

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ *LITTORINA SAXATILIS*

Пузаков М.В., Пузакова Л.В.

ФГБУН Институт природно-технических систем

ул. Ленина, 28, г. Севастополь, 299011, РФ

e-mail: puzakov@ngs.ru

**Аннотация.** В данной работе была изучена представленность мобильных генетических элементов (МГЭ) в геноме морского брюхоногого моллюска *Littorina saxatilis*. Нами были исследованы нуклеотидные последовательности протяженностью около 360 тыс. пар нуклеотидов. В результате анализа в геноме *L. saxatilis* были обнаружены повторы, имеющие сходство как с ретротранспозонами, так и с ДНК-транспозонами. Количество выявленных ретротранспозонов превышало количество ДНК-транспозонов в два с половиной раза (77 и 30, соответственно), что согласуется с тем, что репликативный способ перемещения способствует накоплению МГЭ в геноме. Среди ретротранспозонов наиболее представлены элементы семейств *Copia*, *Gypsy*, *CR1* и *DIRS*. У ДНК-транспозонов самыми многочисленными оказались семейства *Mariner*, *hAT* и *Sola*. Далее планируется изучить структуры обнаруженных повторов и определить какие из них являются потенциально функциональными МГЭ.

**Ключевые слова:** ДНК, мобильные генетические элементы, стрессовая индукция, инсерционный мутагенез, *Littorina saxatilis*

STUDY OF THE DISTRIBUTION OF TRANSPOSABLE ELEMENTS IN THE GENOME *LITTORINA SAXATILIS*

Puzakov M.V., Puzakova L.V.

Institute of natural-technical systems

Lenina st., 28, Sevastopol, 299011, Russia

e-mail: puzakov@ngs.ru

**Abstract.** In this work it was studied the distribution of transposable elements (TE) in the genome of the marine gastropod *Littorina saxatilis*. We investigated the nucleotide sequence of a length of about 360 thousand bp. Genome analysis *L. saxatilis* has revealed the repeats that are similar to the retrotransposons and DNA-transposons. The number of detected retrotransposons was higher than the amount of DNA-transposons in two and a half times (77 and 30, respectively). This is consistent with the fact that the replicative way to move contributes to the accumulation of the TE in the genome. Among the most widely represented retrotransposons were members of families of *Copia*, *Gypsy*, *CR1* and *DIRS*. Among the DNA transposons were the most numerous family of *Mariner*, *hAT* and *Sola*. Further, we going to study the structure of the detected repetition to determine which ones are potentially functional TE.

**Key words:** DNA, transposable elements, stress induction, insertional mutagenesis, *Littorina saxatilis*

Известно, что физические воздействия как природного, так и антропогенного происхождения оказывают влияние на физиологические и биохимические процессы, происходящие в организмах. Также есть данные, что подобные факторы способны воздействовать и на молекулы ДНК, активизируя мобильные генетические элементы (МГЭ) и индуцируя инсерционный мутагенез [1]. На сегодняшний день известен ряд физических стрессорных факторов, таких как изменения температуры, ультрафиолетовое излучение, электромагнитные поля, гамма-радиация и др., которые могут приводить к активизации перемещений МГЭ [2-5]. В результате транспозиций мобильные элементы способны изменять первичную структуру ДНК, влиять на работу генов, вмешиваться в процессы регуляции транскрипции, вызывать хромосомные перестройки. Закономерным следствием инсерционного мутагенеза является увеличение генетической нестабильности, характеризующейся быстрым накоплением в популяции случайных мутаций. В связи с этим предполагается, что мобильные генетические элементы играют значительную роль в адаптации организмов к окружающей среде и в эволюции генома [6]. В последние годы мутагенный эффект МГЭ все чаще рассматривается в связи с возможностью быстрой реорганизации генома и способами создания новых моделей регулирования и реструктуризации хромосом [7].

Мобильными генетическими элементами называют последовательности ДНК, которые имеют определенную структуру и способны интегрироваться в новые участки генома клетки хозяина. Они были обнаружены Барбарой Макклиток при исследовании явления мозаичности початков кукурузы в 1950 году, за это открытие она в 1983 году получила Нобелевскую премию [8]. На сегодняшний день МГЭ обнаружены у всех исследованных организмов [9]. Однако доля мобильных генетических элементов в геноме может существенно различаться. Так, например, у млекопитающих МГЭ и их фрагменты составляют почти половину генома 35-69 % [10], а у некоторых растений их содержание в геноме достигает 90 % [11], в тоже время, у иглобрюхих рыб мобильные генетические элементы составляют всего 3-7 % генома [12].

