

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ В СОСТАВЕ ДНК ХРОМОЦЕНТРА ТРОФОЦИТОВ *DROSOPHILA ORENA* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)

К.Е. Усов, В.Н. Стегний

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
при Томском государственном университете, Томск, Россия, e-mail: usovke@rambler.ru

При помощи метода микродиссекции была получена район-специфичная библиотека ДНК хромосомы политенных хромосом трофоцитов *Drosophila oreana*. Далее фрагменты этой библиотеки клонировали в плазмидном векторе и получили 133 клон. Провели секвенирование 76 клонов. Был осуществлен поиск гомологии клонов с известными мобильными генетическими элементами из геномов различных видов рода *Drosophila* с помощью программы «RepeatMasker» в базе данных «RepBase». В результате была найдена гомология 33 клонов библиотеки с участками различных МГЭ. Из них 26 клонов были гомологичны участкам LTR-ретротранспозонов (*Gypsy*, *Idefix*, *Zam*, *Roo*, *Quasimodo*, *Stalker*, *HMS Beagle*, *Copia*, *Tv1*, *Circe*, *DM297*), 4 – участкам LINE-элементов (*DMCR1A*, *G3*, *Helena*, *I*). Для остальных показана значимая гомология с участками ДНК-транспозонов, полинтонов и гелитронов: *DNAREP1_DM*, *Polinton-1_DY*, *Helitron-1_DYak*. Один клон оказался гомологичен участку *MINIME_DN*, относящемуся к группе не-LTR-ретротранспозонов *mini-me*.

Ключевые слова: *Drosophila oreana*, политенные хромосомы, гетерохроматин, трофоциты яичников, микродиссекция, секвенирование, молекулярная генетика, мобильные генетические элементы.

Введение

Хроматин определяют как комплекс геномной ДНК, гистоновых и негистоновых белков и РНК. Различают два типа хроматина – эухроматин и гетерохроматин. Последовательности ДНК гетерохроматина представлены тандемными повторами, диспергированными повторами и небольшим количеством генов (Hoskins *et al.*, 2002). ДНК гетерохроматина трудно поддается секвенированию и последующему анализу из-за обогащенности повторами. Поэтому даже окончанные и опубликованные проекты по секвенированию геномов разных организмов, по сути, содержат информацию только о нуклеотидных последовательностях ДНК эухроматина. Сейчас стало очевидным, что для понимания принципов функционирования генома эукариот необходима полная информация о составе его последовательностей. Ведется работа по расшифровке нуклеотидной последовательности ДНК гетерохроматина у многих организмов.

Определенный успех достигнут в расшифровке последовательности несателлитной части ДНК гетерохроматина человека (Horvath *et al.*, 2000), *Arabidopsis thaliana* (Haupt, 2001) и *Drosophila melanogaster* (Carvalho, 2002).

Согласно одной из схем филогенеза подгруппы *melanogaster* (Стегний, Вассерлауф, 1994), *D. oreana* является анцестральным видом для всей подгруппы. Для многих видов данной подгруппы (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. erecta*, *D. yakuba*) полностью или частично известна нуклеотидная последовательность ДНК эухроматина (Clark *et al.*, 2007). Наиболее полные данные о последовательностях ДНК эухроматина и гетерохроматина к настоящему моменту опубликованы только для *D. melanogaster* (Clark *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007). Размер генома *D. oreana* больше, чем у остальных видов подгруппы, в основном за счет повышенного содержания повторенной ДНК гетерохроматина (Boulesteix *et al.*, 2006), и данные о последовательностях генома этого

вида практически отсутствуют в литературе. Известно, что гетерохроматин в ядрах трофоцитов яичников дрозофилы представлен в большей степени, чем в ядрах клеток слюнных желез (Mal'ceva, Zhimulev, 1993). В связи с этим изучение состава ДНК хромосомного центра трофоцитов *D. oreana* может дать общее представление об организации последовательностей ДНК гетерохроматина у этого вида.

Одним из этапов анализа состава ДНК хромосомного центра трофоцитов *D. oreana* был поиск мобильных генетических элементов, так как известно, что они являются одним из составляющих компонентов гетерохроматина (Smith *et al.*, 2007).

