

На правах рукописи

**Стефанов Юрий Эдуардович**

**СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ  
РЕТРОТРАНСПОЗОНА *GTWIN*, АМПЛИФИЦИРОВАННОГО  
В ЛИНИИ Г32 *DROSOPHILA MELANOGASTER***

03.00.03. – Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2009 год

Работа выполнена в Лаборатории подвижности генома Учреждения Российской академии наук Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор, академик РАН Юрий Викторович Ильин

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор Михаил Борисович Евгеньев

кандидат биологических наук Оксана Геннадьевна Максименко

**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Защита диссертации состоится «23» декабря 2009 года в 11:00 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5.

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

Автореферат разослан «23» ноября 2009 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

кандидат фармацевтических наук

Л.С. Грабовская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.** Мобильные генетические элементы (МГЭ) широко распространены в геномах всех эукариот. Согласно современным данным, доля таких последовательностей в ДНК различных организмов может достигать 70%. Разнообразие МГЭ также весьма велико, а их классификация, основанная на особенностях жизненного цикла и структуры элементов, постоянно уточняется (Wicker T 2007; Kapitonov VV 2008).

Мобильные элементы – это мощный источник генетической нестабильности. Они в состоянии провоцировать хромосомные перестройки и разнообразные эпигенетические эффекты, вызывать инсерционные мутации и дубликации генов. Регуляторные последовательности, которые часто входят в состав МГЭ, оказывают воздействие на экспрессию генов организма-хозяина.

Транспозиции мобильных элементов являются одной из движущих сил микроэволюции. Если в стабильных условиях окружающей среды транспозиции мобильных элементов чаще негативно сказываются на жизнедеятельности хозяина, то в изменяющихся и стрессовых для популяций условиях, активность МГЭ может сыграть положительную роль в адаптации.

Несмотря на то, что возможные последствия распространения МГЭ по геному описаны достаточно хорошо, процессы регуляции активности мобильных элементов изучены не полностью, хотя и представляют большой интерес.

После попадания в геном путем скрещиваний или за счет горизонтального переноса, новый мобильный элемент начинает перемещаться. Этот процесс происходит до тех пор, пока организм-хозяин не приобретает способность контролировать перемещения элемента. Конкретные механизмы этого контроля начали выявляться сравнительно недавно. Считается, что в основе регуляции активности МГЭ лежат механизмы РНК-интерференции, которые сейчас активно изучаются (Brennecke J 2007). Одним из удобных объектов для изучения регуляции мобильных элементов являются представители рода *Drosophila*.

МГЭ дрозофилы изучены достаточно хорошо. Среди мобильных элементов разных видов *Drosophila* преобладают ретротранспозоны – элементы, перемещающиеся посредством РНК-интермедиата.

Ретротранспозон *gtwin*, о котором идет речь в настоящей работе, является ближайшим родственником МДГ4 (в англоязычной литературе известного, как *gypsy*), наиболее хорошо изученного ретротранспозона *Drosophila melanogaster*. Этот элемент имеет два прямых длинных концевых повтора (ДКП) и три открытые рамки считывания, гомологичные ретровирусным генам *gag*, *pol* и *env*.

*Gtwin* был впервые клонирован из линии Г32 *Drosophila melanogaster* при поиске в ней последовательностей, гомологичных МДГ4. Позже было продемонстрировано также, что в линии Г32 наблюдается сильная амплификация ретротранспозона *gtwin* в сравнении с другими линиями (Котнова А.П. 2005). Это могло свидетельствовать о том, что *gtwin* подвергается активным транспозициям в настоящее время, либо перемещался в недавнем прошлом. Именно линии, характеризующиеся генетической нестабильностью и амплификацией МГЭ, представляют большой интерес с точки зрения изучения механизмов контроля мобильных элементов со стороны клетки-хозяина.

**Цели и задачи исследования.** Основной целью настоящей работы было выявление причин амплификации ретротранспозона *gtwin* в линии Г32 *Drosophila melanogaster*, а также выяснение того, перемещается ли этот элемент в настоящее время и, если нет, то что могло привести к его репрессии.

В связи с данными целями были сформулированы следующие задачи:

1. Провести локализацию копий ретротранспозона *gtwin* на политенных хромосомах личинок линии Г32
2. Определить последовательность геномного окружения копий *gtwin* из линии Г32 и локализовать их в геноме *Drosophila melanogaster* с помощью базы данных FlyBase
3. Клонировать копии ретротранспозона *gtwin* или их фрагменты из линии Г32, описать их структурные особенности и сравнить между собой и известной последовательностью *gtwin*

**Научная новизна и практическая ценность работы.** В ходе данной работы с использованием методики гибридизации *in situ* была проведена локализация копий ретротранспозона *gtwin* на политенных хромосомах личинок линии Г32. Анализ структуры политенных хромосом личинок линии Г32 выявил наличие в данной линии крупной комплексной хромосомной аберрации, представленной двумя парацентрическими инверсиями в обоих плечах третьей хромосомы. Было показано, что распределение копий *gtwin* на аберрантной хромосоме значительно отличается от его распределения на ее нормальном гомологе.

Были клонированы фрагменты геномного окружения копий ретротранспозона *gtwin* из линии Г32 и определена их точная локализация в геноме *Drosophila melanogaster* с помощью базы данных FlyBase. Была обнаружена копия элемента, встроившаяся в мастерлокус регуляции активности МГЭ. Помимо этого в данной линии были выявлены кольцевые экстрахромосомные копии *gtwin*.

Большая часть из обнаруженных копий *gtwin* была клонирована и проанализирована. Сравнение их последовательностей выявило наличие в изучаемой линии двух вариантов ретротранспозона, отличающихся структурой и распределением по геному.

Полученные данные открывают ряд возможностей для дальнейших исследований как самого ретротранспозона *gtwin*, так и системы клеточного контроля его перемещений. Также большой интерес представляют дальнейшие исследования линии Г32 *Drosophila melanogaster*, имеющей ряд генетических особенностей и несущей крупную хромосомную аберрацию, которая не элиминируется из нее с течением поколений.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.** Результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях:

«Conference for Young Scientists, PhD Students and Students on Molecular Biology and Genetics», Киев 20-22 сентября 2007 года.

«Russian-European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability» Санкт-Петербург, 24-26 июня 2008 года.

