

РЕТРОТРАНСПОЗОН *gtwin* В ЛАБОРАТОРНОЙ ЛИНИИ  
Г-32 *Drosophila melanogaster*: ПОВЫШЕННОЕ ЧИСЛО КОПИЙ  
ЭЛЕМЕНТА В ГЕНОМЕ ПРИВЕЛО К ВОЗНИКНОВЕНИЮ  
ХРОМОСОМНОЙ АБЕРРАЦИИ

© 2007 г. Ю. Э. Стефанов, А. П. Котнова, Е. Г. Пасюкова, Н. В. Любомирская, А. И. Ким,  
академик Ю. В. Ильин

Поступило 27.10.2006 г.

Геном любого эукариотического организма включает значительное количество мобильных генетических элементов (МГЭ). В разных случаях на долю мобильной ДНК приходится от 10 до 90% всего генома [1]. МГЭ могут самыми различными способами воздействовать на функционирование генома организма-хозяина и его стабильность [2]. Мобильный элемент *gtwin*, относящийся к семейству *Ty3/gypsy* ретротранспозонов, был впервые клонирован из лабораторной линии Г-32 *Drosophila melanogaster*, в которой этот элемент амплифицирован по сравнению с другими линиями [3].

Можно было предположить, что амплификация является следствием увеличения частоты транспозиций *gtwin* в линии Г-32. Целью настоящей работы стало исследование особенностей локализации *gtwin* и ряда других МГЭ (ретротранспозонов: *gypsy*, *roo*, *springer*, 297, 412, *Beagle*; LINE-подобных ретроэлементов: *Doc*, *jockey*) на политенных хромосомах личинок линии Г-32.

В ходе работы было выявлено наличие в линии Г-32 крупной хромосомной перестройки, по краям которой локализован МГЭ *gtwin*, причем особи, содержащие такую aberrацию, встречались значительно чаще, чем особи со структурно нормальными хромосомами. Отсутствие внутрилинейного полиморфизма в локализации *gtwin* как в структурно нормальных, так и в перестроенных хромосомах указывает на то, что транспозиции, приведшие к его амплификации, происходили в прошлом. Подавляющее большинство ин-

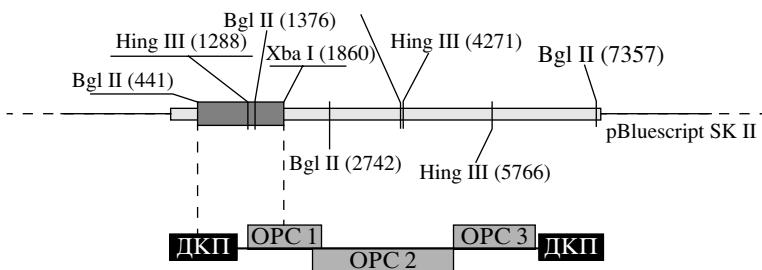
серий накопилось в структурно перестроенной третьей хромосоме. Локализация *gtwin* по краям перестройки позволяет предположить, что причиной возникновения aberrации могла стать рекомбинация между копиями данного элемента. Помимо *gtwin*, в исследуемой линии амплифицирован и подвергается транспозициям LINE-подобный элемент *jockey*.

Для исследования локализации МГЭ *gtwin* в геноме линии Г-32 была создана конструкция на основе плазиды 12.1GT, содержащей полноразмерный ретротранспозон *gtwin* (рис. 1). Исходную плазиду использовать в качестве зонда было невозможно, поскольку ретротранспозон *gtwin* имеет значительные участки гомологии с ретротранспозоном МДГ4 (*gypsy*) в области второй и третьей ОРС [3–5]. Поэтому для создания зонда необходимо было взять участок ДКП и фрагмент первой ОРС *gtwin*.

Плазиды 12.1GT были обработаны рестрикционными эндонуклеазами в следующих сочетаниях: а) BglII – HindIII, б) HindIII – XbaI. Полученные фрагменты разделяли методом электрофореза в агарозном геле, после чего выделяли фрагменты BglII (441) – HindIII (1288) и HindIII (1288) – XbaI (1860) и лигировали их с плазидным вектором pBluescript SK II, линеаризованным обработкой рестрикционными эндонуклеазами BamHI и XbaI. В результате получили зонд 12.1GT-BX, содержащий область BglII(441) – XbaI(1860) ретротранспозона *gtwin*, не имеющий значимой гомологии с МДГ4. Зонды, изготовленные на основе других мобильных элементов, взятых в исследование, были представлены полноразмерными их копиями, клонированными в составе плазиды pBluescript SK II.

