

На правах рукописи

КОТНОВА Алина Петровна

**КАНОНИЧЕСКИЕ И НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
ЭНДОГЕННОГО РЕТРОВИРУСА МДГ4 (*gypsy*) В ГЕНОМЕ ДРОЗОФИЛЫ**

03. 00. 03. – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук



Москва 2005 год

Работа выполнена в лаборатории подвижности генома Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН.

Научные руководители:

академик РАН, доктор биологических наук, профессор Ю. В. Ильин.

Официальные оппоненты:

член-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор Л. И. Корочкин,

доктор биологических наук Н. А. Чуриков

Ведущая организация:

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН

Защита диссертации состоится 23 июля 2005 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д002.235.01 при Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32.

Автореферат разослан 23 мая 2005 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат химических наук



А. М. Крицын

2006-4
7205

2149604

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

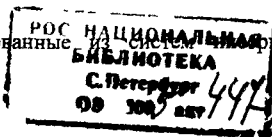
Актуальность проблемы. Мобильные генетические элементы являются важным компонентом генома эукариот. У *Drosophila melanogaster* на их долю приходится около 10% геномной ДНК. Взаимодействие мобильных элементов с геномом клетки носит сложный характер: они могут встраиваться в различные участки клеточных генов (в их экзонные, интронные и регуляторные последовательности), что в большей или меньшей степени сказывается на экспрессии этих генов; в свою очередь клетка контролирует транспозиции мобильных элементов, препятствуя их активному перемещению.

Элемент МДГ4 (в англоязычной литературе известный как *gypsy*) – один из наиболее изученных ретротранспозонов дрозофилы. Особенности его структуры и инфекционные свойства позволяют говорить о МДГ4 как об эндогенном ретровирусе беспозвоночных. Подобно ретровирусам, он содержит три открытые рамки считывания (ОРС), а цикл его транспозиции проходит через стадию обратной транскрипции. Несмотря на то, что эндогенные ретровирусы являются предметом пристального внимания исследователей, в настоящий момент очень мало известно об их генетическом взаимодействии с организмом-хозяином. Это обусловлено тем, что обычно в роли хозяина выступают позвоночные – трудные объекты для генетического анализа. Присутствие ретротранспозона МДГ4 в геноме классического модельного объекта *D. melanogaster* дает уникальную возможность для детального изучения взаимоотношений ретровируса и клетки.

Ранее было показано существование двух подсемейств ретротранспозона, имеющих чёткие структурные различия и отличающихся друг от друга способностью к перемещениям. Эти подсемейства получили условные названия «активное» и «неактивное».

«Активный» и «неактивный» варианты МДГ4 различаются на уровне рестриктивных карт. В частности, наличие сайтов *HindIII* (4483), *MluI* (5335) и *Clal* (6939) является характерной особенностью «активного» подсемейства. По всей видимости, «активный» вариант МДГ4 является эволюционно более молодым и образовался в результате постепенного накопления точечных мутаций, затрагивающих «неактивный» вариант. Предполагается, что первым появился рестрикционный сайт *MluI*, затем - *Clal* и, наконец, - *HindIII*. Такая последовательность событий подтверждается результатами рестрикционного анализа геномной ДНК 20 исследованных линий мух. Исключением является линия Г32. В этой линии присутствуют варианты МДГ4, которые содержат сайт *HindIII*, но не содержат сайтов *MluI* и/или *Clal*.

Известно, что все копии МДГ4, клонированные из системного транскрипта



мутагенеза, содержали в кодирующей части сайт рестрикции *HindIII* (4483), что позволило рассматривать его как маркер на принадлежность к «активному» подсемейству. В то же время, было показано, что участок, влияющий на ретротранспозиционную активность, расположен между сайтами рестрикции *PvuII* (2733) и *KpnI* (3127). Замещения этого участка в «неактивном» варианте соответствующим участком из «активного» достаточно для повышения ретротранспозиционной активности такого варианта МДГ4 в культуре клеток, несмотря на отсутствие у такой копии сайта рестрикции *HindIII* (4483). Таким образом, присутствие необычных копий в линии Г32 вызывает особый интерес. Можно предположить, что они образовались в результате рекомбинационных процессов, затрагивающих «активный» и «неактивный» варианты, однако нельзя исключить вероятность того, что они относятся к новому, ранее неизвестному подсемейству МДГ4 (*gypsy*).

Цель и задачи исследования.

Целью данной работы явилось изучение структурных особенностей различных вариантов ретротранспозона *D melanogaster* МДГ4 в геноме линии Г32. Данное исследование было предпринято в рамках изучения возможных механизмов эволюции ретротранспозона МДГ4.

В соответствии с целью в работе были поставлены следующие задачи:

- Клонировать ДНК из линии Г32 *D melanogaster*, используя в качестве вектора бактериофаг λ GEM11.
- Провести скрининг геномной библиотеки линии Г32 и отобрать клоны, имеющие гомологию с последовательностью МДГ4 (*gypsy*).
- Используя метод Саузерн-блот гибридизации, провести предварительный анализ выявленных клонов на предмет их соответствия различным областям МДГ4 (*gypsy*).
- Провести детальный структурный анализ клонов, содержащих полноразмерный МДГ4 (*gypsy*), включая секвенирование функционально значимых участков.
- Провести рестрикционный анализ клонов, содержащих последовательности, существенно отличающиеся от канонических.
- Исследовать представленность в геноме дрозофилы неканонических полноразмерных ретротранспозонов, имеющих существенную гомологию с последовательностью МДГ4 (*gypsy*).

Научная новизна и практическая ценность работы.

В настоящей работе клонированы из генома *D melanogaster* и охарактеризованы 28 различных последовательностей, имеющих гомологию с МДГ4.

Среди них выявлено 4 полноразмерных копии этого ретротранспозона, две из которых принадлежат к «активному» подсемейству, одна – к «неактивному»; еще одна копия оказалась гибридной. У гибридного варианта присутствует сайт рестрикции *HindIII* в положении 4483, наличие которого характерно для всех копий «активного» подсемейства, клонированных из систем инсерционного мутагенеза, однако отсутствуют, как у «неактивных» копий, рестрикционные сайты *MluI* (5335) и *Clal* (6939). Определение нуклеотидной последовательности функционально важного для ретротранспозиционной активности МДГ4 района, расположенного между сайтами рестрикции *PvuII* (2733) и *KpnI* (3127), показало, что у гибридного варианта она полностью соответствует последовательности «неактивных» копий. Можно предположить, что гибридный вариант возник в результате рекомбинационных процессов между «активной» и «неактивной» копиями, однако нельзя исключать вероятность того, что уникальность обнаруженной копии не ограничивается рестрикционной картой, и мы имеем дело с ранее неизвестным подсемейством МДГ4 (*gypsy*).

