

УДК 577.212.3::575.86

К.Е. Усов^{1,2}, А.А. Коханенко², В.Н. Стегний^{1,2}

¹Томский государственный университет (г. Томск)

²Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
Томского государственного университета (г. Томск)

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОСТАВА ДНК ПРИЦЕНТРОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА ХРОМОСОМ *Drosophila oreana* И *Drosophila virilis* (Diptera: Drosophilidae)

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-04-31202-мол_а),
частичной финансовой поддержке гранта ФЦП № 2012-1.1-12-000-1001-039
и стипендии Президента РФ СП-1037.2013.4.

Проведена дот-блот гибридизация район-специфичной ДНК-библиотеки из хромосомы *D. virilis* (DvirIII) с охарактеризованными и аннотированными 42 ДНК-клонами хромосомы *D. oreana*. В результате установлено, что ДНК прицентромерного гетерохроматина хромосом у *D. oreana* и *D. virilis* содержит значительное количество общих последовательностей ДНК, среди которых: диспергированные повторы (мобильные генетические элементы) – представители LTR-ретротранспозонов, LINE-элементы, ДНК-транспозоны; тандемные повторы (минисателлиты), а также последовательности, гомологичные белок-кодирующим генам.

Ключевые слова: гетерохроматин; ДНК; политемные хромосомы; хромосомный центр; *Drosophila virilis*; *Drosophila oreana*.

Введение

Известно, что последовательности ДНК, ассоциированные с гетерохроматином, трудно поддаются секвенированию и последующему анализу из-за обогащенности повторами. Поэтому даже оконченные и опубликованные проекты по секвенированию геномов разных организмов, по сути, содержат информацию только о последовательностях ДНК, ассоциированных с эухроматином. Сейчас, однако, ясно, что для понимания принципов функционирования генома эукариот необходима полная информация о составе его последовательностей. С 2000 г. ведется работа по секвенированию ДНК гетерохроматина у многих организмов. Определенный успех был достигнут в расшифровке нуклеотидной последовательности ДНК гетерохроматина *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) [1], *Arabidopsis thaliana* (Heynh, 1842) [2] и человека [3]. В 2007 г. в журнале «Science» был опубликован пятый выпуск Release 5.1, целиком посвященный последовательностям ДНК гетерохроматина *D. melanogaster* [4]. В этой работе представлены достаточно полные данные о 24 м.п.н. ДНК гетерохроматина этого вида и приведено

процентное соотношение разных классов последовательностей, выявленных в результате анализа этих 24 м.п.н. ДНК гетерохроматина *D. melanogaster*. В результате было обнаружено, что 2/3 (16 м.п.н., 66%) ДНК гетерохроматина состоит из ретротранспозонов (33% LTRs и 33% LINEs). На ДНК-транспозоны приходится 15% ДНК гетерохроматина. В то время как на тандемные повторы приходится в целом около 10% ДНК гетерохроматина, что значительно выше, чем в ДНК эухроматина (около 3%). Особенно много таких повторов в проксимальных центромерных районах хромосом 2 и 3, а также Y. Кроме того, было обнаружено: по крайней мере 230 белок-кодирующих генов, которые высококонсервативны у разных видов *Drosophila*; 32 псевдогена; 13 генов, не кодирующих РНК [4].

С точки зрения проблемы эволюции геномов дрозофилид является важным проведение сравнительного анализа состава ДНК гетерохроматина у таких филогенетически отдаленных видов, как *Drosophila oreana* (Tsacas, David, 1978) и *Drosophila virilis* (Sturtevant, 1916). Эти виды являются анцестральными в своих группах и содержат большое количество гетерохроматина в геномах [5–10]. Также необходимо отметить, что к настоящему времени существует пока еще не полная информация о составе ДНК эухроматина *D. virilis* [11], в то время как данные о составе ДНК гетерохроматина этого вида практически отсутствуют в мировых научных источниках.

Материалы и методики исследования

Материалом исследований служили 42 плазмидных клона район-специфичной ДНК-библиотеки хромоцентра политемных хромосом лабораторной линии *D. oreana* и район-специфичная ДНК-библиотека хромоцентра политемных хромосом лабораторной линии *D. virilis*.

