

**ОСОБЕННОСТИ РЕТРОТРАНСПОЗИЦИОННОЙ
АКТИВНОСТИ ЭНДОГЕННОГО РЕТРОВИРУСА *gtwin*
В ЛИНИИ Г32 *DROSOPHILA MELANOGASTER***

© 2009 г. Ю. Э. Стефанов, А. П. Котнова, И. А. Глухов, Н. В. Любомирская,
академик Ю. В. Ильин

Поступило 22.09.2008 г.

Мобильные генетические элементы (МГЭ) составляют существенную часть генома эукариот и оказывают значительное влияние на его стабильность. МГЭ участвуют в процессах мутагенеза, регуляции экспрессии генов и формировании геномных перестроек. В связи с этим большой интерес представляет изучение механизмов регуляции активности самих мобильных элементов с участием клеточных факторов. Для этого удобно использовать такие модельные объекты, в геноме которых мобильные элементы перемещаются и амплифицируются.

На данный момент хорошо описано поведение мобильных элементов у различных видов дрозофил. Существует множество линий мух, в которых наблюдается генетическая нестабильность, вызванная амплификацией и перемещением МГЭ. В таких линиях отмечается повышенная частота мутаций и реверсий, а также образование хромосомных перестроек.

Лабораторная линия Г32 *D. melanogaster* характеризуется необычным поведением некоторых мобильных элементов. В частности, в этой линии существенно амплифицирован ретротранспозон *gtwin* – ближайший родственник одного из наиболее хорошо изученных мобильных элементов – *gypsy*. При этом свидетельств того, что в настоящее время *gtwin* перемещается, не было выявлено [1]. Помимо этого, мы обнаружили в данной линии крупную хромосомную аберрацию, внутри которой наблюдается повышенное число сайтов локализации *gtwin* и ряда других элементов [2].

Из литературных данных известно, что мобильные элементы распределяются в геноме неравномерно, что приводит к формированию кластеров, играющих важную роль в регуляции транспозиционной активности [3]. Принимая во внимание этот факт, а также то, что в линии Г32

число копий *gtwin* достигло порядка 30, что в десять раз превышает обычно наблюдаемое число копий этого элемента, мы предположили, что в данной линии разные копии *gtwin* могут соседствовать друг с другом.

В настоящей работе мы проанализировали наличие соседствующих друг с другом копий *gtwin* в ряде линий *D. melanogaster*, применяя метод ПЦР. В качестве матрицы использовалась геномная ДНК. Места отжига праймеров для ПЦР находились с обоих концов *gtwin* вблизи его длинных концевых повторов (ДКП), при этом синтез был направлен в сторону геномного окружения элемента.

Этот подход позволил не только обнаружить соседствующие копии ретротранспозона в геноме, но и выявить в линии Г32 кольцевые экстрахромосомные копии *gtwin*. Наличие таких структур в линии, где в настоящее время изучаемый элемент не перемещается, представляет большой интерес и говорит о том, что в клетке идет обратная транскрипция, однако по каким-то причинам уровень ее оказывается недостаточен для выявления перемещений элемента. Также это может свидетельствовать о возможных нарушениях в работе механизмов интеграции *gtwin* в геном клетки-хозяина.

Для сравнения было взято 9 линий мух *D. melanogaster*. В качестве матрицы для полимеразной цепной реакции использована тотальная ДНК, выделенная из мух по стандартной методике [4]. Прямой праймер был комплементарен области 6720–6744 *gtwin*, а обратный праймер – области 583–607 *gtwin*. При таких условиях источником для образования ПЦР-продуктов могли стать как две расположенные рядом копии элемента *gtwin*, так и кольцевые интермедиаты ретротранспозиции данного элемента (рис. 1). В результате нами были получены фрагменты длиной 3000, 1300 и 800 п.н., которые встречались у разных линий мух в разных сочетаниях.