Материалы и методы

Приготовление препаратов политенных хромосом для микродиссекции

Для приготовления препаратов политенных хромосом для микродиссекции использовались яичники самок *D. oreana* в возрасте 1–1,5 сут. Яичники выделяли в 0,7 %-м растворе NaCl и фиксировали в растворе Карнуа (96 %-й этанол и ледяная уксусная кислота – 3 : 1). Затем яичники инкубировали в 45 %-й уксусной кислоте в течение 5 мин, накрывали покровным стеклом и раздавливали. Препараты замораживали в жидком азоте, затем дегидратировали в батарее спиртов (этанол) увеличивающейся концентрации (50 % – при –20 °С 5 мин, 70 и 100 % – при –4 °С по 5 мин), инкубировали в растворе Карнуа при –4 °С 5 мин, высушивали на воздухе в течение 5 мин, ополаскивали в 100 %-м этаноле и снова высушивали.

Микродиссекция хромосомного центра *D. oreana* и амплификация ДНК хромосомного центра

Для получения набора фрагментов ДНК из хромосомного центра политенных хромосом ядер трофоцитов яичников *D. oreana* был использован метод микродиссекции. Микродиссекцию проводили на микроскопе AXIOVERT 10, оснащённом микроманипулятором MRmot (Zeiss, ФРГ) и механическим позиционером, в стерильных условиях специально приготовленными для этого микродиссекционными иглами. Диссектированный материал переносили в коллекционную каплю

(20–40 нл), помещённую в силиконизированную микропипетку. Коллекционная капля содержала 10 mM Трис HCl (pH 7,5), 10 mM NaCl, 0,1 % SDS, 30 % глицерин, 500 мкг/мл протеиназы К (Boehringer Mannheim). Во время сбора микропипетка находилась во влажной камере при комнатной температуре. По завершении сбора необходимого числа копий хромосомных районов пипетку с диссектированным хромосомным материалом переносили в стальную коробку, помещённую в водяную баню (60 °С), на 2 часа. Амплификация диссектированного материала с частично вырожденным праймером – ДОР-ПЦР проводилась так же, как описано ранее (Рубцов и др., 1999).

Клонирование фрагментов ДНК-библиотеки

Амплифицированную ДНК очищали с помощью колонки «QIA quick PCR Purification Column» (QIAGEN, Германия) и встраивали в плазмидный вектор pCR[®]4-TOPO[®] (TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing, Invitrogen, США). Полученную ДНК использовали для трансформации компетентных клеток *Escherichia coli*. Для этого 2,5 мкл лигазной смеси (0,5 мкл смеси солей (NaCl + MgCl₂), 0,5 мкл ТОПО-вектора, 1,5 мкл ПЦР-продукта) добавляли к 25 мкл компетентных клеток, оставляли на льду 5 мин, затем обрабатывали клетки тепловым шоком (30 с на водяной бане при 42 °С), помещали клетки на 2 мин в лед. К клеткам добавляли 125 мкл теплой восстановительной среды, перемешивали в течение 1 ч при 37 °С. Выращивание клеток на селективной среде, отбор колоний, их выращивание на жидкой среде и экстракцию плазмидной ДНК выполняли по стандартным протоколам (Маниатис и др., 1984). Наличие встройки проверяли амплификацией с праймерами M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') и M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') и последующим электрофоретическим разделением фрагментов в 1,5 %-м агарозном геле.

Секвенирование и анализ *in silico* последовательностей ДНК-библиотеки

Клоны библиотеки были секвенированы с помощью BigDye Terminators v. 3.1 (Applied

Biosystems, США) на секвенаторе лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

Концентрацию плазмидной ДНК и ПЦР-продукта в растворе, а также чистоту образцов (отсутствие примесей белков и РНК) определяли при помощи спектрофотометра NanoDrop ND-100.

Для постановки секвенирующей реакции готовили смесь: 1 мкл $5 \times$ буфера для секвенирования (400 мкМ Tris HCl pH 9,0, 10 мкМ $MgCl_2$), 2 мкл BigDye Terminators v. 3.1 (Applied Biosystems, США), праймер 0,3 мкл 10 мкМ (M13F, M13R), 500–1000 нг плазмидной ДНК или 50–150 нг ПЦР-продукта и добавляли стерильную H_2O , доводя объем смеси до 10 мкл. Реакцию проводили в режиме: денатурация при $94^\circ C$ – 2 мин; 20 циклов: денатурация при $94^\circ C$ – 15 с, отжиг при $53^\circ C$ – 20 с, элонгация цепей при $60^\circ C$ – 4 мин. Затем к смеси добавляли 10 мкл LPA (linea polyacrylamide) и 30 мкл 100 % изопропанола, перемешивали, держали 30 мин при комнатной температуре. Центрифугировали смесь 15 мин при 14 000 об/мин, супернатант удаляли. Добавляли 150 мкл 75 % изопропанола, сразу центрифугировали смесь 10 мин при 14 000 об/мин, супернатант удаляли. Подсушивали осадок в течение 30 мин при $37^\circ C$ и растворяли его в 4 мкл Loading buffer (5 : 1 деионизованный формамид и 25 мкМ EDTA). Для секвенирования использовали полиакриламидный гель, на старт наносили 2 мкл ДНК, растворенной в Loading buffer.