Дот-блот гибридизация. В основе метода лежит гибридизация ДНК, иммобилизованной на мембране с ДНК-зондом. Образцы наносятся на мембрану с помощью пипетки, этим данный метод отличается от саузерн-блот гибридизации, когда исследуемая ДНК переносится на мембрану с агарозного геля после проведения электрофореза. Метод позволяет в один эксперимент оценить гомологию фрагментов ДНК на мембране с фрагментами ДНК в гибридизационном растворе. Детекция сигнала зависит от того, какой зонд использовали (радиоактивный, биотинилированный и пр.). В настоящей работе использовался биотинилированный зонд, и для детекции применяли систему, предложенную компанией «Fermentas» (Biotin Chromogenic Detection Kit, #K0661). В основе принципа её работы лежит действие конъюгата щелочной фосфатазы со стрептавидином. Биотин-11-дУТФ, встроенный в ДНК-зонд, который в свою очередь гибридизовался с ДНК на мембране, связывает комплекс стрептавидин-щелочная фосфатаза через стрептавидин, а фосфатаза в свою очередь превращает субстрат 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат (BCIP-T) при последующей обработке

в нерастворимый осадок синего цвета. Сигнал можно наблюдать в виде синих пятен на мембране (рис. 1).

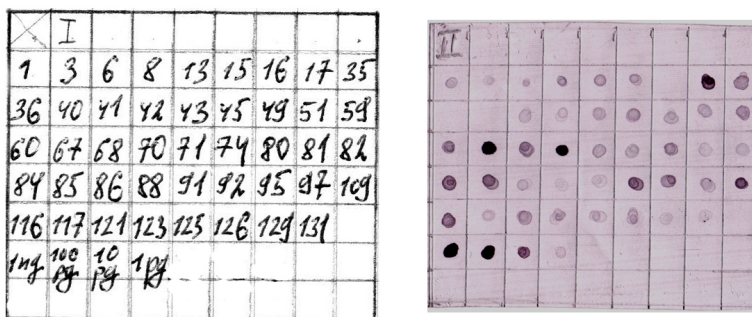


Рис. 1. Результат дот-блот гибридизации район-специфичной ДНК-библиотеки из хромоцентра политеменных хромосом *D. virilis* с ДНК-клонами хромоцентра политеменных хромосом *D. oreana*: I – порядок расположения ДНК-клонов на мембране. В качестве контроля использовали биотинилированный зонд тотальной ДНК хромоцентра *D. virilis* в количестве 1 нг, 100, 10, 1 пг; II – сигналы в виде пятен на мембране (результат дот-блот гибридизации)

Для приготовления биотинилированного зонда ДНК хромоцентра *D. virilis* использовали ник-трансляцию. В реакционную смесь, состоящую из 1 × буфера ДНК полимеразы I, 1 мг/мл БСА, 50 мкМ дАТФ, дГТФ и дЦТФ, 10 мкМ дТТФ, 20 мкМ биотин-11-дУТФ, 0,002 ед. ДНКазы I (Promega) и 0,2 ед. ДНК полимеразы I (Promega), добавляли 1000 нг ДНК хромоцентра *D. virilis*. Реакцию проводили при 15°C в течение 2 ч, останавливали добавлением 1 мкл 0,5М ЭДТА. Реакцию проводили в семи повторностях для получения нужного количества зонда.

Около 50 нг ДНК-клонов район-специфичной ДНК-библиотеки хромоцентра *D. oreana* после амплификации плазмидной ДНК наносили на положительно заряженную нитроцеллюлозную мембрану (Fermentas). Мембрану высушивали при комнатной температуре и производили иммобилизацию ДНК на мембране 5 мин экспозицией под ультрафиолетом в трансиллюминаторе.

Мембрану помещали в 80 мл предгибризационной смеси, состоящей из 50% формамида, 0,5% SDS, 5× раствора Денхарда, и 6×SSC (объем предгибризационной и гибризационной смеси устанавливали из расчета 0,2 мл/см² мембраны). Смесь предварительно нагревали до 37°C. Кроме того, перед внесением мембраны в смесь добавляли спермальную ДНК лосося из расчета 50 мкг на см² мембраны. Спермальную ДНК лосося денатурировали при 99°C 5 мин и охлаждали на льду 5 мин перед внесением. Предгибридизацию осуществляли в водяной бане при 37°C с покачиванием 50 об./мин 3 ч. После этого предгибризационную смесь заменяли на гибризацион-