Впервые были клонированы 4 копии нового неизученного мобильного элемента *gtwin*, входящего в группу *Gypsy* ретротранспозонов. Этот мобильный элемент, имеющий три открытые рамки считывания (ОРС), был открыт *in silico* в начале 2000-х годов. Проведен сравнительный структурный анализ МДГ4 и *gtwin*, показана их высокая гомология в области второй и третьей ОРС. Особенно интересным представляется тот факт, что наибольшая степень гомологии – до 77% как для нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей этих двух элементов – наблюдается в районе третьей ОРС. Последовательность ОРС3 ретротранспозонов гомологична ретровирусному гену *env*, кодирующему компоненты, ответственные за взаимодействие вирусной частицы с мембранными рецепторами клетки. Роль гена *env* эрантивирусов дрозофилы до настоящего времени остается неясной. Наиболее привлекательной кажется гипотеза о том, что продукт третьей рамки обеспечивает способность эрантивирусов к горизонтальному переносу и является аналогом *env* ретровирусов позвоночных. Для ретротранспозона дрозофилы МДГ4 (*gypsy*) была прямо показана инфекционность образованных им частиц. Высокая гомология генов *env* МДГ4 и *gtwin* позволяет предположить, что открытый недавно ретротранспозон *gtwin* также обладает инфекционными свойствами.

Исследованы особенности структурной организации третьей ОРС ретротранспозона *gtwin*, выявлено два варианта этого мобильного элемента, различающихся наличием или отсутствием стоп-кодона в середине третьей ОРС.

Изучено распределение копий ретротранспозона *gtwin* в геноме рода *Drosophila*. Показано, что в геноме *D. virilis* и *D. hydei* копии этого мобильного элемента отсутствуют.

В геноме *D. melanogaster* ретротранспозон *gtwin* представлен небольшим числом копий (2-6), обнаружена лишь одна линия (Г32), в геноме которой присутствует свыше 20 копий этого мобильного элемента. В культуре клеток ретротранспозон *gtwin* сильно амплифицирован.

Полученные результаты открывают широкие возможности для дальнейших исследований эволюционных взаимоотношений в группе *Gypsy* ретротранспозонов и способности мобильных элементов МДГ4 и *gtwin* к горизонтальному переносу. Особый интерес представляют дальнейшие исследования линии Г32, в которой ретротранспозон *gtwin* значительно амплифицирован.

Апробация результатов. Материалы диссертации были представлены на ежегодных отчетных конференциях аспирантов ИМБ РАН (2002, 2003, 2004 г.) и на XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005» (Москва, апрель 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы. Библиография включает в себя 82 источников. Работа проиллюстрирована 15 рисунками и 3 таблицами.

Результаты и обсуждение

1. Скрининг геномной библиотеки линии Г32 *Drosophila melanogaster*

Для создания библиотеки геномную ДНК мух обрабатывали специфической рестрикционной эндонуклеазой *Bam*HI, поскольку канонические последовательности МДГ4 не содержат сайтов узнавания этой рестрикционной эндонуклеазы. Полученные фрагменты лигировали с вектором λ GEM11, также обработанным *Bam*HI. Рост родительских бактериофагов эффективно подавлялся при размножении библиотеки на штамме *E. coli* XL1-Blue MRA, лизогенном по бактериофагу P2.

При первичном скрининге библиотеки методом Саузерн-блот гибридизации было проанализировано не менее 45000 рекомбинантных фагов. Этой выборки достаточно, чтобы охватить почти все уникальные последовательности геномной ДНК дрозофилы. В качестве зонда при гибридизации был использован фрагмент ДНК МДГ4 *Xho*I – *Xho*I (Рис.1, зонд 1), содержащий полную последовательность ретротранспозона. Это позволило отобрать как полноразмерные, так и делетированные геномные копии МДГ4, за исключением элементов, последовательность ДНК которых содержит сайты рестрикции *Bam*HI.

При скрининге геномной библиотеки линии Г32 *D. melanogaster* было отобрано 28 уникальных клонов, имеющих гомологию с последовательностью МДГ4. Мы полагаем, что нам удалось практически полностью проанализировать геном линии Г32, поскольку многие из гибридизующихся со специфическим зондом клонов были отобраны нами в нескольких повторностях.

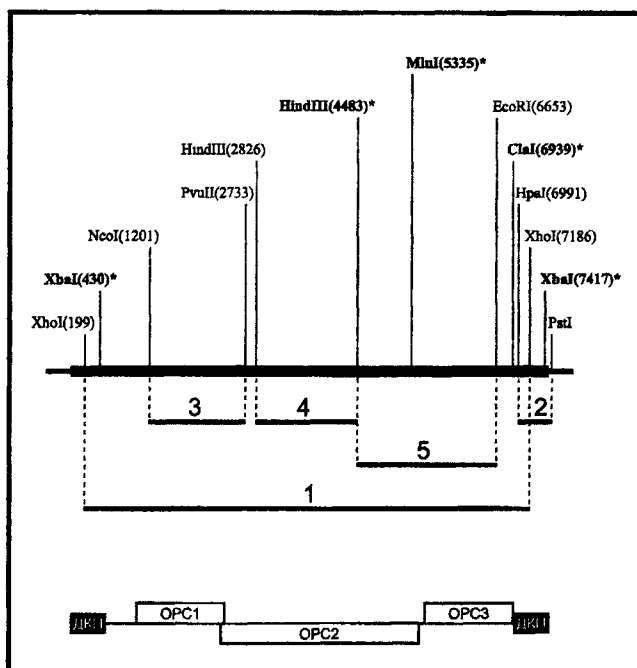


Рис. 1. Строение ретротранспозона МДГ4 (*gypsy*).

Показана рестрикционная карта мобильного элемента. Звездочкой отмечены сайты рестрикции, отсутствующие в "неактивной" копии. Цифры в скобках обозначают порядковый номер нуклеотида в последовательности МДГ4 (соответствуют первому нуклеотиду в узнаваемой ферментом последовательности). Линиями под рестрикционной картой обозначены зонды, использованные при проведении Саузерн-блот гибридизации. Ниже представлена схема строения МДГ4, указаны длинные концевые повторы (ДКП) и открытые рамки считывания (ОРС).

2. Структурный анализ отобранных клонов

2.1. Выявление полноразмерных копий МДГ4

Для выявления клонов, содержащих полноразмерные копии МДГ4, был проведен Саузерн-блот анализ ДНК, выделенной из этих клонов.