Фрагмент длиной 3000 п.н. присутствовал среди продуктов реакции во всех исследованных ли-

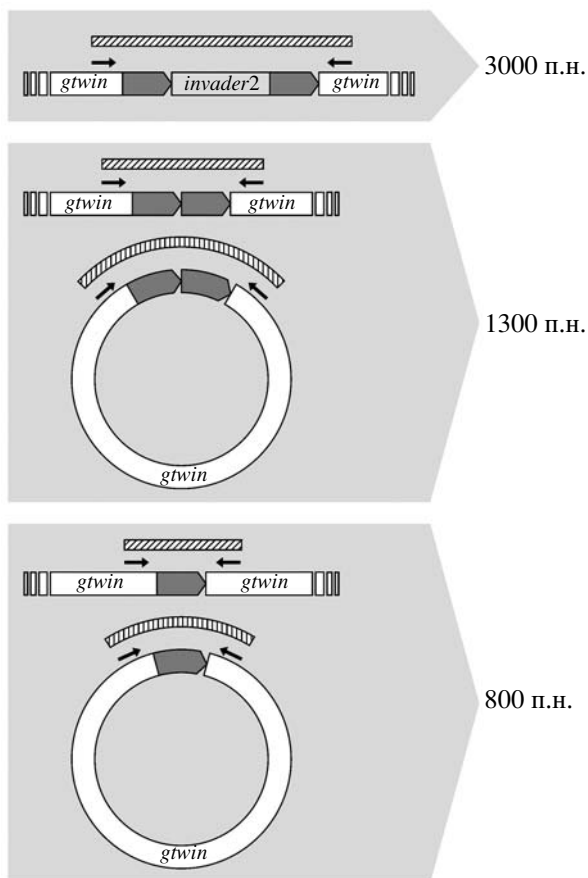


Рис. 1. Схема эксперимента. Получение трех описываемых ПЦР-продуктов. Линейные структуры соответствуют участкам генома, а кольцевые – экстрахромосомным копиям элемента. Темным отмечены ДКП *gtwin*, штриховкой отмечены ПЦР-продукты, а стрелками показаны места отжига праймеров.

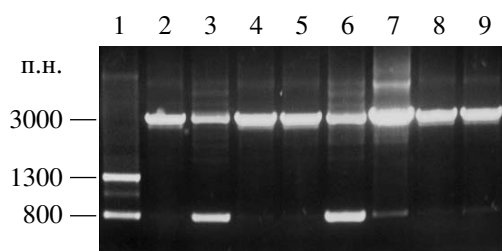


Рис. 2. ПЦР-продукты, полученные с препаратов тотальной ДНК исследованных линий. Представлена электрофореграмма с ПЦР-продуктами, полученными с тотальной ДНК линий мух. Дорожки с 1 по 9 соответствуют линиям Г32, Df1, Нальчик, Oregon1, CantonS, DK3, BL2400, ХХУ, MS.

ниях, кроме Г32. ПЦР-продукт такой длины может быть получен в том случае, если в геноме исследуемой линии две копии *gtwin* расположены рядом – на расстоянии около 1600 п.н. Нами был клонирован этот фрагмент и определена его нук-

леотидная последовательность, в результате чего мы выяснили, что между двумя последовательностями *gtwin* в нем находится участок мобильного элемента *invader2* [5]. Наблюдаемая структура могла возникнуть в результате последовательной инсерции двух копий *gtwin* внутрь последовательности *invader2*.

Интересно, что обе копии *gtwin* располагаются в этом фрагменте в одной ориентации, тогда как участок элемента *invader2* располагается в ориентации противоположенной, что может приводить к появлению антисмысловой РНК *gtwin*, которая может участвовать в процессе РНК-сайленсинга [6]. Исходя из этого, нельзя исключать, что подобная структура может играть роль в регуляции активности *gtwin*. Также очевидно, что данный участок появился в геноме давно и является консервативным, поскольку он присутствует во всех исследованных линиях, кроме Г32.