Анализ последовательностей ДНК *in silico*: поиск гомологии клонированных фрагментов с известными мобильными генетическими

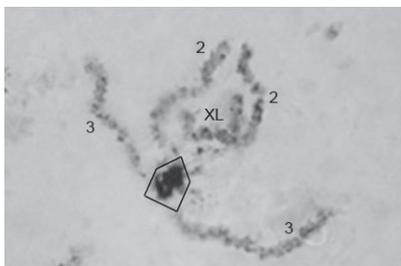


Рис. 1. Политенные хромосомы трофоцитов яичников *D. oreana*.

Рамкой выделен микродиссектированный хромоцентр; XL, 2, 3 – политенные хромосомы.

элементами из геномов видов *Drosophila* подгруппы *melanogaster* проводился с помощью программы «RepeatMasker» в базе данных «RepBase» (режим доступа <http://repeatmasker.genome.washington.edu>).

Результаты и обсуждение

Получение районспецифичной библиотеки ДНК хромоцентра политенных хромосом трофоцитов *D. oreana*

При использовании метода микродиссекции политенных хромосом (Рубцов и др., 1999) было вырезано 4 хромоцентра с двух препаратов политенных хромосом трофоцитов яичников *D. oreana*. Диссектированный район представлен на рис. 1.

Затем диссектированный материал амплифицировали с помощью ПЦР с частично вырожденным праймером (DOP-ПЦР) и получили смесь фрагментов (районспецифичную библиотеку ДНК) длиной от 200 до 1 т.п.н., которой было присвоено имя «Dore1».

Анализ фрагментов библиотеки ДНК «Dore1» на наличие гомологии с известными мобильными генетическими элементами из геномов видов подгруппы *melanogaster*

В результате клонирования в плазмидном векторе фрагментов район-специфичной библиотеки ДНК хромоцентра политенных хромосом трофоцитов *D. oreana* было получено 133 клона. Далее было отобрано 76 клонов и проведено их секвенирование. Общая длина просеквенированных фрагментов составила 23940 п.н. Нуклеотидные последовательности фрагментов библиотеки были опубликованы в базе данных «GenBank» (режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; индексы доступа с NM594089 по NM594162).

При использовании базы данных программы «RepeatMasker», которая постоянно обновляется при аннотировании новых повторов и мобильных элементов, была найдена гомология 33 клонов минибibliotheki с участками различных МГЭ из геномов видов подгруппы *melanogaster* (табл. 1).