ДНК рекомбинантных бактериофагов была обработана специфической рестрикционной эндонуклеазой *XhoI*, поскольку ее сайты содержатся только в ДКП ретротранспозона. Фрагменты, соответствующие полноразмерным копиям, выявляли

гибридизацией с меченным ^{32}P фрагментом ДНК *HpaI-PstI* (рис. 1, зонд 2), содержащим ДКП ретротранспозона. Полноразмерным копиям, имеющим два концевых повтора, при гибридизации с зондом *HpaI-PstI* соответствуют три полосы на радиоавтографе (см рис.2).

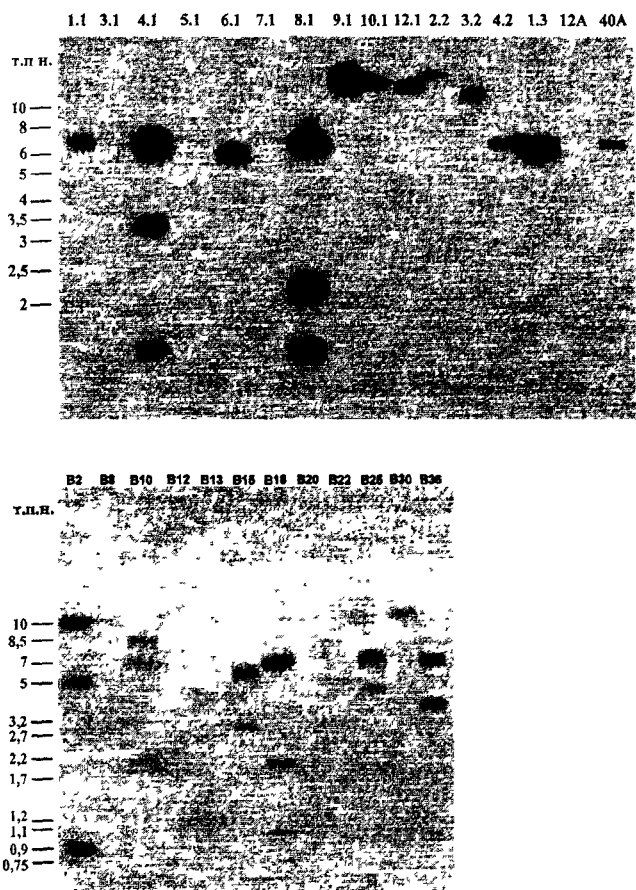


Рис. 2. Результаты Саузерн-блот гибридизации.

ДНК, выделенную из рекомбинантных бактериофагов (номера дорожек соответствуют номерам клонов), обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой *XhoI*. В качестве зонда использовали ^{32}P -меченный фрагмент ДНК МДГ4 *HpaI - PstI* (зонд 2, рис 1)

Одна из них – «тело» МЭ - составляет около 7 т.п.н., а две другие, соответствующие фрагментам ДКП с прилегающими к ним последовательностями геномной ДНК дрозофилы, варьируют по длине.

Фрагменты, соответствующие полноразмерным копиям, были выявлены только для 4 клонов (4.1, 8.1, B10, B18). Остальные клоны содержат последовательности, существенно отличающиеся от канонических МДГ4.

2.2. Структурный анализ полноразмерных копий МДГ4,

клонированных из линии Г32

2.2.1. Рестрикционный анализ полноразмерных копий МДГ4

Для определения принадлежности полученных копий МДГ4 к «активному» или «неактивному» подсемейству, был проведен рестрикционный анализ этих клонов с последующей Саузерн-блот гибридизацией. Так как все копии элемента, принадлежащие к «активному» подсемейству, содержат факультативные сайты рестрикции *HindIII* (4483), *MluI* (5335), *ClaI* (6939) и *XbaI* (430, 7417), их использовали как молекулярные маркеры на выявление «активных» копий. Для облегчения проведения рестрикционного анализа рекомбинантные вставки были переклонированы по сайтам рестрикции *BamHI* из фага λ в плазмидный вектор *pBluescript II SK (-)* ("Fermentas")

ДНК рекомбинантных бактериофагов обрабатывали рестрикционными эндонуклеазами в следующих комбинациях: 1) *XhoI-HindIII*, 2) *XhoI-MluI*, 3) *XhoI-ClaI*, 4) *XhoI-XbaI*. Фрагменты, соответствующие «активному» варианту МДГ4, выявляли гибридизацией со специфическим ДНК-зондом *HindIII-EcoRI* (Рис. 1, зонд 5) в случае первых трех комбинаций, с зондом *HpaI-PstI* (Рис. 1, зонд 2) – в случае четвертой. На основании проведенного анализа можно считать копию, находящуюся в клоне 4.1, «неактивной», а копии, присутствующие в клонах 8.1 и B18 – «активными», поскольку они содержат факультативные сайты рестрикции *HindIII*, *MluI*, *ClaI* и *XbaI*. Особый интерес вызывает копия, содержащаяся в клоне B10. В ней присутствуют сайты рестрикции *HindIII* в положении 4483 и *XbaI* в обоих ДКП, но отсутствуют факультативные сайты *MluI* и *ClaI*. Ранее было показано, что эволюция «неактивного» варианта МДГ4, по-видимому, шла за счет накопления точечных мутаций, в результате чего сначала появился факультативный сайт рестрикции *MluI* (5335), затем *ClaI* (6939) и только потом *HindIII* (4483). Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что в эволюции мобильных элементов важную роль играют также рекомбинационные процессы, и копия B10 возникла в результате рекомбинации между «активным» и «неактивным» вариантами МДГ4.

2.2.2. Секвенирование функционально важного для ретротранспозиционной активности района полноразмерных копий МДГ4, клонированных из линии Г32

Функционально важный для ретротранспозиционной активности МДГ4 участок расположен между сайтами рестрикции *PvuII* (2733) и *KpnI* (3127). В этом районе

«активная» копия отличается от «неактивной» пятью нуклеотидными заменами, три из которых приводят к двум заменам аминокислот: *Thr - Asn* (нуклеотид в положении 2928) и *Lys - Arg* (нуклеотиды в положении 3107, 3108).

Для сравнения нуклеотидной последовательности района *PvuII/KpnI* «активных» (клоны 8.1 и B18), «неактивной» (клон 4.1) и необычной (клон B10) копий МДГ4 из линии Г32 с описанными ранее «активным» и «неактивным» вариантами, проводили их частичное секвенирование. В качестве праймера использовали последовательность 5'-гаа тас саг гgc атс gct г-3', комплементарную области 2696-2714 ретротранспозона МДГ4. При сравнении полученных нуклеотидных последовательностей с описанными ранее использовали программу BLAST, доступную в Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Проведенный анализ показал, что нуклеотидная последовательность района *PvuII/KpnI* у клонов 8.1 и B18 полностью соответствует последовательности ранее описанного «активного» варианта; у клонов 4.1 и B10 - последовательности «неактивного».