В некоторых исследованных линиях присутствовал фрагмент длиной 800 п.н. Этот фрагмент также был клонирован и секвенирован. Оказалось, что фрагмент содержит один ДКП *gtwin*. Матрицей для такого продукта может служить как участок генома, в котором две копии *gtwin* содержат один общий ДКП (такая структура присутствует в секвенированном геноме дрозофилы под номером AC006215), так и кольцевая экстрахромосомная копия, содержащая один ДКП. Данные кольцевые структуры могут образовываться в результате рекомбинации между ДКП мобильного элемента – как из линейного продукта обратной транскрипции, так и из уже интегрированного в геном (тогда на месте его встраивания остается один ДКП).

Фрагмент длиной 1300 п.н. был обнаружен только в линии Г32 (рис. 2). В состав этого фрагмента входили два ДКП *gtwin*, следующих друг за другом в одинаковой ориентации. Матрицей для такого фрагмента также мог стать как участок генома, так и кольцевая экстрахромосомная структура. Для более детального анализа полученных последовательностей фрагменты длиной 1300 п.н. из линии Г32 были клонированы с использованием векторной системы pGEM T-Easy компании "Promega". Клоны необходимой длины отбирали путем рестрикционного анализа и впоследствии секвенировали. Для этого были использованы те же праймеры, что и для проведения ПЦР.

В результате секвенирования 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 нуклеоти-

дов (табл. 1). Три обнаруженных полиморфных сайта приходились на область ДКП, а два – на 5'-нетранслируемую область ретротранспозона в районе связывания тРНК-затравки для синтеза минус-цепи кДНК. Особый интерес представляют замены в позициях 497 и 503, так как они затрагивают район 495–508, в котором расположен сайт связывания тРНК-затравки, необходимой для обратной транскрипции [7].

Среди 17 исследованных клонов 12 содержали замену остатка гуанина на остаток аденина в 497-й позиции. Такая замена должна приводить к снижению эффективности отжига тРНК-затравки для синтеза минус-цепи ДНК при обратной транскрипции, так как представляется маловероятным, что в линии Г32 все тРНК имеют на 3'-конце ТСА вместо обычных ССА. Более того, 15 из 17 клонов в положении 503 имеют G вместо A, что также должно снижать эффективность связывания затравки в том случае, если используется нормальная тРНК.

Интересно, что у ретротранспозона *gypsy*, который использует для синтеза минус-цепи ДНК ту же тРНК, участок связывания затравки короче на 3 нуклеотида, но не содержит никаких замен. Полученные данные можно объяснить тем, что такое увеличение района связывания тРНК компенсирует две замены, снижающие эффективность отжига затравки. Не исключено также, что в одном из генов tRNA-Lys в линии Г32 произошла замена, соответствующая изменению в *gtwin*, и именно эта тРНК используется элементом для инициации обратной транскрипции. В пользу этого может свидетельствовать и тот факт, что среди проанализированных геномных копий *gtwin* в линии Г32 все имеют G в положении 503. Интересно, что среди геномных копий *gtwin* в данной линии подавляющее большинство имеет A в положении 497, а среди экстрахромосомных копий 5 из 17 имеют G в этой позиции, что полностью соответствует 3'-концу тРНК. Тем не менее боль-

Таблица 1. Сравнение нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов копий *gtwin*, содержащих два примыкающих друг к другу ДКП

Клон	Полиморфный сайт					Число уникальных замен
	226	381	434	497	503	
1.2	A	T	G	A	G	0
11.21	A	T	G	A	G	1
2.19	A	T	G	A	G	3
2.18	A	T	G	A	G	0
5.24	A	T	G	A	G	2
7.24	A	T	G	A	G	0
12.2	A	T	G	A	G	3
13.10	A	T	G	G	G	1
12.23	T	C	A	A	G	3
13.19	T	C	A	A	G	4
12.9	T	C	A	A	G	1
5.21	T	C	A	G	G	0
8.14	T	C	A	A	G	0
14.16	A	C	A	G	A	1
5.23	A	C	A	G	A	0
9.8	A	C	A	G	G	1
2.2	A	C	A	A	G	2
<i>gtw_dim</i>	A	T	A	G	A	4
Последовательность, комплементарная 3'-концу Lys тРНК						
TGGCGCCCAACGTG						

шинство выявленных кольцевых молекул ДНК относятся к I типу и содержат в положении 497 “неправильный” нуклеотид. Исходя из этих результатов, можно заключить, что именно копия *gtwin*, содержащая замену в позиции 497, активно амплифицировалась и перемещалась в линии Г32. Возможно, что данная копия ретротранспозона имеет какие-либо структурные особенности, давшие ей селективное преимущество.