ную сходного состава, за исключением того, что вместо спермальной ДНК лосося в неё добавляли денатурированный ДНК-зонд, приготовленный на основе район-специфичной библиотеки ДНК хромоцентра *D. virilis* (из расчёта 200 нг/мл). Мембрану выдерживали 1 ч в гибридизационной смеси с зондом при температуре 37°C при постоянном покачивании. Денатурацию связанной с мембраной ДНК проводили в водяной бане при температуре 80°C 20 мин. Гибридизация осуществлялась при температуре 37°C 36 ч. Денатурация и гибридизация сопровождалась постоянным покачиванием мембраны в растворе. Отмывка проводилась при комнатной температуре в 2×SSC с 0,1% SDC дважды по 5 мин и при температуре 60°C в 0,1×SSC с 0,1% SDC дважды по 20 мин. Далее мембрану сушили на фильтровальной бумаге 5 с и проводили отмывку и детекцию сигнала с помощью набора Biotin detection kit (Fermentas) по предложенному протоколу.

Результаты исследования и обсуждение

Ранее нами методом микродиссекции была получена район-специфичная библиотека ДНК хромоцентра политенных хромосом *D. oreana* (Dore1) [12]. Далее на ее основе получили набор ДНК-клонов и провели их секвенирование. В результате анализа клонов при помощи различных пакетов компьютерных программ среди них удалось обнаружить большое количество разнообразных повторенных последовательностей (диспергированные повторы – представители LTR-ретротранспозонов, LINE-элементы, ДНК-транспозоны; тандемные повторы), а также были выявлены последовательности, гомологичные белок-кодирующим генам [13]. Кроме того, при помощи метода микродиссекции нами была получена район-специфичная библиотека ДНК хромоцентра политенных хромосом *D. virilis* (DvirIII) [14].

В рамках настоящей работы была проведена дот-блот гибридизация район-специфичной ДНК-библиотеки из хромоцентра *D. virilis* с охарактеризованными и аннотированными 42 ДНК-клонами хромоцентра *D. oreana*. Это позволило получить новые данные о молекулярном составе ДНК хромоцентра *D. virilis* и в целом оценить консервативность состава ДНК прицентромерного гетерохроматина у таких относительно отдаленных в филогенетическом отношении видов, как *D. oreana* и *D. virilis*. Из анализа были исключены два клона – P36F (тандемный повтор) и P40F (LTR-ретротранспозон *DM297_I*) в связи с очень низкой исходной концентрацией ДНК.

В результате дот-блот гибридизации район-специфичной ДНК-библиотеки из хромоцентра *D. virilis* с 42 охарактеризованными клонами хромоцентра *D. oreana* были выявлены следующие категории консервативных последовательностей ДНК: а) тандемные повторы, относящиеся к минисателлитам; б) диспергированные повторы – мобильные генетические элементы (таблица); в) последовательности, гомологичные белок-кодирующим генам.

Мобильные генетические элементы в составе ДНК хромосомы *D. virilis*

| Мобильные генетические элементы | | |
|--|---|---|
| LTR-ретротранспозоны | LINE | ДНК-транспозоны |
| Семейство Gypsy: Gypsy 3_I; Gypsy 9_I; Gypsy4_I; Gypsy 10_I; Gypsy_I; IDEFIX_I; STALKER 4_I; ZAM_I; TV1_I | Семейство Jockey: G3_DM; HELENA_RT Семейство I: I_DM | Гелитроны: DNAREP1_DM; Helitron1_ DYak Полинтоны: Polinton-1 DY |

Однако некоторые мобильные генетические элементы и повторы, которые характерны для хромосомы *D. oreana*, в прицентромерном гетерохроматине *D. virilis* не удалось детектировать с помощью метода дот-блот гибридизации (LTR-ретротранспозоны: семейство *Roo* – ROO_I, семейство *Copia* – Copia_I, семейство *Gypsy* – *Quasimodo*_I, *HMSBEAGLE*_I, *QUASIMODO 2-I*_DM; LINE: семейство *CRI* – *DMCRIA*; повторы: простой повтор (TATATG)_n, T-богатый повтор низкой сложности).

