

На правах рукописи

Го Цян

**Характеристика первичной структуры дивергентной области
максикольцевой кинетопластной ДНК
низших трипаносоматид
Leptomonas seymouri и *Leptomonas collosoma***

03.00.03 – Молекулярная биология

автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2005

Го Цян.

Работа выполнена на кафедре молекулярной биологии Биологического факультета Московского Государственного Университета им М.В.Ломоносова

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Доктор биологических наук, профессор Колесников Александр Александрович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Доктор биологических наук, профессор Сулимова Галина Ефимовна

Кандидат биологических наук, Кульбачинский Андрей Владимирович

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Институт Биоорганической химии РАН им М.М Шемякина и Ю.А Овчинникова

Защита состоится 10 ноября 2005 г. в 10 ч. на заседании Диссертационного Совета Д 501 001 76 при Московском государственном университете им М В Ломоносова по адресу 119992, Москва, Ленинские Горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии им А.Н.Белозерского

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им М В.Ломоносова

Автореферат разослан "06" Октября 2005 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета
доктор биологических наук



Н.О.Калинина

2006-4
16864

218 4040

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы:

Изучение паразитических простейших, относящихся к семейству *Trypanosomatidae*, помимо фундаментального интереса имеет и социальную значимость. Так, эти организмы являются возбудителями тяжелых заболеваний человека (трипаносомозов и лейшманиозов), животных и растений. Поэтому исследование фундаментальных молекулярно-биологических, биохимических и паразитологических аспектов жизнедеятельности трипаносоматид, а также их филогении, имеет большое значение.

Более чем 30-ти летние экспериментальные молекулярные исследования кинетопластной ДНК (кпДНК) позволили сформулировать основные принципы её организации, понять многие аспекты её функциональной нагрузки в клетке, выявить ряд уникальных по сложности биологических процессов, таких как репликация многокомпонентной катенированной системы кольцевых молекул и феномен редактирования РНК. Вместе с тем, остается очень много до конца невыясненных вопросов. Например: Чем определяется столь необычно большое количество кпДНК в клетке? Несут ли миникольцевые молекулы ещё какую-либо функциональную нагрузку, кроме кодирования молекул гидовых РНК, необходимых для процесса редактирования РНК? Какова степень полиморфности индивидуальных компонентов ассоциата кинетопластной ДНК? Какие гены (или иные участки кпДНК) могут быть использованы для оценки произошедших эволюционных событий и какова степень и специфичность дивергирования (т.е. эволюции) индивидуальных генов как на уровне вида, так и в пределах семейства, отряда? Каковы общие черты организации дивергентной области (ДО) кпДНК. К сожалению, многие из этих вопросов (сформулированных ещё 15-20 лет назад) до сих пор остаются без ответа.

ДО кпДНК мало изучена. Сейчас известна первичная структура ДО кпДНК только для *Crithidia oncopelti*, *Trypanosoma brucei*, и частично, для *Leishmania tarentolae*. Анализ первичной структуры кпДНК — первый шаг на пути

всестороннего исследования кпДНК. В данной работе мы выбрали *Leptomonas seymouri* и *Leptomonas collosoma* для изучения ДО максикольцевой кпДНК.

Цель работы:

Целью настоящей работы являлось ответить на вопрос: имеются ли закономерности в организации ДО кпДНК у низших трипаносоматид.

Экспериментальные задачи:

- 1) Построить рестрикционную карту максикольцевой кпДНК.
- 2) Получить рекомбинантные плазмиды, содержащие участки ДО максикольцевой кпДНК.
- 3) Установить первичную структуру участков ДО максикольцевой кпДНК.
- 4) Провести сравнительный анализ первичной структуры ДО максикольцевой кпДНК

Научная новизна:

- 1) Построены подробные рестрикционные карты максикольцевой кпДНК и установлены последовательности нуклеотидов протяженных участков дивергентной области максикольцевой кпДНК для *Leptomonas seymouri* и *Leptomonas collosoma*.
- 2) Показано, что сходство организации дивергентной области максикольцевой кпДНК между разными видами трипаносоматид отражает эволюционные взаимоотношения, хотя их последовательности нуклеотидов не имеют гомологии.
- 3) Гетерогенность дивергентной области максикольцевой кпДНК *Leptomonas seymouri* существует даже в одном ассоциате.
- 4) Показано, что большая часть дивергентной области максикольцевой кпДНК представляет разные tandemные повторы и регуляторные элементы, например: АААААСТТ – последовательность, которая способна инициировать транскрипцию митохондриальных генов; CSB1, CSB2. *CSB3, консервативные блоки, идентичные блокам

миникольцевой кпДНК.