Рис. 3. Области смыкания двух ДКП. Показаны концевые участки ДКП *gtwin*, выделенные из ПЦР-продукта с тотальной ДНК мух линии Г32. Светло-серым цветом отмечены области с заменами, темно-серым – полностью идентичные области. Отсутствие нуклеотидов показано штрихом.

В полученных клонах различия наблюдались не только в ДКП, но и области последовательностей между ДКП. Как видно на рис. 3, в 9 из 17 полученных нами клонов ДКП *gtwin* непосредственно соседствовали друг с другом – без вставок или делеций нуклеотидных остатков. В четырех случаях между ДКП обнаружались вставки от 1 до 13 нуклеотидов, а остальные 4 клон несли делеции различной длины (от 1 до 80 остатков).

Характерной особенностью полученных клонов является то, что ДКП в составе одного клон идентичны, в то время как различия между ДКП разных клонов составляют примерно 2%. Это является косвенным свидетельством в пользу того, что ДКП принадлежат одному элементу, следовательно, полученные последовательности скорее всего синтезировались на экстрахромосомных молекулах ДНК, образовавшихся в результате замыкания в кольцо линейного ДНК-интермедиата ретротранспозиции *gtwin*.

Подобные кольцевые экстрахромосомные копии ретротранспозонов могут образовываться не только как интермедиаты ретротранспозиции, но и в результате точного вырезания МГЭ интегразой, которое сопровождается замыканием молекулы в кольцо. Однако в этом случае можно ожидать присутствие 4 нуклеотидов (следствие дубликации сайта интеграции ретротранспозона) между двух ДКП. В данном исследовании такого обнаружено не было.

Таким образом, в настоящей работе нами выявлены структуры, которые с высокой вероятностью являются экстрахромосомными кольцевыми копиями *gtwin*, содержащими между ДКП как инсерции, так и делеции, а также копиями, в которых полноценные ДКП соединены друг с другом. Эти данные хорошо согласуются с данными Эндрю Фладела и соавторов, которые выдвинули гипотезу о том, что экстрахромосомные кольцевые копии ретровирусов, не содержащие вставок и де-

леций между ДКП, могут быть интермедиатами транспозиции, тогда как копии, содержащие вставки и делеции, вполне возможно, могут являться продуктами неточного вырезания элементов из генома [8].

Тот факт, что в линии Г32, по-видимому, обнаруживаются кольцевые молекулы *gtwin*, может свидетельствовать о наличии в линии обратной транскрипции этого элемента, которая по каким-то причинам не завершается появлением новых геномных копий *gtwin*. Возможно, в данной линии регуляция ретротранспозиционной активности данного МГЭ осуществляется на уровне работы интегразы, что может представлять особый интерес и требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-00227а), “Ведущих научных школ” (НШ-2994.2008.4) и “Молодые кандидаты” МК-5439.2008.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котнова А.П., Карпова Н.Н., Феоктистова М.А. и др. // Генетика. 2005. Т. 41. № 1. С. 23–29.
2. Стефанов Ю.Э., Котнова А.П., Пасюкова Е.Г. и др. // ДАН. 2007. 413. № 1. С. 76–78.
3. Kaminker J.S., Bergman C.M., Kronmiller B. et al. // Genome Biol. 2002. V. 3. № 12.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
5. Kapitonov V.V., Jurka J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 11. P. 6559–6574.
6. Brennecke J., Aravin A.A., Stark A. et al. // Cell. 2007. V. 128. № 6. P. 1089–1103.
7. Marquet R., Isel C., Ehresmann C., Ehresmann B. // Biochimie. 1995. V. 77. № 1/2. P. 113–124.
8. Flavell A.J., Brierley C. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 9. P. 3659–3669.