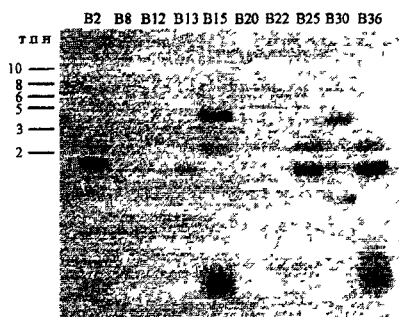
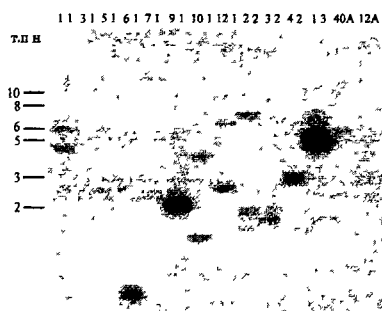
2.3. Исследование структуры неканонических клонов, имеющих гомологию с МДГ4

2.3.1. Саузерн-блот анализ неканонических клонов

Из 28 клонов, имеющих гомологию с последовательностью МДГ4, только 4 содержали его полноразмерные копии.

Для проведения структурного анализа, ДНК остальных клонов обрабатывали рестрикционными эндонуклеазами *XhoI* и *HindIII*. Рестрикционные фрагменты разделяли электрофорезом в агарозном геле. ДНК переносили на нейлоновый фильтр и гибридизовали с мечеными ³²P фрагментами ДНК, практически полностью перекрывающими последовательность МДГ4 (Рис 1): 1) зонд 2 - *HpaI-PstI* (ДКП), 2) зонд 3 - *NcoI-PvuII* (область гена *gag*), 3) зонд 4 - *HindIII-HindIII* (частично область гена *pol*), 4) зонд 5 - *HindIII-EcoRI* (частично область гена *pol* -- область гена *env*). Результаты Саузерн-блот гибридизации приведены на рис. 3 и суммированы в табл.1.

а)



б)

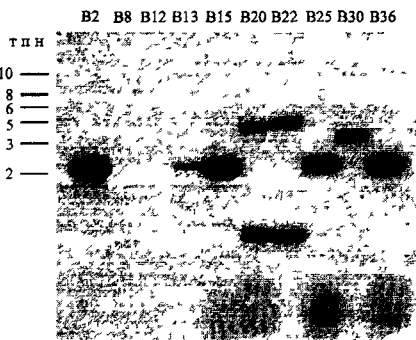
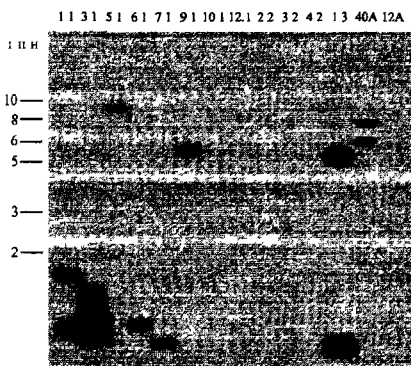


Рис. 3. Результаты Саузерн-блот гибридизации.

ДНК, выделенную из рекомбинантных бактериофагов (номера дорожек соответствуют номерам клонов), обрабатывали рестрикционными эндонуклеазами *HindIII* и *XhoI*. В качестве зонда использовали ^{32}P -меченые фрагменты МДГ4: а) *HpaI-PstII* (зонд 2, рис. 1), б) *NcoI-PvuII* (зонд 3, рис. 1).

в)

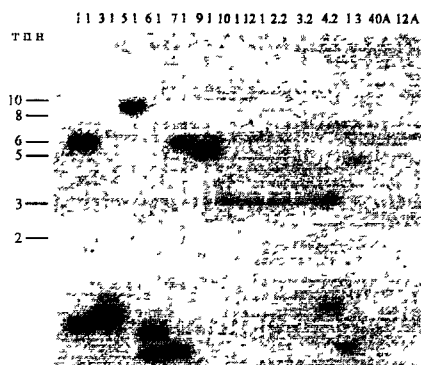


Таблица 1. Результаты Саузерн-блот-гибридизации ДНК, выделенной из рекомбинантных клонов бактериофага λ , со специфическими ДНК-зондами. "+" – значительная гибридизация, "+/-" – слабая гибридизация, "-" – отсутствие гибридизации с соответствующим ДНК-зондом

№ клона	Гибридизация с фрагментом <i>HpaI-PstII</i> (зонд 2)	Гибридизация с фрагментом <i>NcoI-PvuII</i> (зонд 3)	Гибридизация с фрагментом <i>HindIII-HindIII</i> (зонд 4)	Гибридизация с фрагментом <i>HindIII-EcoRI</i> (зонд 5)
1.1	+	+	+	+
6.1	+	+	+	+
9.1	+	+	+	+
1.3	+	+	+	+/-
B2	+	+	+	+
B13	+	+	+	+
B15	+	+	+	+
B25	+	+	+	+
B30	+	+	+	+/-
B36	+	+	+	+
40A	+	+	-	+
4.2	+	-	+	+
12A	+/-	-	-	+/-
10.1	+	-	+	+
12.1	+	-	+	+
2.2	+	-	+	+
3.2	+	-	+	+
5.1	-	+	+	+
7.1	-	+	+	+
3.1	-	+	+	-
B8	-	+/-	-	-
B12	-	-	-	+
B20	-	+	-	-
B22	-	+	-	-

Как видно из таблицы, клоны, содержащие неканонические последовательности МДГ4, можно разделить на 5 групп.

К первой, наиболее многочисленной, относятся последовательности 10-ти клонов (1.1, 6.1, 9.1, 1.3, B2, B13, B15, B25, B30, B36), имеющих гомологию со всеми использованными зондами. Строение этих вариантов значительно отличается от канонических полноразмерных копий МДГ4. Сюда же можно отнести клон 40A, не

гибридирующий с фрагментом МДГ4 *HindIII-HindIII* (зонд 4). По всей видимости, эта копия подверглась делеционным перестройкам

Во вторую группу входят клоны, имеющие гомологию только с 3' концом МДГ4 (4 2, 12A) Исходя из результатов гибридизации, мы предположили, что эти клоны имеют лишь один длинный концевой повтор: 3'-ДКП. Такие варианты могли образоваться в результате встраивания в последовательность МДГ4 других мобильных элементов.

Особый интерес у нас вызвали клоны 10 1, 12.1, 2 2 и 3.2, результаты гибридизации которых с использовавшимися ДНК-зондами оказались схожими, но в то же время значительно отличались от ранее описанных вариантов МДГ4. На основании этого мы решили выделить их в отдельную группу.