- 5) Показано, что криптоген ND8 у *Leptomonas collosoma* является частично редактируемым также как и у *Crithidia oncopelti* требует незначительного редактирования на 5' конце пре-мРНК криптогена.
- 6) По анализу редактирования ND8, последовательности нуклеотидов 18S рРНК, организации дивергентной области максикольцевой кпДНК, последовательности нуклеотидов миникольцевой кпДНК можно предположить, что *Leptomonas collosoma* не относится к роду *Leptomonas*

Структура диссертации:

Диссертация состоит из трех частей: (1) обзор литературы; (2) материалы и методы; (3) результаты и обсуждение.

Работа содержит список цитируемой литературы (178 ссылок), 31 рисунок, 3 таблицы. Общий объем диссертации 122 страницы.

Апробация работы и публикации:

Результаты диссертации были представлены на международных конференциях: (1) Ломоносов-2005 – “XII международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, секция «Биология», 12-15 апреля, 2005, Москва, **Россия**; (2) Worldleish3 – “Third World Congress on Leishmaniosis”, April 10-15, 2005, Sicily, **Италия**; (3) ICOPXII – “12th International Congress of Protozoology”, July 10-15, 2005 Guangzhou, **Китай** По теме диссертации опубликовано 3 статьи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались культуры *Leptomonas seymouri* (ATCC30220) и *Leptomonas collosoma* (ATCC30261), любезно предоставленные д.б.н. С.А. Поддипасевым (ЗИН, Санкт-Петербург). Культивирование проводили в течение 7 дней при 25°C на среде “Star”. Кинетопластную и тотальную ДНК выделяли согласно стандартной методике.

Клонирование рестрикционных фрагментов и ПЦР-продуктов проводилось по методике фирм-производителей вектора. Секвенирование рекомбинантных плазмид или ПЦР-продуктов проводилось по Сэнгеру в ручном режиме или на автоматическом секвенаторе (Литех, Москва). Компьютерный анализ полученных данных проводили с помощью специальных программ VectorNTI, GeneStar и т.д.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Глава 1. Выбор объектов исследования.

Планируя работу по анализу первичной структуры ДО максикольцевой кинетопластной ДНК мы выбрали в качестве объекта исследования двух представителей рода *Leptomonas* - *Leptomonas seymouri* и *Leptomonas collosoma*. Выбор определялся следующими соображениями:

1) Группа *Leptomonas* – вторая по численности описанных видов после рода *Trypanosoma*. (С.А.Подлипаев, 1990)

2) Представители рода паразитируют в широком круге хозяев, что позволяет предполагать возможность разной организации ДО (С.А.Подлипаев, 1990)

3) Оба вида хорошо культивируются в жидкой среде.

4) Ранее полученные данные по структуре генома анализируемых видов говорят о значительных различиях в структуре индивидуальных генетических маркеров (ген 18S rRNA, ген 9S rRNA, ген цитохром b), что находит своё выражение в разном положении указанных видов на филогенетическом древе (Merzlyak et al, 2001). *L. seymouri* показывает близкое родство с представителями рода *Leishmania*, тогда как *L. collosoma* находится в ветви, объединяющей эндосимбионт-содержащие виды.

С целью дополнительного подтверждения различий между этими видами мы определили первичную структуру участка максикольцевой кпДНК между генами 9SrRNA и ND7, где у трипаносоматид локализованы гены 8 и 9

субъединицы NADH-дегидрогеназы и неидентифицированная рамка считывания 5 (MURF5).

[illegible][illegible]

1 caaguuua----gcu-cu-----agauguu--c--g--uugu-guaagaaguuuaugu-ggu-uauc-gguuu
2 CAAG--A--GC-----TTTATA-G--C--G--G--G--AGAA--A-GTGG--ATC-GG--
3 C-AG--A--G-CTTTT-AGA-G--C--GTT--G--AGATG--A-~~A~~-TGG--GTT--GTTT
4 CTA--G--G-AGCA--AGA-G--CTTTG--G--GGG-GAAG--A-G--GG--TTTCA
5 CTT--AGTGT-GCA-TT--AGATGTA--C--G--TGTAGCGT-AACCTT--TAAATGGTT--AT--A-
6 C-ATTTT-G--AGCA--GGA-CTTTTC--G--C--GGG-GGAG--GG-GG--CATTTCT
7 CUA-----quuaagca-cu-----agauguu--c--g--uugu-guaagaaguuuaugu-uquguu-crau-c