Следует отметить, что из 42 исследуемых клонов лишь 8 клонов не удалось обнаружить в составе ДНК хромосомы полигенных хромосом *D. virilis*.

Таким образом, большинство клонов хромосомы *D. oreana*, содержащие повторенные последовательности ДНК, были выявлены в хромосоме *D. virilis*. Среди них преобладали представители LTR-ретротранспозонов, в меньшей степени представлены не-LTR-ретротранспозоны (LINE) и ДНК-транспозоны. Среди LTR-ретротранспозонов были обнаружены: представители семейств *gypsy*, *Idefix*, *ZAM*, *Stalker*, *tv1*; также были обнаружены не-LTR-ретротранспозоны: *G3*, *Helena*, *I* (таблица). Таким образом, представители семейств *gypsy* преобладали над всеми остальными семействами МГЭ.

Кроме того, в хромосоме *D. virilis* выявлены клоны, содержащие МГЭ, относящиеся к ДНК-транспозонам: гелитроны (*DNAREP1_DM*; *Helitron1_DYak*) и полинтон (*Polinton-1_DY*) (таблица).

Интересен тот факт, что клоны, содержащие последовательности, гомологичные белок-кодирующим генам, оказались общими у хромосом *D. oreana* и *D. virilis*. Эти гены первоначально были локализованы в гетерохроматине хромосом разных видов подгруппы *melanogaster*. Вероятно, они относятся к так называемым ортологичным генам. Показано, что 86–98% белок-кодирующих генов, расположенных в гетерохроматине *D. melanogaster*, имеют ортологи в геномах четырех филогенетически близких видов – *Drosophila simulans* (Sturtevant, 1919), *Drosophila sechellia* (Tsacas, Baechli, 1981), *Drosophila erecta* (Tsacas, Lachaise, 1974), *Drosophila yakuba* (Burla, 1954); 55–70% генов, расположенных в гетерохроматине *D. melanogaster*, имеют ортологи у более эволюционно удаленных видов *Drosophila* (*Drosophila pseudoobscura* (Frolova, 1929), *Drosophila persimilis* (Dobzhansky and Epling, 1944), *D. virilis* и др.); для 22–46% белок-кодирующих генов, расположенных в районах гетерохроматина *D. melanogaster*, найдены ортологи

у других насекомых (*Anopheles gambiae* (Giles, 1902), *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) и др.) и 13% всех белок-кодирующих генов, локализующихся в районах гетерохроматина *D. melanogaster*, имеют ортологи у представителей наиболее эволюционно удаленных таксонов (*Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900), *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758) и т.д.) [4].

Заключение

Таким образом, несмотря на то что *D. orena* и *D. virilis* эволюционно отдалены друг от друга, ДНК прицентромерного гетерохроматина хромосом у этих видов содержит значительное количество общих последовательностей ДНК, среди которых: диспергированные повторы (МГЭ) – представители LTR-ретротранспозонов, LINE-элементы, ДНК-транспозоны; tandemные повторы, а также последовательности, гомологичные белок-кодирующим генам.