В основу классификации мобильных генетических элементов положены структурно-функциональные различия [13], в соответствии с которыми МГЭ поделены на ретротранспозоны (класс I) и ДНК-транспозоны (класс II). Представители класса I используют репликативный способ перемещения, где в качестве посредника выступает транскрибируемая с них РНК, такой механизм называют «копирование-вставка» (“copy-and-paste”). Ретротранспозоны включают четыре подкласса: LTR-ретротранспозоны, non-LTR-ретротранспозоны, *DIRS* и *PLE*. LTR-ретротранспозоны фланкированы с обеих сторон длинными концевыми повторами (long terminal

repeat, LTR), в центральной части у них локализованы гены, кодирующие белки, необходимые для копирования и антигены групповой специфичности. Некоторые представители этого подкласса имеют функциональные гены, кодирующие белки капсида, поэтому их относят к семейству эндогенных ретровирусов. Подкласс non-LTR-ретротранспозонов, включает в себя два надсемейства — автономные (*LINE*) и не автономные (*SINE*) ретропозоны. Элементы надсемейства *LINE* (long interspersed nuclear element), также как и LTR-ретротранспозоны, имеют гены, кодирующие ферменты необходимые для их копирования, однако у них отсутствуют длинные концевые повторы. Элементы надсемейства *SINE* (short interspersed nuclear element) не способны перемещаться самостоятельно, они используют для этих целей ферментативный аппарат ретропозонов *LINE*. Элементы подклассов *DIRS* и *PLE* имеют структуры, объединяющие в себе признаки двух первых подклассов, но имеющие и собственные черты.

МГЭ класса II используют для перемещения механизм, названный «вырезание-вставка» (“cut-and-paste”). ДНК мобильного генетического элемента вырезается из генома хозяина с помощью фермента транспозазы, кодируемого самим транспозоном, и встраивается в другой участок геномной ДНК. Здесь выделяют три основных группы: классические ДНК-транспозоны, хелитроны (*Helitrons*) и полинтоны (*Polintons*). Первый подкласс включает в себя типичные ДНК-транспозоны, имеющие концевые инвертированные повторы (terminal inverted repeat) и ген, кодирующий транспозазу, которая распознает концевые повторы конкретных МГЭ. Хелитроны – особый тип транспозонов, которые перемещаются по типу катящегося кольца (rolling-circle DNA transposons). Полинтоны – самосинтезирующиеся ДНК-транспозоны.

Таблица 1 – Представленность ретропозонов

Подкласс МГЭ	Суперсемейство МГЭ	CT027673.30 158 590 п.н.	CT476813.18 87 089 п.н.	CR974470.8 113 198 п.н.	Всего	
LTR-ретротранспозоны	<i>Copia</i>	1	-	5	6	24
	<i>Gypsy</i>	5	6	6	17	
	<i>ERV</i>	1	-	-	1	
	<i>BEL</i>	-	-	-	-	
Non-LTR-ретротранспозоны	<i>CR1</i>	4	2	2	8	32
	<i>Daphne</i>	2	1	-	3	
	<i>CRE</i>	-	-	-	-	
	<i>I</i>	-	1	-	1	
	<i>Kiri</i>	1	-	-	1	
	<i>Loa</i>	-	-	-	-	
	<i>L1</i>	-	-	1	1	
	<i>L2</i>	2	-	-	2	
	<i>NeSL</i>	-	-	1	1	
	<i>Proto</i>	-	-	-	-	
	<i>Crack</i>	-	-	-	-	
	<i>Nimb</i>	-	1	-	1	
	<i>R1</i>	-	1	-	1	
	<i>RTE</i>	1	-	2	3	
	<i>RTEX</i>	-	5	-	5	
<i>SINE</i>	-	-	1	1		
<i>Tad1</i>	-	-	-	-		
<i>Tx1</i>	-	3	1	4		
<i>DIRS</i>	<i>DIRS</i>	15	-	6	21	21
<i>PLE</i>	<i>Penelope</i>	-	-	-	-	-
Всего		32	20	25	77	

Репликативный способ транспозиции, свойственный ретротранспозонам, позволяет при их активизации в короткие сроки увеличить число копий элемента, что влечет за собой увеличение размера генома хозяина [14, 15]. Кроме того мутации, возникающие в результате инсерций ретротранспозонов, остаются стабильными, в отличие от мутаций, вызываемых ДНК-транспозонами, которые покидают исходный сайт в результате транспозиции и встраиваются в другой район генома [16, 17].