[illegible]

1 C C -au-gu-auuuuu-g-(-gcac--C-uaaag-uuuu-guuuuuuuu-gguuguguuuuuuuuuuuu
2 CC--A--G--A- GCTC-GCAC--C-TAAAG-TTTT--GTTTAA--GG-G-G--A--G-AT
3 CT-AT--GT-ATT'ATTA' -GCCC--C-TAAA-TTTTATTA -TI -CGGTGTGTGTTTATGTGTG
4 CT-AT--GTT- -A -GCAC--C-AAAA-TTTTATIA TTT----CGATGTGTGTTXATGTGTG
5 CCTATTATTG--A-A-GT--CGCGTTCTTTTCAA--G--A -G-----GG-G-G--A--G-A
6 CCC-aa-gu-auuuuuuuu-gcgc--C-caa-quuuuuuuuu-quuu-----gguuguguuuuuuuuuuuuuu

Рис.1 Выравнивание последовательностей нуклеотидов криптогена ND8 и двух полностью отредактированных мРНК (1 и 7 – мРНК, 3,4,5,6 – ДНК) 1,2-L tar – *Leishmania tarentolae*, 3-L.sey – *Leptomonas seymouri*, 4-C.onc – *Crithidia oncopelti*, 5-L.col – *Leptomonas collosoma*, 6,7-T bru – *Trypanosoma brucei*

Глава 2. Построение рестрикционной карты максикольцевой кпДНК для *Leptomonas seymouri* и *Leptomonas collosoma*.

Успех решения поставленной в работе задачи во многом зависит от построения точной рестрикционной карты максикольцевой кпДНК. В данной работе мы построили подробные рестрикционные карты максикольцевой кпДНК *L. seymouri* и *L. collosoma*.

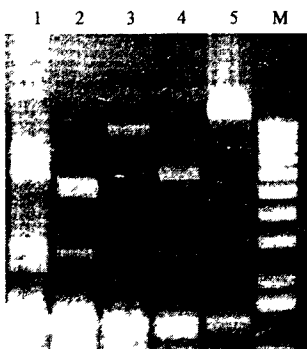


Рис.2 кпДНК *L. collosoma* после обработки рестриктазами. 1 BclI, 2 BclI+ MspI; 3. MspI, 4. BclI+HindIII; 5.HindIII; 6.M – Gibco 1kb Ladder



Рис 3 ПЦР-продукт (*L. collosoma*) до и после обработки рестриктазами М – 1kb Ladder “Geneuler”, 1 пцр-продукт А (960-961), 2 пцр-продукт А + XbaI, 3 пцр-продукт В (865-866), 4 пцр-продукт В + BclI, 5 пцр-продукт С (1 murf1F1-ND1R4), 6 пцр-продукт С + XbaI, 7 пцр-продукт D (Lmurf1F1-CO1R4), 8 пцр-продукт D + XbaI 9 пцр-продукт D + BclI

ClaI и HincPII) Заштрихованные стрелки показывают расположение и ориентацию генов в КО максикольцевой кпДНК, внутри кольца показаны клоны, содержащие фрагменты ДО максикольцевой кпДНК Clone-Lc 1,2,3,4,5,6,7,8 – рекомбинантные плазмиды; Clone-Lc1 содержит ПЦР-продукт(12SR6-CSBIIIR), Clone-Lc4 содержит ПЦР-продукт (Lca20Fi-Lca20Fi), остальные плазмиды содержат рестрикционные фрагменты; подчеркнутые линиями сайты – уточнены по секвенсу; отмеченные знаками (*) сайты – проверены расщеплением рестриктазами ПЦР-продуктов

Глава 3. Анализ последовательностей нуклеотидов дивергентной области максикольцевой кпДНК для *Leptomonas seymouri* и *Leptomonas collosoma*

Методы, применяемые для определения первичной структуры ДНК, можно разделить на две группы: собственное определение нуклеотидной последовательности (ДНК-секвенирование) и некоторые подготовительные этапы, необходимые для получения ДНК-матрицы, нуклеотидная последовательность которой будет определяться. В последнем случае может быть применена различная стратегия. Наиболее распространенными на сегодняшний день являются методы клонирования и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