Четвертая группа представлена клонами, у которых отсутствует гомология с последовательностью ДКП, но присутствуют последовательности, гомологичные всем трем ОРС МДГ4 (5.1, 7.1).

К пятой группе относятся клоны, гибридизующиеся лишь с одним-двумя использованными зондами, содержащими последовательности ОРС ретротранспозона (3.1, B8, B20, B22) По всей видимости, эти варианты являются следствием древних транспозиций МДГ4 в гетерохроматин, где копии этого элемента потеряли способность к перемещениям и подверглись значительным структурным перестройкам.

2.3.2. Рестрикционный анализ неканонических клонов

Для проведения более детального структурного анализа неканонических клонов проводили их рестрикционный анализ. Рекombинантные вставки переклонировали по сайтам рестрикции *BamHI* из фага λ в плазмидный вектор *pBluescript II SK (-)* ("Fermentas") и обрабатывали специфическими рестрикционными эндонуклеазами *Clal*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *XbaI*, и *XhoI* в различных сочетаниях. Рестрикционные фрагменты разделяли электрофорезом в агарозном геле, переносили на лейконовый фильтр и гибридизовали с мечеными ^{32}P фрагментом ДНК МДГ4 *XhoI* – *XhoI* (Рис.1, зонд 1), содержащим полную последовательность ретротранспозона. На основании полученных данных были построены рестрикционные карты 24 клонов, содержащих неканонические последовательности МДГ4, после чего было проведено их частичное секвенирование в районах, имеющих гомологию с МДГ4.

Результаты проведенного структурного анализа показали, что большинство клонов содержат последовательности, имеющие гомологию с МДГ4, но значительно отличающиеся по своему строению от полноразмерного элемента. По всей видимости, эти клоны содержат сильно дивергировавшие копии из гетерохроматических и прицентромерных областей генома *D. melanogaster*. Несмотря на это, несомненно,

представляет интерес их дальнейшее исследование. Такие копии, потерявшие способность к ретротранспозиции и постепенно накапливающие мутации в гетерохроматине, не подвергаются элиминирующему действию отбора. В результате рекомбинации между собой или с полноразмерными копиями, эти варианты способны образовывать новые, в том числе и активно перемещающиеся подсемейства мобильных элементов. Тем не менее, в данной работе мы решили сосредоточиться на характеристике канонических и неканонических полноразмерных вариантов МДГ4, поэтому особый интерес у нас вызвали клоны 10.1, 12.1, 2.2 и 3.2, которые еще в процессе Саузерн-блот анализа давали сходные между собой результаты, но значительно отличающиеся в то же время от «активного» и «неактивного» подсемейств МДГ4.

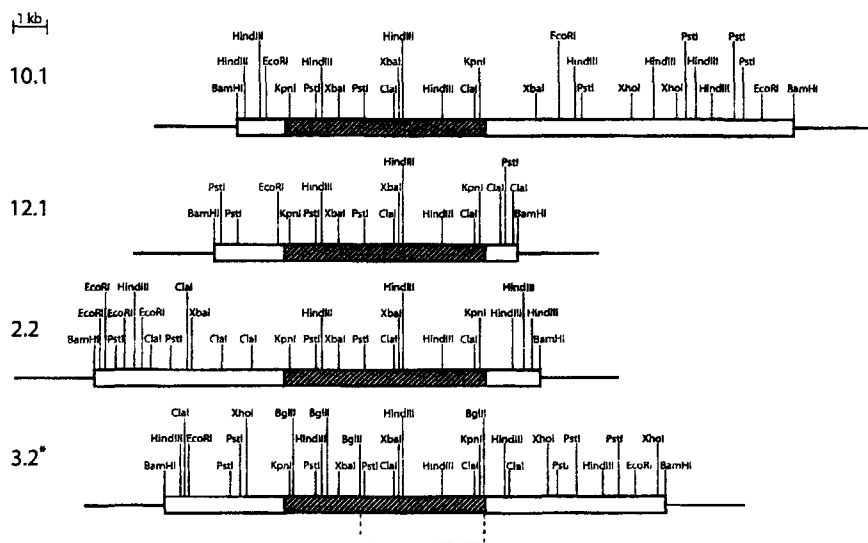


Рис. 4. Рестрикционные карты клонов 10.1, 12.1, 2.2, 3.2.

* для клона 3.2 дополнительно построена рестрикционная карта по *BglII*. Линией под картой клона 3.2 обозначен клонированный в составе вектора *pBluescript II SK (-)* и частично отсекавшийся фрагмент.

Построенные рестрикционные карты этих клонов оказались одинаковыми на протяжении более 7 т.п.н. (см. рис.4), однако не совпадали с рестрикционными картами обоих подсемейств МДГ4. Это позволило предположить, что мы имеем дело с каким-то другим, родственным ему мобильным элементом.

2.3.3. Идентификация клонированного мобильного элемента

Для определения природы клонированного нами мобильного элемента, мы провели частичное секвенирование общей для всех четырех клонов области. Для этого в составе плазмидного вектора *pBluescript II SK (-)* ("Fermentas") был клонирован фрагмент из клона 3.2. ДНК этого клона обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой *BglII*. Рестрикционные фрагменты разделяли электрофорезом в агарозном геле, выделяли фрагмент размером 4,7 т.п.н. (см. рис. 4) и лигировали с вектором, обработанным рестрикционной эндонуклеазой *BamHI*. Полученную конструкцию секвенировали с плазмидных праймеров T3 и T7 и анализировали нуклеотидную последовательность с помощью программы BLAST.

В базе данных генома дрозофилы была обнаружена последовательность, в которой отсеквенированный нами участок клона 3.2 повторяется дважды через примерно 7 т.п.н. Мы предположили, что этот фрагмент содержит длинный концевой повтор (ДКП) клонированного нами неизвестного мобильного элемента, а найденная последовательность, заключенная между двумя предполагаемыми ДКП, является его кодирующей областью. С помощью компьютерной программы *Vector NTI* для обнаруженной в базе данных генома дрозофилы последовательности размером свыше 7 т.п.н. была построена рестрикционная карта. Она полностью совпала с построенной нами экспериментальным путем картой общего для клонов 10.1, 12.1, 2.2 и 3.2 участка. Компьютерный анализ с применением программы *Vector NTI* показал, что мы имеем дело с мобильным элементом, содержащим три ОРС и имеющим на концах полностью идентичные друг другу ДКП.