**ПУБЛИКАЦИИ.** По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы. Из них статей – 2, тезисов устных и стендовых сообщений на конференциях – 2.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.** Диссертация изложена на \_\_\_ страницах машинописного текста и состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы. Библиография включает в себя \_\_\_ источников. Работа иллюстрирована \_\_\_ рисунками и \_\_\_ таблицами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

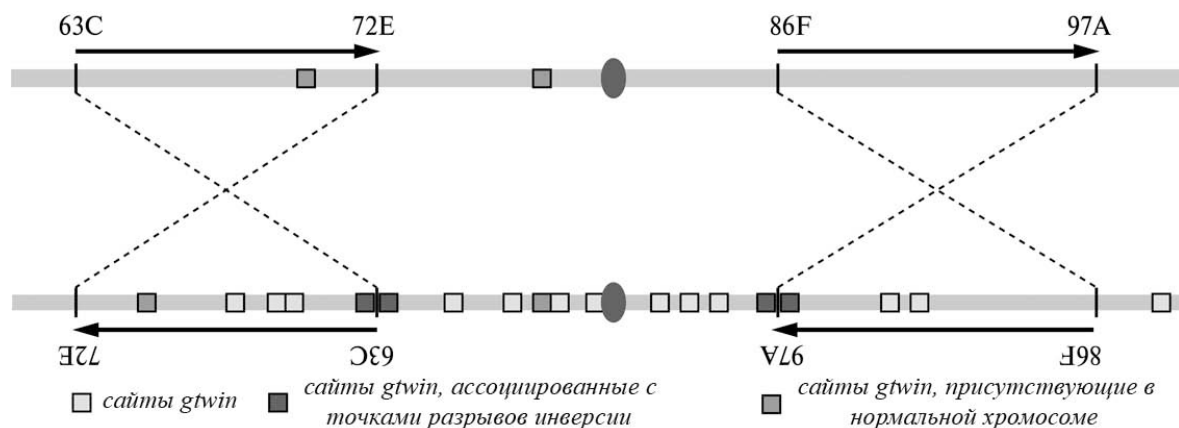
Настоящая работа посвящена изучению структурных особенностей и распределения ретротранспозона *gtwin* в геноме линии Г32 *Drosophila melanogaster*. Этот мобильный элемент был впервые клонирован из данной линии при поиске последовательностей, гомологичных ретротранспозону МДГ4 (*gypsy*). Ретроэлементы *gtwin* и МДГ4 являются ближайшими эволюционными родственниками, поэтому их последовательности характеризуются высокой степенью гомологии. До этого *gtwin* был обнаружен *in silico* и был также известен под названием *hamilton*.

После того, как ретроэлемент *gtwin* был клонирован из линии Г32, его удалось обнаружить и во многих других линиях *Drosophila melanogaster*, а также в ряде других видов рода *Drosophila*. В ходе этих исследований было выявлено, что в Г32 *gtwin* сильно амплифицирован в сравнении с (Котнова А.П. 2005). Амплификация элемента может свидетельствовать о том, что он активно перемещается в линии, либо перемещался в недавнем прошлом. Такие случаи представляют большой интерес, поскольку их подробное изучение способствует пониманию процессов регуляции активности мобильных элементов в геноме.

Основными задачами настоящей работы было определение местоположения копий *gtwin* в геноме Г32, выявление его возможных ретротранспозиций и поиск структурных особенностей элемента, способных оказывать влияние на его активность. Для этого использовалась гибридизация *in situ* с политенными хромосомами, а также методики, основанные на полимеразной цепной реакции.

### 1. Распределение *gtwin* на политенных хромосомах личинок линии Г32

В ходе анализа преператов политенных хромосом личинок линии Г32 было выявлено, что у большей части особей данной линии в геноме присутствует крупная абберрация, представленная двумя парацентрическими инверсиями, расположенными в третьей хромосоме. Точки разрывов инверсий были картированы Пасюковой Е.Г. В плече 3L одна точка находится между подсекциями 63C и 63D, а вторая в подсекции 72E. В плече 3R разрывы располагаются в подсекциях 86A и 97A (рис. 1). Таким образом, перестройки затрагивают практически половину каждого плеча третьей хромосомы. Интересно, что две данные инверсии не встречаются отдельно друг от друга. Возможно, это объясняется тем, что наличие очень протяженной абберрации подавляет рекомбинационные процессы в данной хромосоме (Sniegowski P.D. 1994).



**Рисунок 1. Схематическое изображение третьей хромосомы мух линии Г32.**

Вверху показана нормальная хромосома с отмеченными сайтами локализации *gtwin*. Внизу показана хромосома с инверсиями. На aberrантной хромосоме отмечены дополнительные сайты локализации элемента и сайты, ассоциированные с точками разрывов инверсий.

На всех исследованных препаратах aberrация наблюдается только в гетерозиготном состоянии, что позволяет предположить, что в гомозиготе перестройка является летальной. Вполне возможно, что точки разрывов инверсий затрагивают жизненно важные гены, или же aberrантная хромосома несет другие мутации, которые в гомозиготном состоянии дают летальный эффект.

**Таблица 1. Распространенность aberrантной хромосомы в линии Г32**

Год	2006	2009
Количество препаратов с инверсиями	79	74
Количество препаратов с нормальными хромосомами	10	9
Частота встречаемости хромосомы с инверсией	0,443	0,445

Сравнение данных о частотах встречаемости нормальной и aberrантной хромосом в линии Г32, полученных с интервалом в 3 года, свидетельствует о том, что тенденция к элиминации мутантной хромосомы отсутствует (таблица 1). Так, частота встречаемости aberrантной хромосомы была сопоставима с частотой встречаемости нормальной хромосомы и, согласно данным 2006 года, составляла 0,443, а три года спустя – 0,445. При этом особи, гетерозиготные по наличию aberrации, существенно преобладали в линии Г32. Возможно, у таких особей существует некое селективное преимущество в сравнении с особями, несущими нормальные хромосомы. Нельзя исключить, что третья хромосома без aberrации содержит аллели, неблагоприятно сказывающиеся на общей

приспособленности мух линии Г32, тогда как в гетерозиготном состоянии их наличие компенсируется наличием нормальных аллелей в составе aberrантной хромосомы.

В результате анализа распределения *gtwin* на политенных хромосомах, было выявлено, что паттерн его локализации постоянен. При этом на третьей хромосоме существует два варианта распределения. На нормальной третьей хромосоме обнаруживалось два сайта локализации элемента, тогда как aberrантная хромосома содержала 17 сайтов. Таким образом, на всех исследованных препаратах с нормальными хромосомами наблюдалось 8 сайтов гибридизации с зондом, содержащим последовательность *gtwin*, тогда как на всех препаратах, содержащих aberrантную хромосому, наблюдалось 25 таких сайтов (таблица 2). Вероятно, копии *gtwin* были накоплены внутри нее, поскольку эта хромосома стабильно присутствует в линии и в ней подавлены рекомбинационные процессы, за счет которых мобильные элементы могут элиминироваться из генома.