До разработки метода ПЦР молекулярное клонирование представляло собой единственный “рутинный” метод получения ДНК для секвенирования. На сегодняшний день клонирование уже успешно применялось при анализе консервативной области. Однако для дивергентной области оказалось весьма непростой задачей. Возможные причины этого явления заключаются в следующем:

- ДО содержит большое количество повторов, зачастую очень коротких; это может осложнять поддержание и репликацию рекомбинантной ДНК бактериальными системами;
- Многие рестрикционные сайты в ДО попадают в повторы, следовательно,

число уникальных удобных для клонирования сайтов внутри ДО мало;

- Как альтернативу можно использовать клонирование по сайтам в консервативной области, фланкирующим ДО. Однако, размер получающихся при этом рестрикционных фрагментов, как правило, слишком велик для клонирования в плазмидные векторы,
- Фрагменты ДО очень часто не удается получить в виде рекомбинантной плазмиды даже если они подходят по размеру [Колесников, личное сообщение]. Аналогичное явление наблюдается на определенных участках различных геномов. Причины трудности клонирования остаются до сих пор невыясненными;
- Многочисленные повторы затрудняют сопоставление нуклеотидных последовательностей отдельных клонов и получение полиразмерной последовательности ДО;
- Клонированию фрагментов максиколец трипаносоматид препятствует также наличие в одном ассоциате с максикольцами большого количества гетерогенных по последовательности миниколец, которые дают гетерогенные по длине рестрикционные фрагменты. Удобнее всего работать на освобожденных из ассоциата максикольцах, однако для выделения и очистки максиколец требуется значительное количество ДНК и, соответственно, биомассы. Получение биомассы паразитических трипаносоматид, в свою очередь, очень проблематично, так как высокоспециализированные паразиты плохо размножаются на искусственных средах.

Все вышеописанные трудности послужили причиной того, что ДО называют “неклонлируемой” областью максикольца. Но несмотря на трудности разработки метода клонирования, он имеет ряд преимуществ. Основное преимущество заключается в том, что рекомбинантная ДНК синтезируется *in vivo*, поэтому, благодаря системам репарации, содержит очень мало ошибок

Построенные рестрикционные карты позволили нам выбрать несколько

вариантов сочетания пар рестриктаз для клонирования фрагментов ДО максиколецевой кпДНК.

3.1 *Leptomonas seymouri*

Для *L. seymouri* (Рис 4) получены 3 варианта рекомбинантных плазмид Clone-Ls3 – BamHI-SpeI; Clone-Ls4 – MspI-BamHI; Clone-Ls5 – BamHI-BamHI. После того, как мы установили последовательности нуклеотидов этих плазмид, мы дизайнировали праймеры и ставили обычную ПЦР и Long-ПЦР. У нас получились ПЦР-продукты Long-PCR1 (5 2 kb, 12SR6-LsMBF2) и Long-PCR2 (5 2 kb, LsND5F8-LsDRXIIIR). Используя полученные 5 рекомбинантных плазмид и ПЦР-продукты, мы секвенировали суммарную последовательность нуклеотидов 10 kb из 14 kb ДО максиколецевой кпДНК *L. seymouri*.

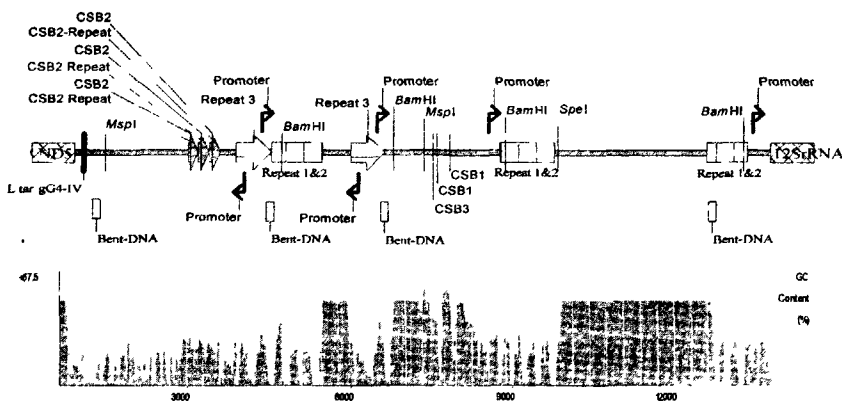


Рис 6 Организация ДО (14kb) максиколецевой кпДНК *Leptomonas seymouri*.