Роль МГЭ в геноме активно изучается во многих аспектах. Известно, что МГЭ могут участвовать в различных значимых процессах, происходящих в клетке, что свидетельствует в пользу идеи коэволюции МГЭ и хозяйских геномов. МГЭ могут быть предшественниками факторов транскрипции и других компонентов эукариотических систем регулирования [18, 19]. Также к таким процессам относят достраивание теломерных концов у дрожозифилы мобильными элементами *HeT-A* и *TART* [20] или активное поведение МГЭ в геноме в условиях стресса.

МГЭ широко изучены у наземных организмов, тогда как у морских организмов их представленность и динамика изучены значительно меньше. В данной работе мы систематизировали и проанализировали результаты исследований МГЭ в геномах разных групп морских беспозвоночных.

В целом, исследования спектра представленности и динамики мобильных генетических элементов в геномах различных видов, в том числе в геномах организмов, которые еще не секвенированы, способствует большему пониманию как молекулярной эволюции геномов, так и эволюционной истории видов, и поэтому представляет собой хотя и сложную, но актуальную задачу в настоящем и в перспективе [21].

В данной работе мы изучали представленность МГЭ в геноме морского брюхоногого моллюска *Littorina saxatilis*. Нами были исследованы три нуклеотидные последовательности, размещенные в базе данных NCBI (СТ027673.30, СТ476813.18, CR974470.8) общей протяженностью 358 877 пар нуклеотидов (п.н.) Анализ проводился с помощью программы SENSOR [22], которая позволяет сравнивать исследуемые нуклеотидные последовательности с известными МГЭ, размещенными в базе данных повторенных последовательностей RepBase [23]. В результате анализа в геноме *L. saxatilis* были обнаружены повторы, имеющие сходство как с ретротранспозонами, так и с ДНК-транспозонами (см. табл. 1, 2).

Таблица 2. Представленность ДНК-транспозонов

Подкласс МГЭ	Суперсемейство МГЭ	СТ027673.30 158 590 п.н.	СТ476813.18 87 089 п.н.	CR974470.8 113 198 п.н.	Всего	
ДНК-транспозоны	<i>EnSpm/CACTA</i>	-	-	1	1	29
	<i>Ginger</i>	1	-	1	2	
	<i>ISL2EU</i>	1	-	-	1	
	<i>Kolobok</i>	1	1	-	2	
	<i>Dada</i>	-	-	-	-	
	<i>Mariner/Tc1</i>	5	1	-	6	
	<i>Novosib</i>	-	1	-	1	
	<i>Sola</i>	1	2	3	6	
	<i>Zisupton</i>	-	2	1	3	
	<i>Zator</i>	-	-	-	-	
	<i>Academ</i>	-	-	-	-	
	<i>hAT</i>	2	2	3	7	
	<i>MuDR</i>	-	-	-	-	
	<i>piggyBac</i>	-	-	-	-	
	<i>P</i>	-	-	-	-	
	<i>Harbinger</i>	-	-	-	-	
<i>Transib</i>	-	-	-	-		
<i>Crypton</i>	-	-	-	-		
<i>Helitron</i>	<i>Helitron</i>	1	-	-	1	1
<i>Polinton</i>	<i>Polinton</i>	-	-	-	-	-
Всего		12	9	9	30	

Количество выявленных ретротранспозонов превышало количество ДНК-транспозонов в два с половиной раза (77 и 30, соответственно), что согласуется с приведенным выше положением о том, что репликативный способ перемещения способствует накоплению МГЭ в геноме.

В исследуемых нуклеотидных последовательностях было обнаружено три семейства LTR-ретротранспозонов из четырех. Количество элементов семейств *Copia* и *Gypsy* различалось почти в три раза (6 и 17, соответственно). Ранее было показано, что ретротранспозоны семейства *Copia* представлены в геномах многоклеточных гораздо реже, чем ретротранспозоны семейства *Gypsy*, при этом они еще и менее разнообразны [24]. Авторы предполагают, что это может свидетельствовать о большей приспособляемости и фенотипической пластичности *Gypsy*, позволившим этим элементам более успешно эволюционировать и распространиться среди геномов по сравнению с элементами *Copia*. Количество non-LTR-ретротранспозонов было выше чем количество LTR-ретротранспозонов, однако состав семейств также был не полон. Тринадцать выявленных семейств было представлено небольшим количеством копий ретротранспозонов, от 1 до 8. Подкласс *DIRS* был представлен довольно многочисленно – 21 ретротранспозоном. Повторы, имеющие сходство с элементами подкласса *PLE*, обнаружены не были.