**Таблица 2. Распределение *gtwin* на политенных хромосомах личинок линии Г32.**

*Сайты, характерные только для aberrантной хромосомы, выделены полужирным шрифтом. Сайты, ассоциированные с точками разрывов инверсий, подчеркнуты*

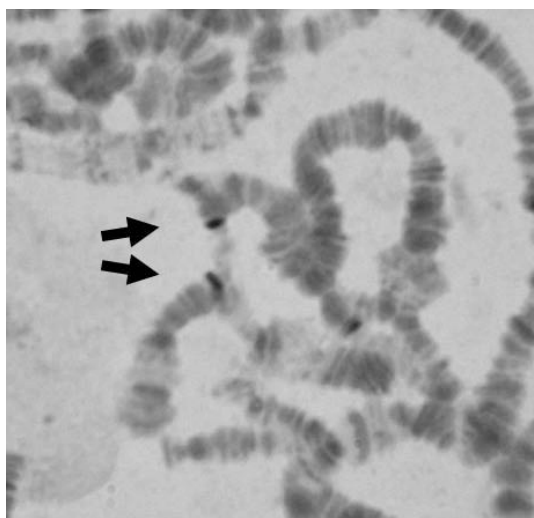
Хромосома	Сайты локализации <i>gtwin</i> в структурно нормальных ядрах	Сайты локализации <i>gtwin</i> в ядрах, содержащих хромосомную aberrацию
<b>X</b>	3A, 7D, 17F, 19F	
<b>2L</b>	—	
<b>2R</b>	52C, 59B	
<b>3L</b>	70B, 78A	<b><u>63D</u>, 65A, 65D 67E, 70B, <u>73A</u>, 75D, 77E, 78A, 78D, 80A</b>
<b>3R</b>	—	<b>82A, 83A, 84A, <u>86E</u>, 92E, 93C, <u>96E</u>, 99F</b>
Всего:	<b>8</b> сайтов	<b>25</b> сайтов

Наличие двух постоянных вариантов распределения исследуемого элемента и отсутствие новых сайтов локализации говорит о том, что на момент проведения гибридизации *in situ* в линии Г32 транспозиций *gtwin* не происходило, а сама линия была генетически стабильна.



Дополнительные 17 сайтов локализации *gtwin*, наблюдавшиеся на препаратах с абберрацией, были распределены по третьей хромосоме равномерно. Внутри инверсий было обнаружено 6 сайтов (4 в плече 3L и 2 в плече 3R), а за пределами инверсий – 9 сайтов (5 в плече 3L и 4 в плече 3R). Любопытно также, что места локализации элемента были ассоциированы с граничными точками комплексной абберрации (таблица 2 и рисунок 2).

Тот факт, что сайты локализации *gtwin* присутствуют в непосредственной близости от точек разрывов инверсий, позволили предположить, что последовательности этого ретротранспозона могли спровоцировать эктопическую рекомбинацию, приведшую к формированию абберрации, что не типично для элементов данного класса. С другой стороны, копии элемента могли попасть в эти области уже после того, как инверсия образовалась. Для того, чтобы проверить эти гипотезы, а также установить точные места локализации *gtwin* в геноме, была использована методика *inverse PCR*, позволившая клонировать фрагменты геномного окружения копий *gtwin* из линии Г32.



**Рисунок 2. Инсерции *gtwin*, ассоциированные с точками разрывов абберрации.**

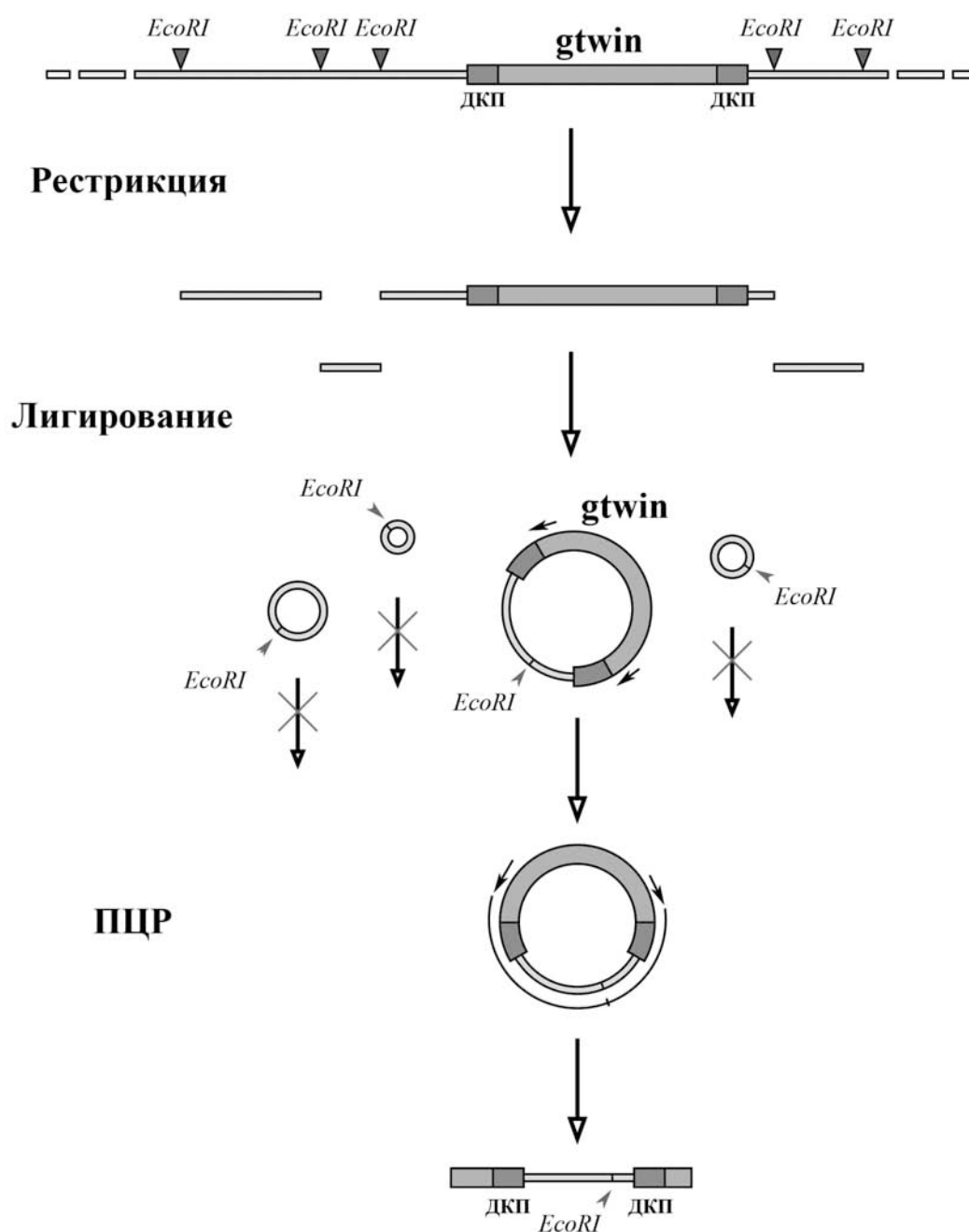
На иллюстрации показано плечо 3L.

## **2. Точная локализация копий *gtwin* в геноме линии Г32**

Для проведения *inverse PCR* использовалась тотальная ДНК мух линии Г32. ДНК обрабатывалась рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI*, сайтов рестрикции которой нет внутри ретротранспозона *gtwin*. Это позволяло получить рестрикционные фрагменты, содержащие полноразмерный ретротранспозон *gtwin* с обоими частями геномного окружения.