- Repeat 1&2 – кластер, который содержит AT-богатый повтор типа 1 и GC-богатый повтор типа 2;
- Repeat 3 – GC-богатый повтор типа 3,
- Promoter – промоторподобный мотив АААААСТ(А)Т(А);
- Bent-DNA – участок изогнутой спирали,
- L.tar-gG4-IV – гидовая РНК
- CSB2-Repeat – повтор, который содержит блок CSB2.

Карта организации ДО *L. seymouri* представлена на рис.6. В составе последовательности можно обнаружить AT-богатые повторы (тип-1) и два типа

GC-богатых повторов (тип-2, тип-3). Две известные полные копии длинного GC-богатого повтора типа-3 (длина около 630 ппн) почти идентичны, и содержат участок изогнутой ДНК, по краям которого находятся разнонаправленные промотороподобные последовательности АААААСТТ: на 3'-конце повтора присутствует еще один промотор, отличный от консенсуса АААААСУУ; данные копии вместе с повторами тип-2 входят в состав суперкластеров. Присутствует также сильно укороченная с 5'-конца копия типа 1.

Выявлены многочисленные относительно дивергентные копии более короткого повтора (около 150 ппн), перемежающиеся кластерами АТ-богатых повторов (в основном ТТТАА). Для *L seymouri* мы нашли примерно 50 повторов ТТТАА в установленной последовательности нуклеотидов ДО *L seymouri*. Этот тип повтора напоминает подобный повтор (АААГТ)₁₁₀ ДО филогенетически близкого вида *L tarentolae*.

Короткие повторы содержат на 3'-конце по одному отличному от консенсуса промотору, направленному в сторону гена 12S. Они значительно реже содержат участки изгибов. Учитывая, что повторы типа 2 не похожи даже у различных видов, неудивительно отсутствие консервативных последовательностей в составе повторов типа 2 *L seymouri*. Все вышеописанные типы повторов, организованы в очень характерные суперкластеры состава (Repeat 1&2)_n и Repeat 3.

В нашей группе [Васильева и др., 2004; Бессолицына, 2004] прямо показана промоторная роль последовательности А₃СУУ в случае различных максиколевых генов *L seymouri*, в том числе и 12S рРНК (крайний правый промотор на рис.6). В рисунке 6 видно, что почти все предполагаемые промоторы направлены в сторону гена 12S rRNA (аналогичная ситуация имеет место у *L tarentolae*). Ещё были обнаружены некоторые короткие открытые рамки считывания. Они либо находятся далеко от промотора, либо направлены против него. Следовательно, вряд ли они кодируют белок. Подобные «незначущие» рамки считывания отмечаются в ДО и других видов

кинетопластид [Колесников, 1993]. Какой либо связи промоторов с выявленными открытыми рамками считывания не обнаруживается. Подобно *L. tarentolae*, в участке ДО *L. seymouri*, прилежащем к гену ND5 присутствует ген гРНК (рис 6). Данный ген был выявлен путем сравнения с базой данных гРНК (Hinz and Göringer, 1999) и оказался высоко (87.2%, Рис 7) гомологичен гену гРНК gG4-IV *L. tarentolae*, находящемуся в этом же районе.

L. tar 
L. sey 

Рис.7 Ген гидовой РНК (gG4-IV) *L. tarentolae* и *L. seymouri* для РНК-редактирования пре-мРНК гена G4.

Кроме того, присутствуют и элементы уникальные для *L. seymouri*. В первую очередь, это так называемые CSB2-повторы (длина около 210 п.н.), образующие тандемный кластер из трех очень сходных копий. Они содержат по одному элементу CSB2 и по 1-3 отличных от консенсуса промотора. CSB2 входит в состав ori репликации миниколец, однако основная роль отводится CSB1 и CSB3, поэтому никаких предположений о функции данных повторов мы высказать не можем.

