 1512–1516.
- Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., and De Lange, T. (1998) Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres, *Science*, **282**, 1484–1487.

22. Jain, R., Devine, T., George, A.D., Chittur, S.V., Baroni, T.E., Penalva, L.O., and Tenenbaum, S.A. (2011) RIP-Chip analysis: RNA-binding protein immunoprecipitation-microarray (Chip) profiling, *Methods Mol. Biol.*, **703**, 247–263.
23. Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*, *Cell*, **128**, 1089–1103.
24. Lopez-Panades, E., Gavis, E.R., and Casacuberta, E. (2015) Specific localization of the drosophila telomere transposon proteins and RNAs, give insight in their behavior, control and telomere biology in this organism, *PLoS One*, **10**, e0128573.
25. Vagin, V.V., Klenov, M.S., Kalmykova, A.I., Stolyarenko, A.D., Kotelnikov, R.N., and Gvozdev, V.A. (2004) The RNA interference proteins and vasa locus are involved in the silencing of retrotransposons in the female germline of *Drosophila melanogaster*, *RNA Biol.*, **1**, 54–58.
26. Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S.L., Lawler, J.F., Ostertag, E.M., Kazazian, H.H., Boeke, J.D., and Moran, J.V. (2001) Human L1 retrotransposition: *cis* preference versus *trans* complementation, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 1429–1439.
27. Kulpa, D.A., and Moran, J.V. (2006) *Cis*-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 655–660.

INTERACTION OF TELOMERIC RETROELEMENT *HeT-A* TRANSCRIPTS AND THEIR PROTEIN PRODUCT Gag IN EARLY EMBRYOGENESIS OF *Drosophila*

I. A. Olovnikov, V. V. Morgunova, A. A. Mironova,
M. Y. Kordyukova, E. I. Radion, O. M. Olenkina,
N. V. Akulenko, and A. I. Kalmykova*

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,
Moscow 123182 Russia; E-mail: allakalm@img.ras.ru*

Received June 30, 2016

Revision received July 4, 2016

The telomere is a nucleoprotein complex at the ends of linear chromosomes that protects them from fusion and degradation. The telomere consists of telomeric DNA, a protective protein complex, and telomeric RNA. Biogenesis of telomeric transcripts in development is still far from being understood. *Drosophila* telomeres are elongated by a transposition of specialized telomeric retrotransposons that encode proteins. Using transgenic constructs encoding tagged telomeric protein, we show that transcripts of *Drosophila* telomeric element *HeT-A* bind Gag-HeT-A protein encoded by these transcripts. Maternal *HeT-A* transcripts and Gag-HeT-A form ribonucleoprotein granules around centrosomes, centers of microtubule organization, during blastoderm formation, upon disruption of telomere silencing during oogenesis. Specific localization of *HeT-A* RNA is dependent on microtubules since disruption of microtubules caused delocalization of *HeT-A* transcripts. This transgenic system is a valuable model for the study of telomeric RNA biogenesis.

Key words: telomere, development, retrotransposon *HeT-A*, *Drosophila*, telomeric RNA