Благодаря осуществлению проекта «Геном дрозофилы» появились широкие возможности для исследования *in silico* генов, регуляторных областей и повторяющихся элементов *D. melanogaster*. В последние годы опубликовано несколько работ, посвященных изучению эволюционных взаимоотношений разных классов мобильных элементов. При этом две группы ученых независимо друг от друга обнаружили в геноме *D. melanogaster* несколько ранее неизвестных мобильных элементов. При анализе имеющихся данных выяснилось, что мобильный элемент, клонированный нами из генома линии Г32 – это открытый *in silico* ретротранспозон *gtwin* (*hamilton*), принадлежащий к группе *Gypsy* ДКП-ретротранспозонов.

3. Ретротранспозон *gtwin*

3.1. Сравнительный анализ структурной организации ретротранспозонов МДГ4 и *gtwin*

Ретротранспозон *gtwin*, входящий в группу *Gypsy* ДКП-ретротранспозонов,

содержит три ОРС, кодирующие *gag*, *pol* и *env*-подобные белки. Из всех представителей этой многочисленной группы ретроэлементов *gtwin* наиболее близок хорошо изученному эндогенному ретровирусу МДГ4 (*gypsy*) *D. melanogaster*.

С помощью программы BLAST мы сравнили аминокислотные последовательности трех полипептидов, кодируемых этими двумя элементами. На всем протяжении они хорошо выравниваются между собой.

В области гена *gag* гомология между МДГ4 и *gtwin* составляет 53%. Высокой гомологией (76%) отличается область гена *pol*, продукты которого (протеаза, обратная транскриптаза, рибонуклеаза H, интеграза) играют ключевую роль в процессе ретротранспозиции. Интересным представляется тот факт, что для гена *env* гомология между двумя элементами достигает 77%. Как правило, у разных ретроэлементов отличия в последовательности третьей ОРС значительно выше.

Сравнение нуклеотидных последовательностей МДГ4 и *gtwin* методом выравнивания также показало, что наибольшая степень гомологии – свыше 75% – наблюдается во второй и третьей ОРС. Гораздо слабее гомология в области гена *gag*. Лишь в отдельных участках первой ОРС она превышает 50%. ДКП, не кодирующие белковых продуктов, как и следовало ожидать, являются наименее консервативными районами мобильных элементов. Сходство нуклеотидных последовательностей ДКП ретротранспозонов *gtwin* и МДГ4 невелико, их трудно выровнять между собой на значительном протяжении.

Как известно, ретротранспозон МДГ4 имеет сложно организованную лидерную область, расположенную после 5' ДКП. Предполагается, что эта область (инсулятор) действует как позитивный регулятор транскрипции МДГ4. При сравнении мы не нашли в нуклеотидной последовательности мобильного элемента *gtwin* значительной гомологии с инсулятором МДГ4.

3.2. Исследование структуры третьей открытой рамки считывания ретротранспозонов *gtwin*, клонированных из линии Г32

При анализе содержащейся в базе данных генома дрозофилы нуклеотидной последовательности ретротранспозона *gtwin* (AC006215 и AC107326) мы обнаружили, что последовательность гена *env* элементов прерывается в ее середине стоп-кодоном (позиция 6117-6119 нуклеотидной последовательности *gtwin*). Мы решили исследовать на наличие терминирующего кодона в этой области копии *gtwin*, клонированные нами из генома линии Г32 *D. melanogaster*. Для этого мы провели частичное секвенирование последовательности гена *env* всех четырех копий. В качестве праймера использовали последовательность 5'-tgc-tgt-cgg-act-gaa-gaa-c-3', комплементарную области 6184-6166

ретротранспозона *gtwin*. Проведенный анализ показал, что все четыре клонированные копии из линии Г32 не содержат стоп-кодона в положении 6117-6119 (триплет ТАА заменен на ГАА). Таким образом, можно говорить о существовании двух разновидностей мобильного элемента *gtwin*, различающихся наличием или отсутствием терминирующего кодона в середине их третьей ОРС.

3.3. Распределение копий ретротранспозона *gtwin* в линиях дрозофилы

Bowen и McDonald обнаружили в геноме *D. melanogaster* две копии мобильного элемента *gtwin*, расположенные tandemно и соединенные общим ДКП. Мы провели дополнительный поиск копий этого ретротранспозона в базе данных генома дрозофилы. Помимо ранее описанных (AC006215), мы нашли еще одну копию *gtwin* в X-хромосоме *D. melanogaster* (AC107326). По всей видимости, мобильный элемент *gtwin* представлен в эухроматических районах генома небольшим числом копий. Мы решили проверить это предположение экспериментальным путем, а также провести поиск ретротранспозона *gtwin* в геномах других видов рода *Drosophila*.

Для исследования распределения копий элемента *gtwin* в линиях рода *Drosophila* были выбраны 4 линии *D. virilis*, 1 линия *D. hydei* и 11 линий *D. melanogaster*, которые представлены как старыми лабораторными линиями, так и недавно изолированными из природных популяций (Табл.2).

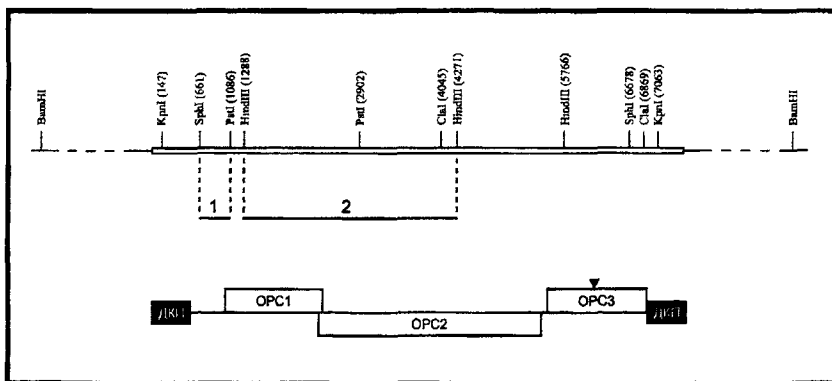


Рис.5. Строение ретротранспозона *gtwin*.

Показана рестрикционная карта мобильного элемента. Линиями под рестрикционной картой обозначены зонды, использованные при проведении Саузерн-блот гибридизации. Ниже представлена схема строения *gtwin*, указаны длинные концевые повторы (ДКП) и открытые рамки считывания (ОРС). Стрелкой обозначено положение факультативного терминирующего кодона.

Табл. 2. Некоторые характеристики линий дрозофилы, использованных в эксперименте.