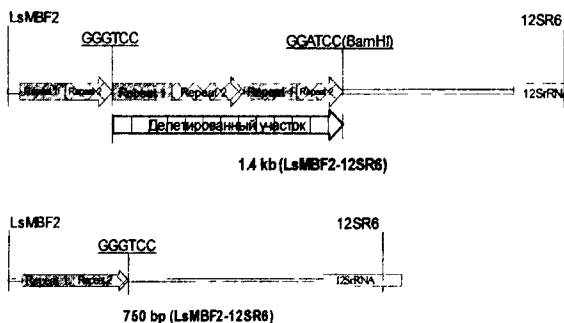
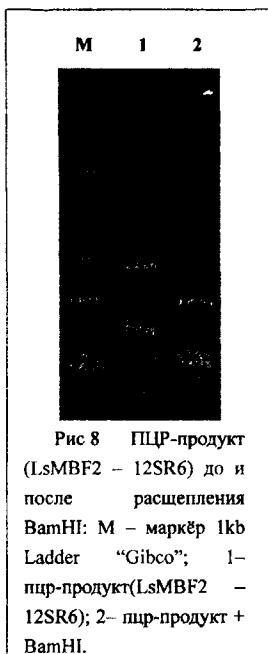
Другой уникальный участок ДО более подходит на роль ori. Он не содержит повторов и включает консервативные элементы CSB3 (ori лидирующей цепи миниколец) и CSB1 (ori отстающей цепи миниколец), располагающиеся на разных цепях, а также изогнутые участки. В данном случае обнаруживаются последовательности, полностью совпадающие с CSB миниколец.

Кроме того, мы уделим некоторое внимание обсуждению изогнутой ДНК. Несмотря на активное изучение изогнутого участка миниколец, до сих пор не проводился поиск аналогичных участков в максиколецях. Поэтому мы провели компьютерный анализ последовательностей ДО для предсказания возможных регионов изгиба по методу Bolschow с помощью программы GeneQuest (пакет DNASTar99). Его результаты приведены в Рис.6. Дивергентная область *L. seymouri* содержит, как правило, более длинные изогнутые регионы, ассоциированные с определенными типами повторов. Видно, что повторы типа 1, как уже

отмечалось выпячивание, несут длинные изогнутые участки. Также видна связь изгибов с последовательностями CSB1, CSB3 (Рис 6). Последовательности изогнутой конформаций были впервые обнаружены в составе миниколец *L. tarentolae* [Marini et al, 1982]. Было показано, что изогнутая ДНК часто ассоциирована с различными регуляторными элементами, участвующими в транскрипции, репликации и других процессах [Crothers et al, 1990, Travers, 1990].

Таким образом, ДО содержит изогнутые фрагменты, входящие в определенные повторы. Возможно, изгибы играют роль в инициации транскрипции или репликации. С другой стороны, они, как и в миникольцах, могут выполнять структурную функцию в ассоциате кпДНК. По некоторым данным, именно ДО участвует в прикреплении максиколец к ассоциату. Изгибы могут играть при этом определенную роль.

При использовании праймеров LsMBF2 и 12SR6 были получены 3 ПЦР-продукта (Рис.8 и Рис.10). Следует отметить, что продукт размером 1.4kb является основным, тогда как продукты меньшего размера являются минорными. Длинный и короткий продукт были клонированы в T-вектор и секвенированы. Оказалось, что короткий продукт отличается от длинного продукта делецией участка, в котором находятся два повтора типа 1 и два повтора типа 2. В начале делеции длинного продукта находится сайт BamHI, а в коротком продукте его нет (Рис.9). На Рис.8 (расщепление рестриктазой BamHI ПЦР-продуктов) хорошо видно, что фрагмент 1.4 kb расщепился на 2 фрагмента размером 900 п.н. и 500 п.н., а короткий фрагмент не расщепился.



Аналогичное явление мы наблюдали для участка ДО, прилежащего к гену ND5 (праймеры LsND5F8 и LsXIIDRR) Два получающиеся продукта различаются делецией размером в 1 2 kb

Результат ПЦР не зависит от температуры отжига праймера (тестировали в интервале от 46°C до 53°C); при сравнение первичных структур получающихся продуктов обращает на себя внимание наличие значительного количества нуклеотидных замен

Для того, чтобы проверить не является ли такой результат следствием работы на неклонированной культуре мы получили 24 клона *L. seymouri* и поставили ПЦР с праймерами LsMBF2 и 12SR6 на ДНК этих клонов. Набор полученных по размеру продуктов одинаков для всех клонов. Пример электрофореграммы показан на Рис.10.

Таким образом, совокупность этих результатов позволяет предположить возможность присутствия в ассоциате кпДНК *L. seymouri* нескольких вариантов

ДО, причём в одной митохондрии.

Для окончательного вывода следует провести дополнительные исследования и получить более строгие доказательства.