Литература

1. Carvalho A.B. Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome // Curr. Opin. Genet. Dev. 2002. № 12. P. 664–668.
2. Haupt W. The centromere1 (CEN1) region of *Arabidopsis thaliana*: architecture and functional impact of chromatin // Plant J. 2001. Vol. 27. P. 285–296.
3. Horvath J.E., Schwartz S., Eichler E.E. The mosaic structure of human pericentromeric DNA: a strategy for characterizing complex regions of the human genome // Genome Res. 2000. № 10. P. 839–852.
4. Smith C.D., Shu Sh., Mungall Ch.J., Karpen G.H. The Release 5.1 Annotation of *Drosophila melanogaster* Heterochromatin // Science. 2007. Vol. 316. P. 1586–1591.
5. Доувер Г., Браун С., Коэн Э. и др. Динамика эволюции генома и дифференцировка видов // Эволюция генома. М.: Мир, 1986. С. 329–356.
6. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э. Видовая архитектура хромосом генеративной ткани и проблема филогенетических отношений в подгруппе «*melanogaster*» рода *Drosophila* (*Sophophora*) // Генетика. 1994. Т. 30, № 4. С. 478–483.
7. Саленко В.Б. Полиморфизм эндогенного ретровируса МДГ4 (*gypsy*) в линиях рода *Drosophila* подгруппы *melanogaster*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2007. 24 с.
8. Throckmorton L.H. The *virilis* species group // The genetics and biology of *Drosophila*. 1982. Vol. 3B. P. 227–297.
9. Spicer G.S., Bell C.D. Molecular phylogeny of the *Drosophila virilis* species group (*Diptera: drosophilidae*) inferred from mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes // Ann. ent. Soc. Am. 2002. Vol. 95, № 2. P. 156–161.
10. Вассерлауф И.Э. Динамика ориентации хромосом в ядрах трофоцитов яичников у близкородственных видов подгруппы *D. melanogaster* и группы *D. virilis* // Вестн. Том. гос. ун-та. 2008. № 313. С. 205–214.
11. Clark A.G., Eisen M.B., Smith D.R. et al. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny // Nature. 2007. Vol. 450, № 8. P. 203–218.
12. Усов К.Е., Шелковникова Т.А., Вассерлауф И.Э. и др. Молекулярно-цитогенетический анализ прицентромерного гетерохроматина хромосом трофоцитов яичников у видов подгруппы *Drosophila melanogaster* // Цитология. 2008. Т. 50, № 12. С. 1044–1049.
13. Усов К.Е., Шелковникова Т.А., Стегний В.Н. Анализ состава ДНК хромосомы политенных хромосом трофоцитов яичников *Drosophila orena* // Генетика. 2011. Т. 47, № 4. С. 475–483.

14. Усов К.Е., Вассерлауф И.Э., Коханенко А.А. и др. Анализ трехмерной организации политенных хромосом в ядрах трофоцитов *Drosophila virilis* (Diptera: Drosophilidae) // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2013. № 1 (21). С. 173–183.

Поступила в редакцию 12.10.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 4 (24). P. 117–123

Konstantin E. Usov^{1,2}, Alina A. Kokhanenko², Vladimir N. Stegny^{1,2}

¹ Tomsk State University, Tomsk, Russia

² Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University, Tomsk, Russia

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE COMPOSITION
OF DNA PERICENTROMERIC HETEROCHROMATIN CHROMOSOMES
OF *Drosophila oreana* AND *Drosophila virilis* (Diptera: Drosophilidae)**

It is known that DNA sequences associated with heterochromatin are difficult for sequencing and subsequent analysis because of repeats enrichment. So, even finished and published genome sequencing projects of different organisms only contain information about the DNA sequences associated with euchromatin. Now, however, it is clear that understanding the principles of the eukaryotic genome functioning requires detailed information on the composition of its sequences. It should be noted that a comparative analysis of DNA in heterochromatin both phylogenetically close and distant taxa is relevant from the point of view of the problem of the evolution of genomes.

Previously, we obtained region-specific DNA library chromocenter of polytene chromosomes of *D. oreana* by microdissection. Next, on its basis we got a set of DNA clones and carried out their sequencing. The analysis of the clones using various software packages allowed to find out a wide variety of repetitive sequences among them (mobile genetic elements; tandem repeats) and the identified sequences homologous to the protein-coding genes. In addition, using microdissection method we obtained a region-specific DNA library chromocenter of polytene chromosomes of *D. virilis*. As part of this work, we carried out dot blot hybridization region-specific DNA libraries from the chromocenter *D. virilis* with characterized and annotated 42 DNA clones chromocenter *D. oreana*. That allowed us to obtain new data on the molecular composition of DNA chromocenter *D. virilis* and estimate, generally, conservative composition of pericentromeric heterochromatin DNA in these relatively distant in the phylogenetic relation to species like *D. oreana* and *D. virilis*. It should be noted that of 42 examined clones, only 8 failed to detect clones in the polytene chromosome DNA chromocenter *D. virilis*. Thus, it is established that, despite the evolutionary distance *D. oreana* and *D. virilis*, DNA pericentromeric heterochromatin of polytene chromosomes in these species contains a significant amount of common sequences such as dispersed repeats (mobile genetic elements) – LTR-retrotransposons, LINE-elements, DNA transposons, tandem repeats (minisatellites), and sequences homologous to the protein-encoding genes (the genes, apparently, belong to the so-called orthologs).

Key words: heterochromatin; DNA; polytene chromosomes; chromocenter; *Drosophila virilis*; *Drosophila oreana*.

Received October 12, 2013