Полученную смесь фрагментов обрабатывали лигазой, предварительно разбавив, для того, чтобы обеспечить преимущественное лигирование между собой концов,

принадлежащих одному фрагменту. В результате получалась смесь кольцевых молекул ДНК, некоторые из которых содержали полноразмерный *gtwin* и эта смесь использовалась в качестве матрицы для проведения полимеразной цепной реакции.



**Рисунок 3. Схема эксперимента.**

Для ПЦР использовались праймеры, комплементарные последовательностям *gtwin*, находящимся вблизи ДКП. При этом праймеры были направлены наружу, в сторону геномного окружения. В результате полимеразной цепной реакции мы получили смесь

фрагментов разной длины, соответствующих различным местам встраивания ретротранспозона *gtwin* и содержащих оба участка геномного окружения, соединенных рестрикционным сайтом *EcoRI* и окруженных короткими последовательностями самого *gtwin*.

ПЦР-продукт был клонирован в плазмидный вектор pGEM T-Easy, после чего путем рестрикционного анализа из полученных клонов были отобраны уникальные для последующего секвенирования.

В ходе проведенных экспериментов было отобрано и секвенировано 30 уникальных клонов. Для 25 из 30 полученных уникальных клонов удалось точно определить их локализацию в геноме *Drosophila melanogaster* согласно FlyBase. Оставшиеся 5 клонов соответствовали копиям *gtwin*, встроившимся в мобильные элементы, поэтому определить их точное положение в геноме оказалось невозможно.

Результаты, полученные с помощью описанной методики, в основном совпадают с данными, полученными в ходе гибридизации *in situ*. Так, для 16 сайтов, выявленных цитологическими методами, была определена их точная локализация в геноме (таблица 3). Любопытно, что 4 области несут более одной инсерции *gtwin*. К этим областям относятся секция 20 на политенных хромосомах с инсерциями 19E7, 20C1 и 20F1, секция 63 с инсерциями 63D3 и 63E1, секция 52 с инсерциями 52C2 и 52C5, а также секция 75 с инсерциями 75C4, 75D2 и 75E2. Такое распределение может быть связано с тем, что данные локусы содержат горячие точки для инсерций *gtwin*.

Для 9 сайтов, выявленных при помощи гибридизации *in situ*, не удалось провести точную локализацию копий *gtwin* в них. Это может быть связано с тем, что в части из данных сайтов последовательности *gtwin* окружены последовательностями других мобильных элементов, либо с ограничениями, которые накладывает методика *inverse PCR*.

Стоит отметить, что один эухроматический сайт, локализованный в подсекции 55C2, оказался новым по сравнению с данными гибридизации *in situ*. Это говорит о наличии незначительной гетерогенности в линии Г32.

Большинство из мест локализации копий ретротранспозона *gtwin* в линии Г32 соответствовало областям эухроматина (таблица 4). При этом примерно половина инсерций затрагивает межгенные участки – в них попало 10 копий *gtwin*. Среди этих участков есть один прицентромерный регион, насыщенный инсерциями других мобильных элементов (20C1).

Внутри последовательностей различных генов обнаружилось 11 копий *gtwin*. Из них 9 попали внутрь интронов и 2 внутрь экзонов. Гены, в интронах которых были выявлены инсерции *gtwin*, описаны в таблице 4.

Таблица 3. Сопоставление результатов гибридизации *in situ* и *inverse PCR*.

Локализация, по данным <i>in situ</i>	Локализация в геноме по данным FlyBase	
	Подсекция	Точная локализация
<i>Хромосома X</i>		
3A	3A7	X:2511978
7D	7D4	X:7940710
17F	—	—
19F	19E7	X:20925940
—	20C1	X:21784129
—	20F1	X:22263280
<i>Хромосома 2</i>		
52C	52C2	2R:11635082
	52C5	2R:11676040
—	55C2	2R:14174540
59B	—	—
—	—	2RHet: 2829193
<i>Хромосома 3</i>		
63D	63D3	3L:3416605
	63E1	3L:3439889
65A	—	—
65D	65D2	3L:6894619
67E	—	—
70B	70A7	3L:13366777
73A	73D1	3L:16820140
75D	75C4	3L:18343503
	75D2	3L:18541765
	75E2	3L:18839853
77E	77C6	3L:20509926
78A	78A2	3L:21019923
78D	—	—
80A	—	—
—	80F9+	3L:24542870
—	—	3LHet:712257
82A	—	—
83A	—	—
84A	—	—
86E	86E9	3R:7378808
92E	—	—
93C	93C2	3R:16982490
96F	96E5	3R:21441802
99F	100A5	3R:26626173

Таблица 4. Описание точек встраивания *gtwin* в геноме линии Г32.

№	Локализация	Геномное окружение
<b>Эухроматин</b>		
1	3A7	Межгенный участок
2	7D4	Интрон или, в зависимости от сплайсинга, экзон гена <i>fs(1)h</i> (транскрипционный фактор, ДНК-связывающий белок с протеинкиназной активностью)
3	19E7	Интрон гена <i>bves</i> (функции неизвестны)
4	20C1	Межгенный участок. Окружен мобильными элементами
5	20F1	Межгенный участок
6	52C2	Интрон гена CG30089 (функции неизвестны)
7	52C5	Интрон гена <i>Zasp</i> . Кодировывает цинк-связывающий белок
8	55C2	Экзон гена CG18536 (функции неизвестны); интрон генов CG14502 (функции неизвестны) и <i>Sbb</i> (транскрипционный фактор, личиночное развитие)
9	63D3	Интрон гена <i>sprouty</i> (регуляторный фактор процессов развития и путей трансдукции сигналов в клетке)
10	63E1	Интрон гена <i>eIF5B</i> (фактор инициации трансляции, ГТФ-связывающий белок)
11	65D2	Межгенный участок
12	70A7	Межгенный участок
13	73D1	Межгенный участок
14	75C4	Межгенный участок
15	75D2	Межгенный участок
16	75E2	Межгенный участок. 500 п.н. левее - ген <i>Indy</i> (трансмембранный транспорт цитрата)
17	77C6	Экзон гена CG5059 (функции неизвестны)
18	78A2	Интрон гена <i>skuld</i> (фактор инициации транскрипции, участие в эмбриональном развитии и клеточной дифференцировке)
19	86E9	Межгенный участок
20	93C2	Интрон гена <i>SNF4Agamma</i> (позитивная регуляция клеточного цикла, фосфорилирование аминокислот, регуляция гомеостаза холестерина)
21	96E5	Интрон гена CG4673 (структурный компонент ядерной поры)
22	100A5	Межгенный участок
<b>Гетерохроматин</b>		
23	2RHet	Мастерлокус регуляции МГЭ
24	80F9+	Межгенный участок
25	3LHet:712257	Межгенный участок
<b>Не локализованы</b>		
26		F-элемент и <i>micropia</i>
27		F-элемент
28		<i>stalker</i>
29		<i>stalker2</i>
30		<i>Dm88</i>

Анализ геномного окружения копий *gtwin*, картированных рядом с точками разрывов инверсий, показал, что эти копии не находятся непосредственно в точках разрывов. Это говорит о том, что *gtwin*, по всей видимости, не принимал участия в формировании инверсий.