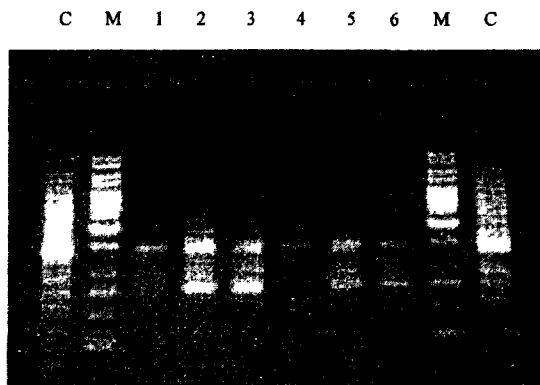


Рис.10 ПЦР с использованием праймеров LsMBF2-12SR6 на ДНК, выделенной из клональных культур *L. seymouri*. 1-6 : полученные продукты (1.4kb, 1.0kb и 750bp); C : контроль, ПЦР-продукт на кпДНК неклонированной культуры; M : маркёр, 1kb Gene Ruler.

3.2 *Leptomonas collosoma*

На рестрикционной карте максикольцевой кпДНК *L. collosoma* видно, что ДО расщепляется малым количеством рестриктаз. Мы в ДО нашли сайты расщепления только для 2 рестриктаз (SpeI, BclI). Сайты SpeI находятся только в ДО, сайты BclI находятся кроме ДО, ещё в КО. Для определения последовательности нуклеотидов участков ДО максикольцевой кпДНК *L. collosoma* мы проводили клонирование по вариантам SpeI-SpeI, BclI-BclI, SpeI-BclI (вектор pBluescriptII SK⁺) и ПЦР-продуктов CSBIIIR-12SR6 и Lca20Fi-Lca20Fi (T-вектор). Мы получили большое количество разных рекомбинантных плазмид. После секвенирования встроок этих плазмид мы дизайнировали праймеры по полученным последовательностям нуклеотидов и ставили ПЦР для получения нужных плазмид, которые содержат участки ДО

максикольцевой кпДНК. Рекомбинантные плазмиды, которые содержат участки ДО максикольцевой кпДНК, получены по следующим вариантам: 1) Clone-Lc1, Tcsb20 – ПЦР-продукт(12SR6-CSBIIIIR) и Т-вектор; 2) Clone-Lc2, A20 – 682bp по SpeI-SpeI; 3) Clone-Lc3, B6 – 331bp по SpeI-SpeI; 4) Clone-Lc4, Ta20 – ПЦР-продукт(Lca20Fi-Lca20Fi) и Т-вектор; 5) Clone-Lc5, D1-2 – 1.2kb по SpeI-SpeI; 6) Clone-Lc6, D1-22 – 1.7kb по SpeI-SpeI; 7) Clone-Lc7, D4-7 – 2.5kb по SpeI-BclI. 8) Clone-Lc8, D4-2 – 1.3kb по SpeI-BclI. (Рис.5)

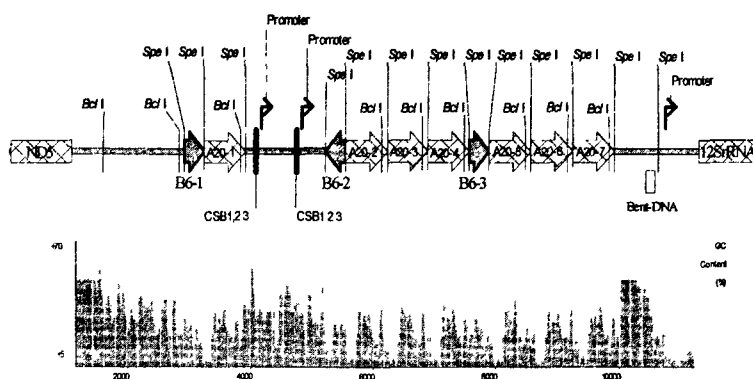


Рис 11 Организация ДО (11kb) максикольцевой кпДНК *Leptomonas collosoma*.