Полученные зонды метили методом ник-трансляции с использованием BioNick<sup>TM</sup> Labelling System (Invitrogen) согласно инструкциям производителя, денатурировали при 70°C в течение 10 мин и использовали для гибридизации *in situ* с политенных

Институт молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта  
Российской Академии наук, Москва  
Институт молекулярной генетики Российской  
Академии наук, Москва  
Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова



**Рис. 1.** Схема строения конструкции 12.1GT. Вверху показана конструкция 12.1GT, содержащая полноразмерный ре-транспозон *gtwin*. Указаны сайты рестрикций эндонуклеаз, использованных для приготовления гибридизационного зонда. Фрагмент, вошедший в состав зонда, отмечен более крупным и темным прямоугольником. Внизу изображена схема МГЭ *gtwin* и штриховыми линиями отмечена часть ДКП и половина первой ОРС данного элемента, вошедшие в состав зонда.

ми хромосомами слюнных желез личинок *D. melanogaster* линии Г-32.

Приготовление препаратов проводили по стандартной методике. Слюнные железы извлекали из личинок третьего возраста, выращенных при 16–20°C, в 50%-ной уксусной кислоте, очищали от жировой ткани, распределяли материал по предметному стеклу в капле 50% уксусной кислоты и раздавливали между предметным стеклом и силиконизированным покровным стеклом. Препарат замораживали на 5 мин при температуре кипения жидкого азота, скальывали покровное стекло и обрабатывали в 96%-ном этаноле, после чего высушивали и контролировали его качество в фазово-контрастном микроскопе.

Гибридизацию *in situ* проводили по методике Монтгомери с соавторами [6]. Политенные хромосомы денатурировали в растворе 0.1М NaOH. Гибридизацию проводили при 37°C в течение ночи во влажной камере. Проявление и визуализацию метки осуществляли с использованием набора реактивов ABC Elite фирмы “Vector Laboratories, Inc.” с последующей обработкой в растворе диаминобензидин тетрагидрохлорида. Препараты окрашивали красителем Giemsa в течение 5–7 мин.

**Таблица 1.** Соотношение особей с инверсиями и со структурно нормальными хромосомами в линии Г-32

Отводка	Число проанализированных личинок	Число препаратов без инверсий
1	17	0
2	9	3
3	10	0
4	12	0
5	8	0
6	11	2
7	12	5
Всего	79	10

Линия Г-32 представлена семью изоматеринскими отводками. Оказалось, что в каждой отводке у подавляющего большинства исследованных особей (табл. 1) в геноме присутствует крупная аберрация, представленная двумя парацентрическими инверсиями, расположенными в третьей хромосоме. Точки разрыва инверсии в плече 3L находятся между подсекциями 63C и 63D и в подсекции 72E. В плече 3R разрывы располагаются в подсекциях 86F и 97A. Интересно, что две данные инверсии не встречаются отдельно друг от друга. Причины этого неясны. На всех исследованных препаратах наблюдается нормальная структура околоцентромерной области третьей хромосомы, что не позволяет объяснить наблюдаемый факт присутствием в линии Г-32 множественной перицентрической инверсии. Во всех отводках линии хромосома с инверсиями встречается только в гетерозиготном состоянии. Это позволяет предположить, что в гомозиготном состоянии она является летальной. В то же время обращает на себя внимание тот факт, что в ряде отводок линии Г-32 особи без инверсии обнаружены не были (табл. 1). Очевидно, что, поскольку гомозиготы по инверсии летальны, в каждой отводке должны выщепляться особи с нормальными хромосомами. В случае скрещивания гетерозиготных мух между собой гомозиготы без инверсии должны составлять треть потомства, в случае скрещивания мух, содержащих инверсии с особями, не содержащими их, – половину потомства, а в случае скрещивания особей со структурно нормальными хромосомами между собой – все потомство. Таким образом, если наличие инверсий никак не влияет на приспособленность мух линии Г-32, то частота встречаемости особей с нормальными хромосомами в ней должна быть не менее трети, чего в действительности не наблюдается.

Отметим, что личинок для приготовления препаратов отбирали из каждой культуры в течение 6–8 дней. При этом особи, не содержащие перестройку в третьей хромосоме, никогда не выполняли из корма для окукливания первыми, а всегда

**Таблица 2.** Сайты локализации МГЭ *gtwin* на политеческих хромосомах личинок линии Г-32

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

Примечание. Сайты, локализованные в аберрантной хромосоме, выделены полужирным шрифтом. Сайты, локализованные в точках разрыва инверсий, подчеркнуты.