Несмотря на то, что мобильные элементы значительно чаще встречаются в гетерохроматине, копии *gtwin* в линии Г32 располагаются в основном в эухроматических локусах. Это свидетельствует о том, что *gtwin* распространился в геноме Г32 сравнительно недавно, и его копии не были элиминированы из эухроматина за счет естественного отбора. В гетерохроматине было обнаружено всего 3 инсерции элемента. Одна из них оказалась в прицентромерной области плеча 3L, а две другие было невозможно сопоставить с положением на цитологической карте. Наибольший интерес представляет инсерция в точку 2RHet:2829193 (локус в гетерохроматическом участке плеча 2R). Эта область соответствует одному из описанных Бреннеке и соавторами мастерлокусов регуляции активности МГЭ в геноме *Drosophila melanogaster* (Brennecke J 2007). Вполне возможно, что именно с попаданием *gtwin* в этот локус связано прекращение его перемещений.

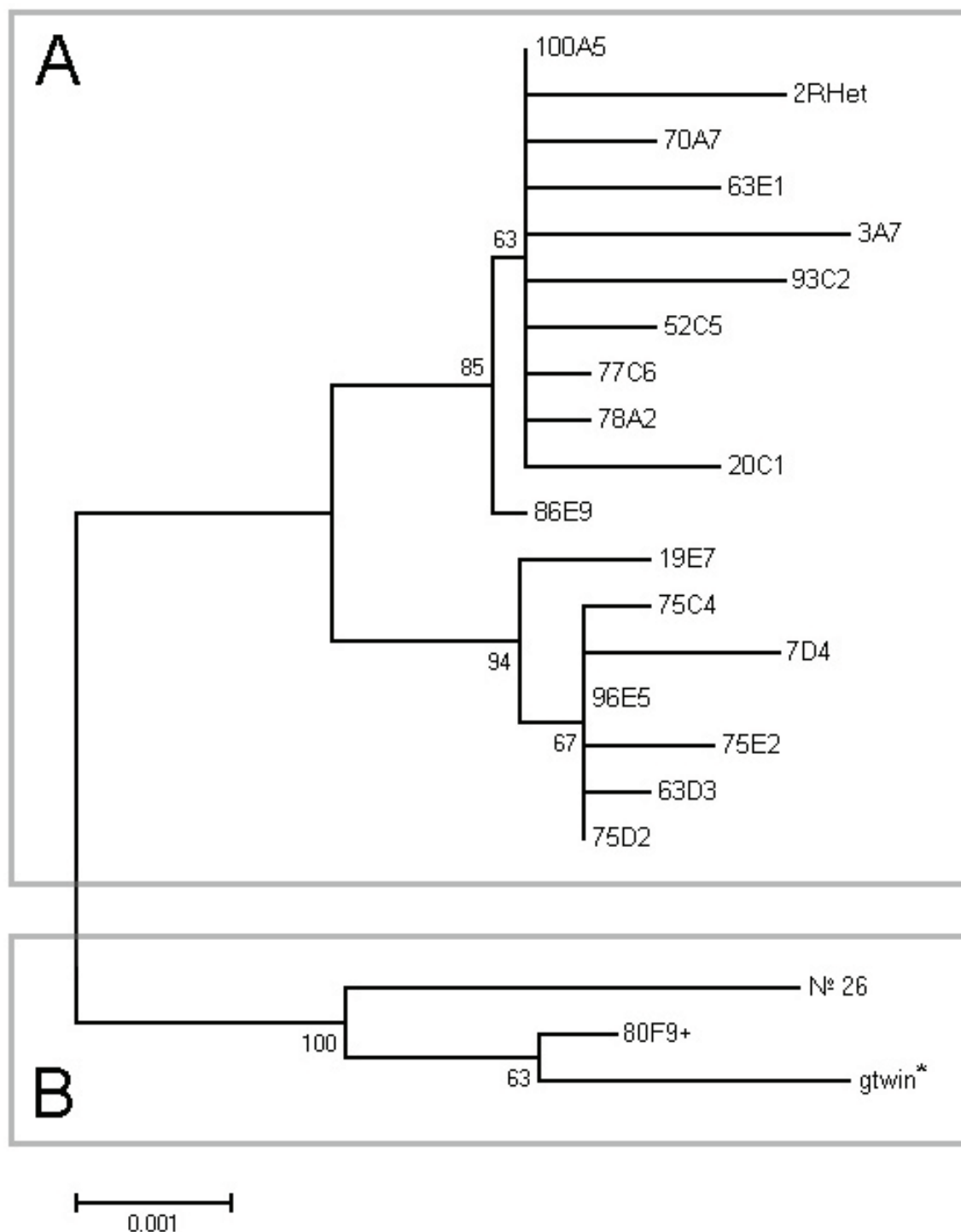
Аmplификация *gtwin* в линии Г32 может быть связана как со свойствами самой линии, так и со свойствами элемента. Для выявления структурно-функциональных особенностей амплифицированных копий *gtwin*, мы клонировали фрагменты этих копий, определили их нуклеотидную последовательность и сравнили последовательности между собой.

### 3. Структурные особенности *gtwin* в линии Г32

Для того, чтобы клонировать участки *gtwin* из линии Г32 были использованы данные об их геномном окружении. К последовательностям геномной ДНК, прилегающей к копиям элемента, были подобраны праймеры для полимеразной цепной реакции. Помимо геномных праймеров в эксперименте также использовались праймеры, комплементарные участкам *gtwin*. В качестве матрицы использовалась тотальная ДНК мух линии Г32. Всего нам удалось определить нуклеотидные последовательности для 20 копий *gtwin* из разных сайтов.

Аmplификация *gtwin* в линии Г32 могла быть связана с тем, что в данную линию за счет горизонтального переноса или скрещиваний попал вариант элемента, ранее не присутствовавший в ее геноме. Согласно современным представлениям, новый для линии ретротранспозон не сразу попадает под контроль клеточных механизмов регуляции. Он в

состоянии распространяться по геному до тех пор, пока не активизируются механизмы сайленсинга.



**Рисунок 4. Филогенетическое древо копий *gtwin* из линии Г32.**

*Копии gtwin* обозначены в соответствии с их локализацией, кроме: *gtwin\** - каноническая последовательность элемента из БД генома дрозофилы; №26 – копия, окруженная элементами *microRNA* и *F*; 2RHet – копия, локализованная в регуляторном мастерлокусе.