Среди выявленных девяти семейств (из 18) ДНК-транспозонов наиболее многочисленно были представлены элементы трех семейств – *Mariner*, *hAT* и *Sola* (6-7 копий). Остальные семейства насчитывали от 1 до 3 копий. Также был обнаружен один элемент подкласса *Helitron*. Элементы подкласса *Polinton* выявлены не были.

Данный результат является промежуточным, далее планируется изучить структуры обнаруженных повторов для того, чтобы выяснить какие из них являются полноразмерными и потенциально функциональными мобильными генетическими элементами, а какие делетированными формами или отдельными фрагментами.

#### Список литературы / References:

1. Юрченко Н.Н., Коваленко Л.В., Захаров И.К. Мобильные генетические элементы: нестабильность генов и геномов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2011, № 15 (2), с. 261-270. [Yurchenko N.N., Kovalenko L.V., Zakharov I.K. Transposable elements: instability of genes and genomes. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*, 2011, vol. 15 (2), pp. 261-270. (In Russ.)]
2. Chow K.C., Tung W.L. Magnetic field exposure stimulates transposition through the induction of DnaK/J synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000, vol. 270 (3), pp. 745-748.
3. Бубенщикова Е.В., Антоненко О.В., Васильева Л.В., Ратнер В.А. Индукция транспозиций МГЭ 412 отдельно тепловым и холодным шоком в сперматогенезе у самцов дрозофилы. *Генетика*, 2002, № 38 (1), с. 46-55. [Bubenshchikova E.V., Antonenko O.V., Vasil'eva L.A., Ratner V.A. Induction of MGE 412 transposition individually by heat and cold shock in spermatogenesis in *Drosophila* males. *Genetika*, 2002, vol. 38 (1), pp. 46-55. (In Russ.)]
4. Del Re B., Garoia F., Mesirca P., Agostini C., Bersani F., Giorgi G. Extremely low frequency magnetic fields affect transposition activity in *Escherichia coli*. *Radiat Environ Biophys.*, 2003, vol. 42 (2), pp. 113-118.
5. Захаренко Л.П., Коваленко Л.В., Перепелкина М.П., Захаров И.К. Влияние  $\gamma$ -радиации на индукцию транспозиций *hobo*-элемента у *Drosophila melanogaster*. *Генетика*, 2006, № 42 (6), с. 763-767. [Zakharenko L.P., Kovalenko L.V., Perepelkina M.P., Zakharov I.K. The effect of gamma-radiation on induction of the *hobo* element transposition in *Drosophila melanogaster*. *Genetika*, 2006, vol. 42 (6), pp. 763-767. (In Russ.)]
6. Piacentini L., Fanti L., Specchia V., Bozzetti M.P., Berloco M., Palumbo G., Pimpinelli S. Transposons, environmental changes, and heritable induced phenotypic variability. *Chromosoma*, 2014, vol. 123, pp. 345-354.
7. Rebollo R., Horard B., Hubert B., Vieira C. Jumping genes and epigenetics: towards new species. *Gene*, 2010, vol. 454, pp. 1-7.
8. McClintock B. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1956, vol. 21, p. 197.
9. *Mobile DNA II*. Edited by Craig N., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A. Washington DC: American Society of Microbiology Press, 2002.
10. de Koning A.P., Gu W., Castoe T.A., Batzer M.A., Pollock D.D. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet.*, 2011, vol. 7 (12), p. e1002384.
11. Сергеева Е.М., Салина Е.А. Мобильные элементы и эволюция генома растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2011, № 15 (2), с. 382-398. [Sergeeva E.M., Salina E.A. Transposable elements and plant genome evolution. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*, 2011, vol. 15 (2), pp. 382-398. (In Russ.)]
12. Guo B., Zou M., Gan X., He S. Genome size evolution in pufferfish: an insight from BAC clone-based Diodon holocanthus genome sequencing. *BMC Genomics*, 2010, vol. 11, p. 396.
13. Kapitonov V.V., Jurka J. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nat Rev Genet.*, 2008, vol. 9 (5), pp. 411-412.
14. Pearce S.R., Pich U., Harrison G., Flavell A.J., Heslop-Harrison J.S., Schubert I., Kumar A. The *Ty1-copia* group retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin. *Chromosome Res.*, 1996, vol. 4 (5), pp. 357-364.
15. Kumar A., Bennetzen J.L. Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet.*, 1999, vol. 33, pp. 479-532.
16. Georgiev G.P. Mobile genetic elements in animal cells and their biological significance. *Eur J Biochem.*, 1984, vol. 145 (2), pp. 203-220.