№	Вид <i>Drosophila</i>	Линия	Происхождение линии	Генетические маркеры	Источник получения линии
1	<i>melanogaster</i>	Г32	Лабораторная линия, изолированная из природной популяции Гваделупы в 1995г	Дикий тип	Коллекция кафедры генетики МГУ им. Ломоносова
2	<i>melanogaster</i>	FM4	Лабораторная линия	FM4y ^{1d} sc [*] B/Df(1)Pg ^d *K2	Коллекция ИБГ РАН
3	<i>melanogaster</i>	xx/y	Старая лабораторная линия	C(1)RM,y	Коллекция ИМБ РАН
4	<i>melanogaster</i>	BL3127	Получена из <i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>	Df(3L)n-79c/TM3,Sb[1]	Коллекция ИБГ РАН
5	<i>melanogaster</i>	BL2400	Получена из <i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>	Df(3L)RG7rho[ve1]/TM6	Коллекция ИБГ РАН
6	<i>melanogaster</i>	SS	Старая лабораторная линия, изогенизирована более 30 лет назад	w	Коллекция кафедры генетики МГУ им. Ломоносова
7	<i>melanogaster</i>	CantonS	Старая лабораторная линия изогенизирована более 50 лет назад	Дикий тип	Коллекция ИБГ РАН
8	<i>melanogaster</i>	Нальчик	Линия изолирована из природной популяции Нальчика в 1999г.	Дикий тип	Коллекция ИБГ РАН
9	<i>melanogaster</i>	Звенигород	Линия изолирована из природной популяции Звенигорода в 1999г.	Дикий тип	Коллекция ИБГ РАН
10	<i>melanogaster</i>	Df(1)	Старая лабораторная линия	y,w	Коллекция ИМБ РАН
11	<i>melanogaster</i>	140GFP	Лабораторная линия	FM7 i, P{w ⁺ mC=Act GFP}J MR3/C(1) D _x , f	Коллекция ИМГ РАН
12	<i>hydei</i>	Odessa	Линия изолирована из природной популяции Одессы	Дикий тип	Коллекция ИМБ РАН
13	<i>virilis</i>	9	Старая лабораторная линия, изолированная из природной популяции Батуми в 1970г	Дикий тип	Коллекция ИМБ РАН
14	<i>virilis</i>	40	Старая лабораторная линия, изолированная из природной популяции Ташкента в 1970г.	Дикий тип	Коллекция ИМБ РАН
15	<i>virilis</i>	T-53	Лабораторная линия, изолированная из природной популяции Ташкента в 1998г.	Дикий тип	Коллекция ИМБ РАН
16	<i>virilis</i>	101	Старая лабораторная линия, изолированная в Японии	Дикий тип	Коллекция ИМБ РАН

Мы также исследовали распределение копий *gtwin* в геноме культуры клеток *D melanogaster* линии *Schneider*. Геномную ДНК, выделенную из мух и культуры клеток, обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой *HindIII*. Известно, что в геноме дрозофилы содержится значительное число сайтов рестрикции *HindIII*, в то же время мы точно знаем, как расположены *HindIII*-сайты внутри мобильного элемента *gtwin*.

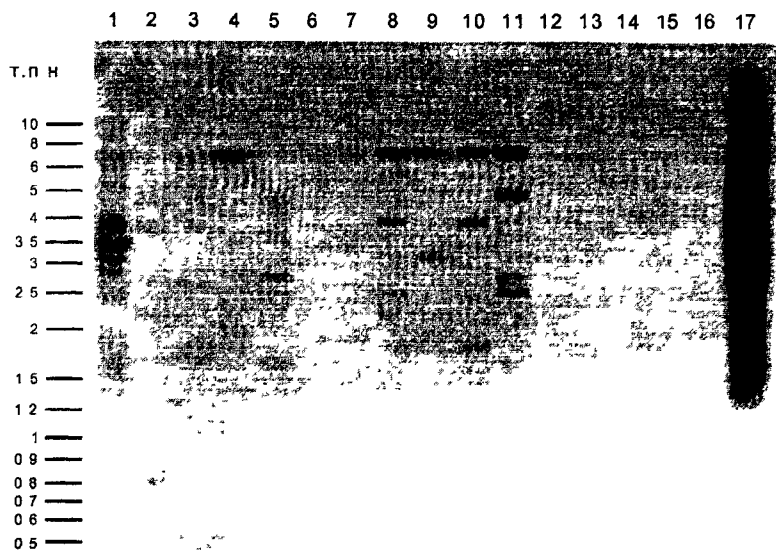
В качестве зонда мы использовали меченый ^{32}P рестрикционный фрагмент ДНК из лидерной области мобильного элемента *gtwin* *SphI*(661)-*PstI*(1086), не имеющий заметной гомологии с последовательностью МДГ4 (рис.5, зонд 1). Так как расстояние от сайта *HindIII*(1288) в теле мобильного элемента до сайта узнавания этой же рестрикционной эндонуклеазой, расположенного в геномном окружении элемента со стороны его 5'-конца, различно для каждой копии *gtwin*, можно оценить количество копий ретротранспозона, содержащихся в геноме каждой линии.

Как видно из рис.6А, мобильный элемент *gtwin* обнаруживается в геноме всех исследованных линий *D melanogaster* (Рис.6А, дорожки 1-11). В геноме *D virilis* и *D hydei* не удастся выявить копий этого ретротранспозона (Рис.6А, дорожки 12-16). Следует также отметить, что в соответствии с рестрикционной картой *gtwin* все гибридизующиеся фрагменты ДНК имеют длину не менее 1,3 т.п.н.

Линии *D melanogaster* различаются по количеству содержащихся в геноме копий элемента. Большинство из них содержит 2-6 копий. Исключением является линия Г32 (Рис 6А, дорожка1), в которой *gtwin* амплифицирован. Наличие большого числа копий с различным геномным окружением в линии Г32 свидетельствует о том, что, по крайней мере, в недавнем прошлом *gtwin* активно перемещался в ее геноме.

На радиоавтографе присутствует общая для большинства линий полоса, соответствующая размеру около 7 т.п.н. Исключение составляют линии FM4 (Рис.6А, дорожка 2) и BL2400 (Рис.6А, дорожка 5). По-видимому, в геноме разных линий *D melanogaster* существует копия мобильного элемента *gtwin* в одинаковом геномном окружении. Можно по-разному объяснить наличие в геноме разных линий *D melanogaster* такой копии. Во-первых, это может быть следствием древней транспозиции, произошедшей до того, как изучаемые линии эволюционно разошлись. Во-вторых, наблюдаемый эффект может объясняться тем, что в геноме *D melanogaster* существует "горячая точка" встраивания *gtwin*. Кроме того, можно предположить, что произошла инсерция ретротранспозона *gtwin* в другой мобильный элемент. Исследования, проведенные в последние годы, показали, что мобильные элементы часто встраиваются друг в друга, поэтому такой вариант развития событий представляется довольно вероятным.