Сравнение клонированных нами последовательностей показало, что в линии Г32 присутствуют две четко различимые группы копий ретротранспозона *gtwin* (рисунок 4). Группа В представлена двумя копиями элемента. Одна из них (обозначенная на рис. 4 как 80F9+) находится в гетерохроматическом прицентромерном районе левого плеча третьей хромосомы, проксимальнее подсекции 80F9, а положение второй (обозначенной №26) определить точно невозможно, поскольку она окружена последовательностями МГЭ *micropia* и *F*-элемента. Эти копии наиболее близки к канонической последовательности *gtwin*.

Копии, относящиеся к группе А, сильнее отличаются от канонической последовательности *gtwin*. Наибольший интерес представляют мутации в сайте, с которым связывается лизинная тРНК, участок которой служит затравкой на одной из стадий обратной транскрипции. Можно было бы предположить, что эти изменения должны дать преимущество другому, не измененному, варианту *gtwin*, однако полученные нами данные свидетельствуют об обратном. Группа неканонических *gtwin* в линии Г32 гораздо более многочисленна, чем группа канонических *gtwin*. Таким образом, амплификации подверглись именно элементы с мутантным сайтом отжига РНК-затравки.

В настоящее время *gtwin* не перемещается в линии Г32, следовательно неканонический вариант этого ретротранспозона попал под влияние клеточных механизмов регуляции. В основе таких механизмов могут быть пути РНК-интерференции с участием коротких РНК, взаимодействующих с белками семейства *Piwi* (piРНК). Активизироваться они могут, если новый мобильный элемент попадет в регуляторный локус, который служит источником таких коротких РНК.

Как следует из таблицы 4, одна из выявленных в линии Г32 копий *gtwin* присутствует в мастерлокусе регуляции активности МГЭ. Данная копия из локуса 2RNet:2829193 относится к группе неканонических копий элемента. Вполне возможно, что сайленсинг *gtwin* в линии Г32 связан с инсерцией элемента в такой локус.

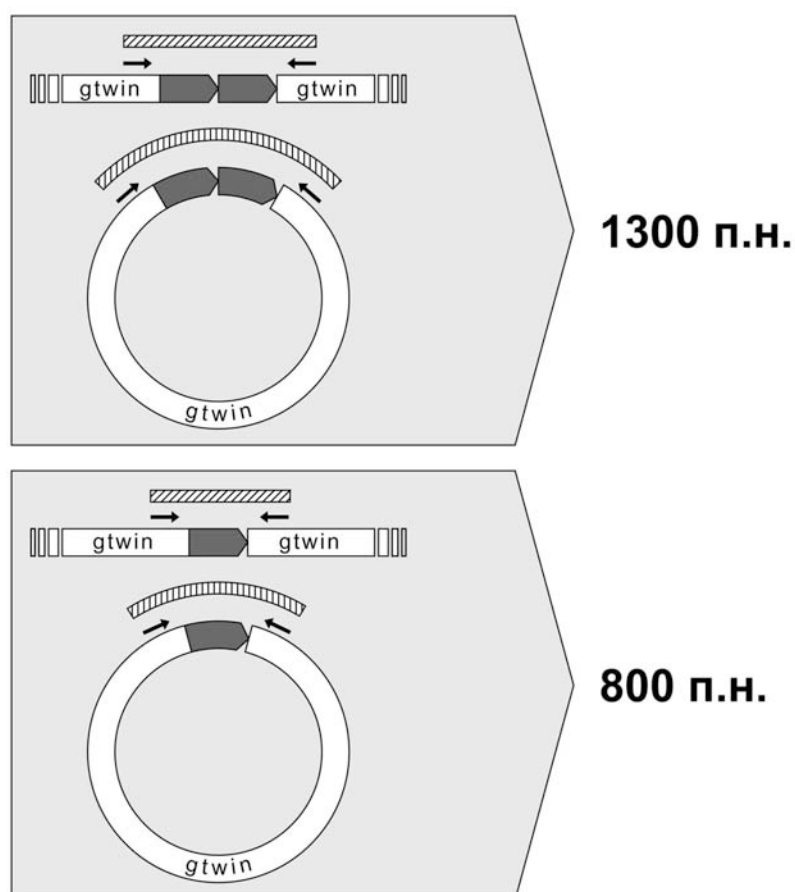
Канонические копии *gtwin* не активны в линии Г32. Одна из таких копий содержит инсерцию *F*-элемента в 3'-ДКП, что говорит о ее нефункциональности. Другая каноническая копия локализована в прицентромерном гетерохроматическом регионе, в котором базовый уровень экспрессии сильно снижен. Видимо, по этой причине *gtwin* из данной области также не может служить источником новых копий.



#### 4. Тандемные повторы *gtwin* и кольцевые интермедиаты ретротранспозиции

Интересно, что среди последовательностей, полученных в результате *inverse PCR*, было выявлено большое количество клонов, включавших только один или два ДКП *gtwin* и не содержащих при этом геномного окружения.

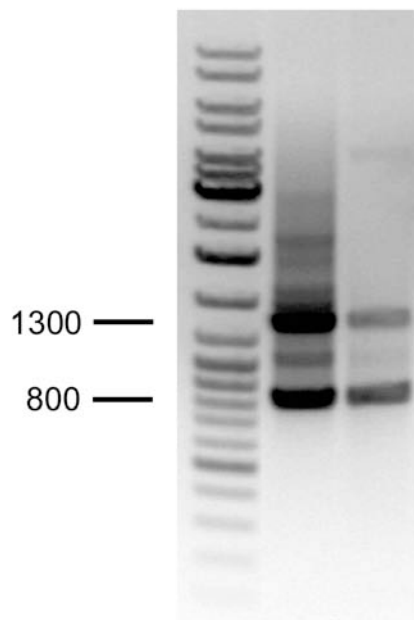
Матрицей для образования таких молекул могли стать либо тандемно расположенные в геноме копии *gtwin* (структура с одним ДКП, общим для двух копий ретротранспозона присутствует в секвенированном геноме *Drosophila melanogaster* под номером AC006215), либо экстрахромосомные кольцевые структуры (рисунок 5). Наличие подобных структур представляет большой интерес, поскольку они могут быть как продуктами вырезания элемента из генома, так и интермедиатами ретротранспозиции. Для выяснения природы этих последовательностей был предпринят ряд дополнительных экспериментов.



**Рисунок 5. Схема образования ПЦР-продуктов с одним и двумя ДКП.**

На иллюстрации показаны два возможных варианта образования данных продуктов. Линейные структуры соответствуют участкам генома, а кольцевые – экстрахромосомным копиям элемента. Темным обозначены ДКП *gtwin*, штриховкой – ПЦР-продукты, а стрелками – места отжига праймеров.

Для анализа линии Г32 на наличие в ней tandemных повторов ретротранспозона *gtwin*, или его экстрахромосомных копий мы также использовали полимеразную цепную реакцию, праймерами для которой служили те же олигонуклеотиды, что и в случае *inverse PCR*. В качестве матрицы для этой реакции были использованы препараты тотальной ДНК линии Г32 а также кольцевой ДНК, выделенной из мух данной линии по методу Хирт.