17. Сормачева Н.Д., Блинов А.Г. LTR ретротранспозоны растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2011, № 15 (2), с. 351-381. [Sormacheva I.D., Blinov A.G. LTR retrotransposons in plants. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*, 2011, vol. 15 (2), pp. 351-381. (In Russ.)]
18. Cordaux R., Udit S., Batzer M.A., Feschotte C. Birth of a chimeric primate gene by capture of the transposase gene from a mobile element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, vol. 103 (21), pp. 8101-8106.
19. Jurka J. Conserved eukaryotic transposable elements and the evolution of gene regulation. *Cell Mol Life Sci.*, 2008, vol. 65, pp. 201-204.
20. Lim J.K., Simmons M.J. Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays*, 1994, vol. 16 (4), pp. 269-275.
21. Rebollo R., Romanish M.T., Mager D.L. Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. *Annu Rev Genet.*, 2012, vol. 46, pp. 21-42.
22. Kohany O., Gentles A.J., Hankus L., Jurka J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics*, 2006, vol. 25 (7), p. 474
23. Jurka J. Repeats in genomic DNA: mining and meaning. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1998, vol. 8, pp. 333-337.
24. Llorens C., Muñoz-Pomer A., Bernad L., Botella H., Moya A. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees. *Biol Direct.*, 2009, vol. 4, p. 41.

### СООТВЕТСТВИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОМОДЕЛИ И МЕТОДОВ ЕЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Алексеева О.М.<sup>1</sup>, Кременцова А.В.<sup>1</sup>, Шибряева Л.С.<sup>1</sup>, Кривандин А.В.<sup>1</sup>,  
Шаталова О.В.<sup>1</sup>, Ким Ю.А.<sup>2</sup>, Ягольник Е.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимической физики РАН  
г. Москва, РФ

*e-mail: olgavek@yandex.ru;*

<sup>2</sup> Институт биофизики клетки РАН  
г. Пущино, РФ

*e-mail: yuk01@rambler.ru;*

<sup>3</sup> Тульский государственный университет  
Ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ  
*e-mail: yea\_88@mail.ru*

**Аннотация.** Рассматривается применение методов ДСК и малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) для исследования структуры 2-х видов экспериментальных объектов. Это - мультиламеллярные липосомы, сформированные из синтетического индивидуального фосфолипида, и второй объект мультиламеллярные липосомы, сформированные из смеси природных фосфолипидов. Необходимость изучения структуры мультиламеллярных липосом обусловлена тем, что такой экспериментальный объект достаточно хорошо отражает свойства многослойных мембран в живых клетках. Мембраны в процессе жизнедеятельности клетки меняют свою структуру, и, как первая мишень на пути биологически активных веществ (БАВ), могут менять свои структурные параметры при воздействии БАВ. Основной акцент - мультиламеллярные липосомы, сформированные из индивидуального синтетического фосфолипида или из природной смеси фосфолипидов необходимо исследовать разными методами. При этом возможно получить адекватные структурные характеристики на разном организационном уровне. Мультиламеллярные липосомы, сформированные из индивидуального фосфолипида, также и в присутствии БАВ, являются адекватным экспериментальным объектом для изучения методами ДСК и МУРР. Применение ДСК, выявляющего фазовые переходы фосфолипида позволяет оценить микродоменную организацию каждого бислоя в составе мультиламеллярных липосом, контрольных и при воздействии БАВ. Однако исследование смеси природных фосфолипидов методом ДСК не позволяет получить полную информацию о параметрах индивидуальных основных фазовых переходов каждого из компонентов смеси. Возможно получение весьма общей картины на термограммах, без характеристик кооперативности переходов, изменении теплоемкости и сдвигов температуры в максимуме перехода для отдельных компонентов смеси. При исследовании структуры липосом, сформированных из смеси природных фосфолипидов, применение метода МУРР позволяет адекватно оценить структурные свойства липосом также и при воздействии БАВ. При этом регистрируются структурные параметры мультиламеллярных липосом на следующем организационном уровне: упорядоченность упаковки бислоев в мультиламеллярной липосоме и изменение толщины бислоев в контроле и при воздействии БАВ.

**Ключевые слова:** ДСК, малоугловое рентгеновское рассеяние, мультиламеллярные фосфолипидные липосомы