А)



Б)

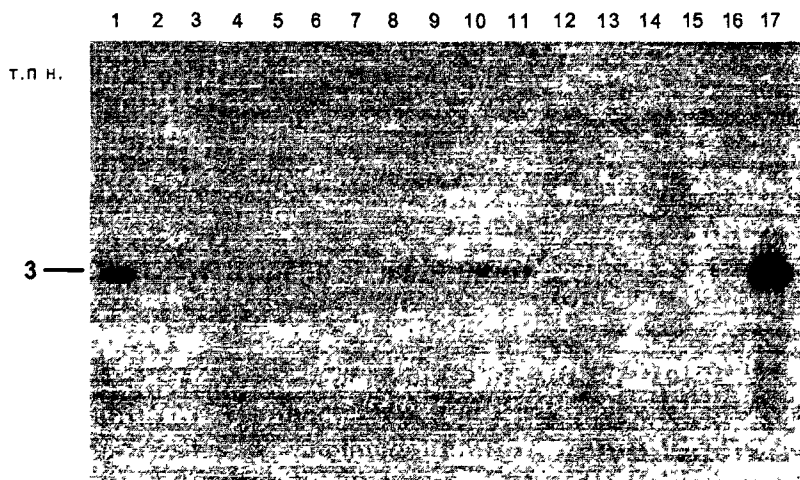


Рис. 6. Саузерн-блот анализ распределения копий ретротранспозона *gtwin* в геноме различных линий и культуры клеток *Drosophila*.

В качестве зонда использовали ^{32}P -меченные рестрикционные фрагменты ДНК *gtwin* А) *SphI*(661)-*PstI*(1086), Б) *HindIII*(1288)-*HindIII*(4271). ДНК выделяли из линий мух, представленных в табл 2 (номера дорожек соответствуют номерам линий в таблице), и культуры клеток *D. melanogaster* линии *Schneider* (дорожка 17) и обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой *HindIII*.

В культуре клеток мобильный элемент *gtwin* сильно амплифицирован. Вероятно, это связано с тем, что в этом случае не действуют или сильно ослаблены механизмы репрессии транспозиций.

Принимая во внимание высокую гетерогенность клеток в культуре и их разную плоидность, по результатам гибридизации трудно определить количество копий ретротранспозона, содержащихся в геноме линии *Schneider* (Рис.6А, дорожка 17).

Для того чтобы оценить гомогенность копий мобильного элемента *gtwin* в геноме изучаемых линий *D. melanogaster* и проверить их на наличие внутренних делеций, мы провели повторную Саузерн-блот гибридизацию того же самого фильтра с меченым ³²P рестрикционным фрагментом ДНК *HindIII*(1288)-*HindIII*(4271) этого элемента (Рис.5, зонд 2). Для всех исследованных линий на радиоавтографе была обнаружена только одна полоса, соответствующая размеру 3 т.п.н. (рис. 6Б).

Таким образом, можно говорить о гомогенности копий ретротранспозона *gtwin* в геноме *D. melanogaster*.

По результатам исследований особый интерес представляет амплификация ретротранспозона *gtwin* в линии Г32. Для определения ее причин требуются дальнейшие исследования, но уже сейчас можно говорить том, что мы имеем дело с новым активно перемещающимся функциональным элементом.

ВЫВОДЫ

1. Из линии Г32 *D. melanogaster* клонированы 28 последовательностей, имеющих гомологию с эндогенным ретровирусом МДГ4 (*gypsy*), среди которых только 4 содержат полноразмерный МДГ4.

2. Рестрикционный анализ полноразмерных копий МДГ4 из линии Г32 показал, что две (8.1 и В18) относятся к «активному» подсемейству, одна (4.1) – к «неактивному». Копия В10, имеющая сайты рестрикции *HindIII* (4483) и *XbaI* (430, 7417), но не имеющая сайтов *MluI* (5335) и *Clal* (6939), является гибридной.

3. Анализ нуклеотидной последовательности функционально важного для ретротранспозиционной активности элемента района *PvuII* (2733) - *KpnI* (3127) показал, что у вариантов 8.1 и В18 эта область соответствует ранее описанному «активному» подсемейству, а у клонов 4.1 и В10 – «неактивному».

4. Наряду с дивергировавшими копиями МДГ4, подвергшимися рекомбинационным перестройкам, из линии Г32 *D. melanogaster* впервые были клонированы 4 копии не изученного ранее ретротранспозона *gtwin*, входящего в группу

Gypsy ДКП-ретротранспозонов.

5. Сравнительный структурный анализ ретротранспозонов МДГ4 (*gypsy*) и *gtwin* выявил значительное сходство между ними. Наибольшая гомология – свыше 75% – наблюдается в области второй и третьей ОРС как на уровне аминокислотных, так и нуклеотидных последовательностей. В районе ОРС1 гомология значительно слабее – около 50%. В некодирующих областях (ДКП и лидерные последовательности) значительной гомологии между этими двумя элементами не наблюдается. В отличие от МДГ4, ретротранспозон *gtwin* не содержит регуляторной последовательности-инсулятора.

6. Показано, что существует как минимум две разновидности ретротранспозона *gtwin*, различающихся наличием/отсутствием стоп-кодона в третьей ОРС (позиция 6117-6119 нуклеотидной последовательности *gtwin*).

7. Методом гибридизации по Саузерну исследовано распределение ретротранспозона *gtwin* в разных линиях рода *Drosophila*. Показано, что в геноме *D. virilis* и *D. hydei* этот мобильный элемент отсутствует. В линиях *D. melanogaster* он представлен, как правило, небольшим количеством копий (2-6) в геноме, в то время как в линии Г32 *D. melanogaster* содержится свыше 20 копий ретротранспозона *gtwin*. В культуре клеток *D. melanogaster* линии *Schneider* ретротранспозон *gtwin* сильно амплифицирован.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Глухов И А, Карпова Н Н, Котнова А П, Любомирская Н В, Ильин Ю В Структурные особенности третьей открытой рамки считывания ретротранспозона *gtw1n* в различных линиях *Drosophila melanogaster*. Доклады Академии Наук, 2004, Т.399 (2), С. 257-259.
2. Котнова А П., Карпова Н. Н., Феоктистова М А , Любомирская Н В , Ким А И , Ильин Ю В Ретротранспозон *gtw1n*: структурный анализ и распределение в линиях дрозофилы. Генетика, 2005, Т.41 (1), С. 23-29.
3. Котнова А. П, Карпова Н. Н, Саленко В. Б, Любомирская Н В, Ильин Ю В Канонические и неканонические последовательности МДГ4 (*gypsy*), содержащиеся в геноме *Drosophila melanogaster*. Доклады Академии Наук, 2005, Т 400 (6), С. 827-830.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 17.05.2005 г.

Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л.1,75. Тираж 100 экз. Заказ 305.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к.

11157

РНБ Русский фонд

2006-4
7205