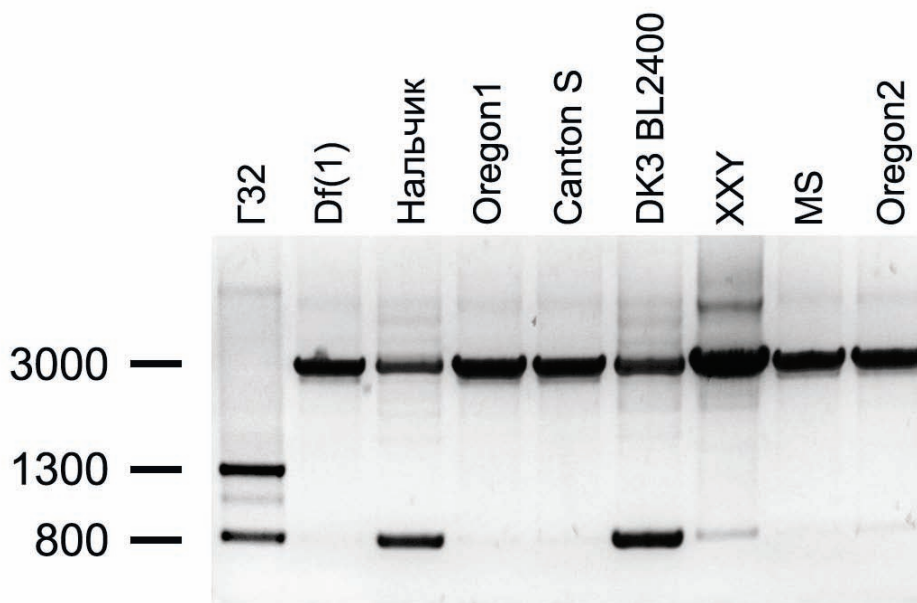


**Рисунок 6. Электрофореграмма результатов ПЦР.**

На первой дорожке показана маркерная ДНК, на второй – ПЦР-продукт с тотальной ДНК, на третьей – ПЦР-продукт с ДНК, выделенной по методу Хирт.

ПЦР-продукты, полученные с использованием различных препаратов ДНК в качестве матрицы, оказались идентичны (рисунок 6). В обоих вариантах образовывались фрагменты, содержащие как один ДКП *gtwin*, так и два ДКП этого элемента. Этот результат подтвердил, что в линии Г32 присутствуют экстрахромосомные кольцевые копии исследуемого ретротранспозона.

Для выяснения, является ли наличие подобных структур типичным для элемента *gtwin*, нами, помимо линии Г32, были проанализированы еще 9 линий мух *Drosophila melanogaster*. В результате ПЦР-анализа с использованием тотальной ДНК мух этих линий было выявлено, что фрагменты, содержащие два ДКП *gtwin*, присутствовали только в ПЦР-продукте линии Г32, а фрагменты, содержащие один ДКП, встречались в ряде линий, включая линию Г32. Любопытно, что в ПЦР-продуктах, полученных на тотальной ДНК всех линий, за исключением Г32, присутствовал фрагмент длиной 3000 п.н. (рис. 7).



**Рисунок 7. ПЦР-продукты, полученные с тотальной ДНК исследованных линий.**

Представлена электрофореграмма с ПЦР-продуктами, полученными с тотальной ДНК 9 линий мух *Drosophila melanogaster*.

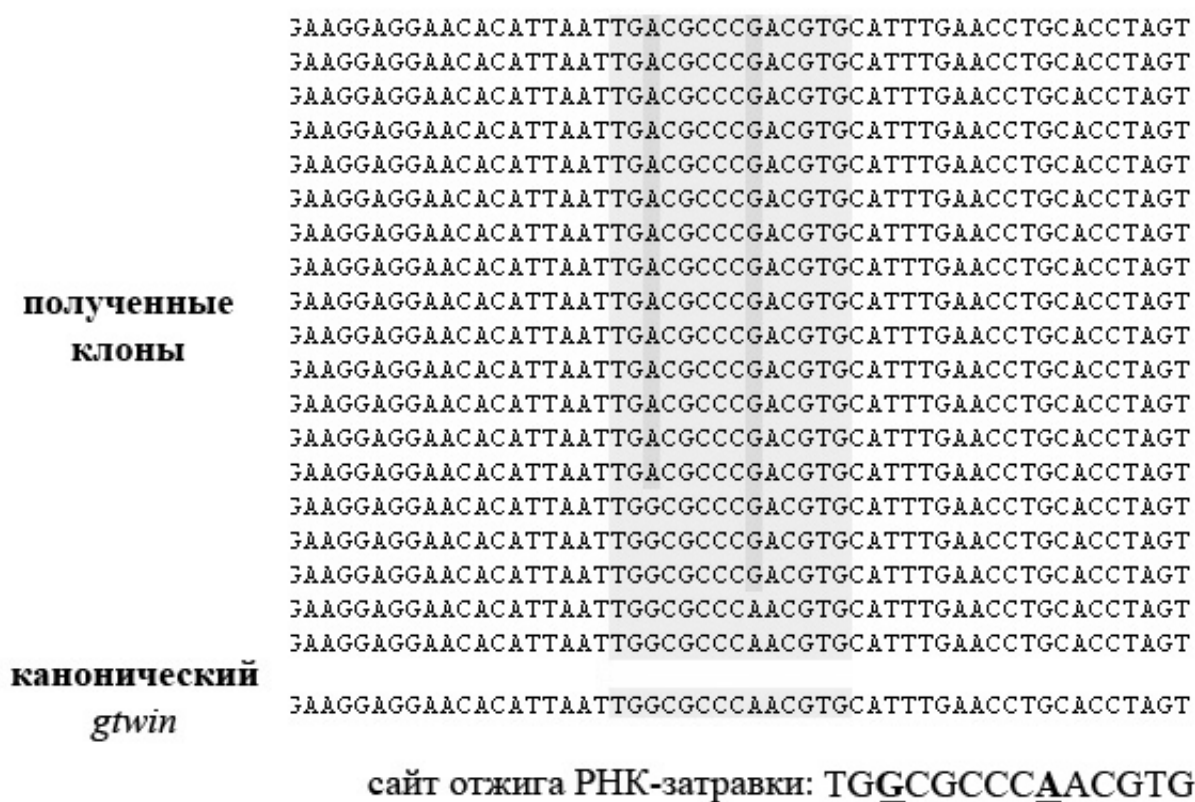
ПЦР-фрагмент длиной 3000 был клонирован, и его нуклеотидная последовательность была определена. В результате этого было показано, что в нем между двумя ДКП *gtwin* находится последовательность мобильного элемента *invader2*. Наиболее вероятная локализация этих последовательностей в геноме, согласно FlyBase – U:8994914..8995542. Вполне возможно, что такой консервативный участок генома, в котором находятся сразу три ретроэлемента, может выполнять некую регуляторную функцию.