развивались несколько медленнее. Выявление причин снижения приспособленности особей, гомозиготных по структурно нормальным хромосомам, является предметом дальнейших исследований.

При проведении точной локализации сайтов гибридизации *gtwin* на препаратах как с инверсиями, так и без них оказалось, что все препараты без инверсий (проанализировано 10 препаратов) содержали 8 одинаковых сайтов гибридизации, а препараты с инверсиями (проанализировано 20

препаратах) – те же 8 сайтов плюс 17 одинаковых дополнительных сайтов, локализованных в аберрантной третьей хромосоме (табл. 2).

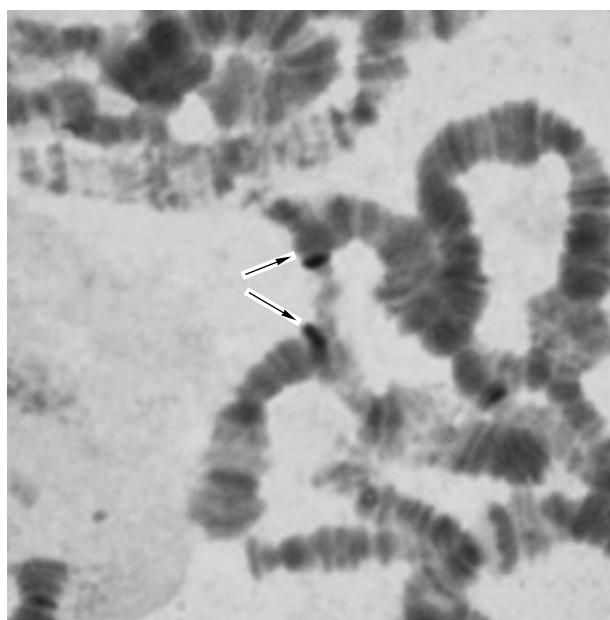
Отсутствие полиморфизма по локализации *gtwin* как в структурно нормальных, так и в аберрантных хромосомах свидетельствует о том, что в настоящее время *gtwin* в линии Г-32 не перемещается, однако в прошлом транспозиции данного элемента, очевидно, имели место. При сравнении сайтов локализации *gtwin* и точек разрыва хромосомных инверсий выяснилось, что в непосредственной близости от каждой из точек разрыва обнаруживается место локализации данного МГЭ (рис. 2). Этот факт является указанием на то, что появление перестроек могли спровоцировать события эктопической рекомбинации между последовательностями *gtwin*. Клонирование терминальных областей инверсий с целью подтверждения гипотезы о роли *gtwin* в их формировании также является дальнейшей целью работы.

Помимо *gtwin*, в линии Г-32 были определены места локализации ретротранспозонов *gypsy*, *roo*, *springer*, 297, 412 и *Beagle*, а также LINE-подобных элементов *Doc* и *jockey* (данные не показаны). По всем элементам, кроме *jockey*, полиморфизм обнаружен не был, и их число не отличалось от нормального числа мест их локализации в геноме *D. melanogaster* согласно литературным данным [7]. По сайтам локализации ретроэлемента *jockey* имелся полиморфизм, причем характер этого полиморфизма свидетельствует о том, что данный элемент подвергается не только герминальным, но и соматическим транспозициям. В связи с этим планируется подробнее изучить распределение *jockey* и других LINE-элементов на политеческих хромосомах линии Г-32 с целью более детального анализа их поведения в исследуемой линии.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (05-04-49554, 05-04-49080) и Ведущих научных школ (НШ-4216.2006.4).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nuzhdin S.V. // Genetica. 1999. V. 107. № 1/3. P. 129–137.
2. Brookfield J.F. // Nat. Rev. Genet. 2005. V. 6. № 2. P. 128–136.
3. Котнова А.П., Карпова Н.Н., Феоктистова М.А. и др. // Генетика. 2005. Т. 41. № 1. С. 23–29.
4. Kapitonov V.V., Jurka J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 11. P. 6569–6574.
5. Bowen N.J., McDonald J.F. // Genome Res. 2001. V. 11. № 9. P. 1527–1540.
6. Montgomery E.A., Langley C.H. // Genetics. 1983. V. 104. P. 473–483.
7. Kaminker J.S., Bergman C.M., Kronmiller B. et al. // Genome Biol. 2002. V. 3. № 12.



**Рис. 2.** Локализация *gtwin* на политеческих хромосомах личинок линии Г-32. Показан участок плеча 3R, содержащий инверсию. Стрелками отмечены сайты локализации *gtwin*, находящиеся в непосредственной близости от точек разрыва этой аберрации.