- A20 – GC-богатый повтор, 682bp, в ДО A20 повторяется 7 раз, они все направлены на одну сторону, внутри A20 содержится 1 короткий повтор (atatt)₅;
- B6 – GC-богатый повтор, 331bp, в ДО B6 повторяется 3 раза, они образуют инвертированные повторы;
- CSB1,2,3 – 3 консервативных блока, идентичные с миникольцевыми
- Bent-DNA – участок изогнутой спирали;
- Promoter – промоторподобный мотив АААААСТ(А)Т(А);

Длина дивергентной области *L. collosoma* составляет 11kb. В её первичной структуре обнаружено 2 типа повторов A20 и B6 (аналоги повторов типа 3 у *L. seymouri*). В каждом повторе A20 существуют короткий повтор (ATTAAT)₅. Повтор типа B6 образуют инвертированные повторы. Кроме B6, последовательности нуклеотидов плотных сайтов SpeI (ACTAGT) и BclI

(TGAATCA) в ДО тоже представляют собой инвертированные повторы. A20 и B6 образуют кластеры. Но между повторами отсутствуют AT-богатые спейсеры. (Рис.11)

Как и в ДО максикольца *L seymouri*, в ДО максикольца *L collosoma* тоже обнаружены CSB1,2,3-блоки, которые идентичны блокам КО миникольца разных видов трипаносоматид и, вероятно, выполняют функцию ориджина репликации; промотор-подобные последовательности AAAAACT(A)T(A); участки изогнутой спирали и т.д.

ДО максикольца *L collosoma* имеет сходную структурную организацию с ДО максикольца *C oncopelti*, хотя их последовательности нуклеотидов не имеют гомологии. То есть, в ДО максикольца *C oncopelti* и *L collosoma* содержатся tandemные GC-богатые повторы без AT-богатых спейсоров и инвертированные повторы.

3.3 Закономерность в организации ДО максикольцевой кпДНК.

На основании результатов данной работы можно предположить что, в организации ДО максикольцевой кпДНК у низших трипаносоматид имеется определённая закономерность . организация первичной структуры ДО максикольцевой кпДНК у исследованных видов консервативна у близкородственных видов, хотя последовательности нуклеотидов ДО у исследованных видов не имеют гомологии. Т.е. организация ДО у *L seymouri* сходна с таковой у представителей рода *Leishmania*, а ДО *L collosoma* сходна с ДО *C oncopelti*, что коррелирует с положением этих видов на филогенетическом древе.

ВЫВОДЫ

- 1 а) Максикольцевая кпДНК *L. seymouri* имеет размер 31 т.п.н., ДО – 14 т.п.н.; Максикольцевая кпДНК *L. collosoma* имеет размер 26 т.п.н., ДО – 11 т.п.н.
б) В дивергентной области максикольцевой кпДНК *L. seymouri* и *L. collosoma* обнаружены разные типы тандемных повторов, которые характерны для структуры дивергентной области максикольцевой кпДНК
в) В дивергентной области максикольцевой кпДНК *L. seymouri* и *L. collosoma* обнаружены несколько регуляторных элементов, которые важны для транскрипции и инициации репликации максикольцевой кпДНК
г) В ДО кпДНК нет протяжённых рамок считывания, у *L. seymouri* имеется ген гидовой РНК (гомолог гена gC4-IV *L. tarentolae*)
2. Есть основания предполагать, что у *L. seymouri* ДО может быть представлена несколькими вариантами, включая делеционные производные.
3. При полном отсутствии гомологии первичной структуры прослеживается общность мотивов в организации последовательности нуклеотидов ДО у филогенетически родственных видов.
- 4 По анализу редактирования пре-мРНК гена ND8, организации дивергентной области максикольцевой кпДНК, последовательности нуклеотидов 18S рРНК, последовательности нуклеотидов миникольцевой кпДНК можно предположить, что *Leptomonas collosoma* не относится к роду *Leptomonas*

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. P.N. Flegontov, Q. Guo, L.N. Ren, M.V. Strelkova, A.A. Kolesnikov. Structural Changes in the *Leishmania major* Maxicircle Divergent Region Accompany Promastigote–Amastigote Transition. Third World Congress on Leishmaniosis. April, 10-15, 2005. Sicily, Italy. P.301
2. Го Цян, Жень Лина. Характеристика дивергентной области максикольцевой кинетопластной ДНК низшей трипаносоматиды *Leptomonas seymouri*. Ломоносов-2005 – “XII международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, секция «Биология»; 12-15 апреля, 2005. Москва, Россия. С.61
3. Qiang Guo, Lina Ren, Pavel N. Flegontov, Alexander A Kolesnikov. The Kinetoplast Maxicircle Control Region Has Highly Variable Sequence but Conserved Overall Structure. 12th International Congress of Protozoology. July, 10-15, 2005. Guangzhou, China. P.73

Подписано в печать 05.10.2005
Формат 60×88 1/16. Объем 3.5 п.л.
Тираж 100 экз. Заказ № 120
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119992 г.Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к.102

№ 18 4 40

РНБ Русский фонд

2006-4

16867