Наличие в линии Г32 экстрахромосомных копий *gtwin*, содержащих два ДКП данного элемента, оказалось уникальным свойством этой линии. Подобные структуры могут формироваться как из линейного интермедиата ретротранспозиции, так и в результате очень редкого события - точного вырезания элемента из генома. Для того, чтобы выяснить, какой из двух этих возможных вариантов соответствует действительности, был клонирован набор ПЦР-фрагментов длиной 1300 п.н., полученных на матрице тотальной ДНК линии Г32.

В результате секвенирования полученных последовательностей было выявлено 17 уникальных клонов, которые мы сравнили между собой и с канонической последовательностью ДКП ретротранспозона *gtwin*.

В нуклеотидных последовательностях полученных клонов помимо единичных замен были обнаружены пять полиморфных сайтов. В каждом из таких сайтов наблюдалось два различных варианта нуклеотидов. Три обнаруженных полиморфных сайта приходились на

область ДКП, а два – на 5'-нетранслируемую область. Особый интерес представляют замены в позициях 497 и 503, так как они затрагивают сайт связывания тРНК-затравки, необходимой для обратной транскрипции (рисунок 8).



**Рисунок 8. Участок 5'-нетранслируемой области полученных клонов в сравнении с последовательностью канонического *gtwin*.**

*Выделен сайт отжига РНК-затравки и мутации в нем.*

Среди 17 исследованных клонов 15 содержали замену остатка гуанина на остаток аденина в 503-й позиции. Помимо этого 12 из 17 клонов содержат гуанин вместо аденина в позиции 497, что также должно снижать эффективность связывания затравки в том случае, если используется нормальная тРНК. Здесь стоит отметить, что все геномные копии *gtwin*, обнаруженные в результате *inverse PCR*, за исключением двух, также имеют G в положении 503, то есть, содержат точечную мутацию.

В проанализированных клонах различия наблюдались не только в ДКП, но и в области между ними. В 9 из 17 случаев копии *gtwin* непосредственно соседствовали друг с другом – без вставок или делеций нуклеотидных остатков. В 4 случаях между ДКП обнаружались вставки от 1 до 13 нуклеотидов, а остальные 4 клон несли делеции различной длины (от 1 до 80 нуклеотидов) (рисунок 9).

полученные клоны	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT	TACGGCCCGGACTT	AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT	TCTA	AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC	
	gtwin	CCAC CAGATC TCCACC	CCCTGGAGACCACC	GGACACAT	CCC	GAA	GGAGGAACACATTAATT		AGTTAA	CAA	CTAAGACC	ACACACAT	TAAGAGCC	CACATA	TAACAAAT	TAA	TAA	TAA	TAA	CAAAAT	CCT	GAC

**Рисунок 9. Результаты выравнивания областей смыкания двух ДКП.**

Показаны концевые участки ДКП *gtwin*, выделенные из ПЦР-продукта с тотальной ДНК линии Г32. Светло-серым обозначены области с заменами, темно-серым – абсолютно идентичные области. Отсутствие нуклеотидов показано штрихом.

Экстрахромосомные кольцевые копии могут образовываться не только как результат обратной транскрипции, но и как результат точного вырезания элемента из генома посредством интегразы. В описанной ситуации это представляется менее вероятным, поскольку в результате точного вырезания интегразой, между ДКП должны были бы оставаться 4 нуклеотида, соответствующих дубликации сайта-мишени инсерции, однако этого не наблюдается. Таким образом, наиболее вероятно, что *gtwin* в линии Г32 образует интермедиаты ретротранспозиции, которые, однако, не встраиваются в геном, поскольку перемещений элемента не выявлено.

Наличие в большинстве клонированных участков экстрахромосомных кольцевых копий *gtwin* мутантного сайта отжига РНК-затравки могло свидетельствовать о том, что неканонический вариант элемента, несмотря на мутации, способен к обратной транскрипции.

## ВЫВОДЫ

1. В линии Г32 обнаружена и картирована крупная комплексная хромосомная aberrация, затрагивающая оба плеча третьей хромосомы. Показано, что aberrация встречается в линии с высокой частотой и не элиминируется с течением поколений.
2. Методом гибридизации *in situ* исследовано распределение сайтов локализации ретротранспозона *gtwin* на политенных хромосомах личинок линии Г32. Показано, что aberrантная третья хромосома содержит значительно больше копий элемента, чем нормальные.
3. Распределение копий *gtwin* на политенных хромосомах линии Г32 постоянно, что свидетельствует о том, что в настоящее время элемент не перемещается.
4. Проведена точная локализация большинства копий *gtwin* в геноме линии Г32. Показано, что копии элемента находятся преимущественно в эухроматических участках генома.
5. Помимо канонического, в линии Г32 обнаружен новый вариант *gtwin*, имеющий ряд отличий от ранее известного, наиболее интересными из которых являются мутации в сайте отжига тРНК-затравки. Показано, что именно этот новый вариант сильно амплифицирован в линии.
6. Обнаружены экстрахромосомные кольцевые копии *gtwin* в линии Г32. Показано, что эти структуры вероятнее всего образовались из линейных интермедиатов ретротранспозиции элемента.
7. Обнаружена инсерция *gtwin* в предполагаемый мастерлокус регуляции активности МГЭ, что могло послужить причиной прекращения его ретротранспозиций в линии Г32.

## **РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Ю.Э. Стефанов, А.П. Котнова, Е.Г. Пасюкова, Н. В. Любомирская, А.И. Ким, Ю.В. Ильин. «Ретротранспозон *gtwin* в линии Г32 *Drosophila melanogaster*: повышенное число копий элемента привело к возникновению хромосомной aberrации» Докл. Акад. Наук, 2007 т. 413(5) с. 696-698
2. Ю.Э. Стефанов, А.П. Котнова, И.А. Глухов, Н.В. Любомирская, Ю.В. Ильин. «Особенности ретротранспозиционной активности эндогенного ретровируса *gtwin* в линии Г32 *Drosophila melanogaster*» Докл. Акад. Наук, 2009 т. 424(4) с. 555-558

## **ТЕЗИСЫ КОНФЕРЕНЦИЙ**

1. Y.E. Stefanov, A.P. Kotnova, Y.V. Ilyin. An increased number of copies of retrotransposon *gtwin* caused chromosomal aberration in G32 *Drosophila melanogaster* strain. Conference for Young Scientists, PhD Students and Students on Molecular Biology and Genetics, Kyiv 20-22 September 2007
2. Stefanov Y.E., Kotnova A.P., Pasyukova E.G., Lyubomirskaya N.V., Kim A.I., Ilyin Y.V. Unusual genetic properties of *Drosophila melanogaster* strain G32: Increased number of retrotransposon *gtwin* copies is associated with chromosomal aberration. Russian-European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability» Санкт-Петербург, 24-26 июня 2008.