Таблица 1

Мобильные генетические элементы в составе ДНК хромосомы трофоцитов *D. oreana*

Название клона и его размер	SW score*	Дивергенция, %	Область гомологии клона	Цепь	Название повтора	Класс/семейство повторов
3R (438 п.н.)	1424	16,3	17–283	+	<i>Gypsy3_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
	462	21,5	316–432	C	<i>Gypsy9_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P15F (564 п.н.)	2834	12,6	4–544	+	<i>Gypsy10_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P35F (235 п.н.)	1250	12,0	18–221	C	<i>IDEFIX_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P40F (546 п.н.)	3255	12,2	17–526	C	<i>DM297_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P41F (353 п.н.)	1283	10,0	15–225	C	<i>DNAREP1_DM</i>	DNA/ <i>Helitron</i>
	519	18,4	114–243	C	<i>MINIME_DN</i>	Unknown
P42F (469 п.н.)	2113	15,7	11–450	C	<i>Quasimodo_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P43F (399 п.н.)	2088	8,7	21–370	+	<i>Polinton-1_DY</i>	DNA/ <i>Maverick</i>
P45F (211 п.н.)	776	19,9	18–173	+	<i>G3_DM</i>	LINE/ <i>Jockey</i>
P49F (390 п.н.)	737	17,9	73–208	+	<i>Gypsy3_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P51F (205 п.н.)	643	23,0	11–187	+	<i>ROO_I</i>	LTR/ <i>Roo</i>
P60F (200 п.н.)	856	9,8	10–188	C	<i>STALKER4_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P67F (256 п.н.)	1710	4,4	15–240	C	<i>ZAM_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P68F (333 п.н.)	182	18,4	267–315	+	<i>HMS BEAGLE_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P74F (295 п.н.)	878	26,8	14–289	C	<i>Gypsy_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P80F (225 п.н.)	457	19,5	11–206	C	<i>I_DM</i>	LINE/ <i>I</i>
P81F (328 п.н.)	1268	10,5	125–318	+	<i>Helitron-1_DYak</i>	DNA/ <i>Helitron</i>
P82F (300 п.н.)	1089	22,6	17–289	C	<i>Gypsy3_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P85F (451 п.н.)	269	26,9	242–427	C	<i>TVII</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
	175	26,6	19–121	C	<i>TVII</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P88F (223 п.н.)	268	28,0	19–214	+	<i>QUASIMODO2-I_DM</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P91F (152 п.н.)	296	18,4	25–101	C	<i>DMCR1A</i>	LINE/ <i>CRI</i>
	207	16,4	81–139	C	<i>DMCR1A</i>	LINE/ <i>CRI</i>
P92F (194 п.н.)	1026	7,0	20–182	C	<i>STALKER4_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P95F (485 п.н.)	337		19–224	C	<i>IDEFIX_LTR</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P109F (334 п.н.)	862	13,3	16–168	C	<i>Gypsy3_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
	560	10,5	167–318	+	<i>DNAREP1_DM</i>	DNA/ <i>Helitron</i>
P116F (251 п.н.)	202	28,4	141–218	+	<i>ZAM_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P117F (311 п.н.)	1583	13,6	15–291	+	<i>ROO_I</i>	LTR/ <i>Roo</i>
P121F (303 п.н.)	272	18,9	76–301	+	<i>IDEFIX_LTR</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
	290	11,8	22–75	+	<i>IDEFIX_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P123F (251 п.н.)	391	19,9	140–246	+	<i>CIRCE</i>	LTR/ <i>Circe</i>
P125F (417 п.н.)	3040	6,8	19–415	+	<i>HELENA_RT</i>	LINE/ <i>Jockey</i>
P126F (374 п.н.)	236	22,5	82–139	+	<i>ZAM_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P16F (249 п.н.)	989	16,9	14–236	+	<i>ROO_I</i>	LTR/ <i>Roo</i>
P59F (283 п.н.)	617	20,0	71–210	+	<i>Gypsy3_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>
P131F (738 п.н.)	172	24,1	31–90	+	<i>Copia_I</i>	LTR/ <i>Copia</i>
P8F (413 п.н.)	933	32,7	23–403	+	<i>Gypsy4_I</i>	LTR/ <i>Gypsy</i>

Примечание. * Параметр SW score – значение критерия Smith-Waterman score; C – комплементарная цепь; п.н. – пары нуклеотидов.

Среди 33 клонов, гомологичных участкам различных МГЭ, 26 клонов были гомологичны участкам LTR-ретротранспозонов, 4 – участкам LINE-элементов. Для остальных показана значимая гомология с участками недавно открытых ДНК-транспозонов полинтонов и гелитронов (Polintons и Helitrons) *D. melanogaster* и других видов: *DNAREP1_DM*, *Polinton-1_DY*, *Helitron-1_DYak*. Один клон гомологичен участку МГЭ *MINIME_DN*, относящемуся к группе не-LTR-ретротранспозонов *mini-me*.

Известно, что среди основных классов МГЭ как в эухроматине, так и в гетерохроматине *D. melanogaster* наиболее богато представлен класс LTR-ретротранспозонов, в меньшей степени представлены не-LTR-ретротранспозоны (LINE) и менее всего ДНК-транспозоны (Kaminker *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2007). Аналогичное соотношение классов МГЭ характерно и для минибιβотеки ДНК хромосомы *D. orena* (табл. 1).

Неожиданным оказался тот факт, что ни один клон минибιβотеки не показал значимой гомологии с МГЭ, относящимся к таким ДНК-транспозонам, как TIR и FB. Поскольку установлено, что в геноме *D. melanogaster* и в геномах других филогенетически близких видов дрозофил они занимают существенную часть (Hoskins *et al.*, 2002; Kaminker *et al.*, 2002; Feschotte *et al.*, 2009). Возможно, для гетерохроматина *D. orena* характерно очень низкое содержание TIR- и FB-элементов, и вследствие этого при создании минибιβотеки они не вошли в ее состав. Интересно, что поиск FB-элементов в гетерохроматине *D. melanogaster* с помощью программы «RepeatMasker» не увенчался успехом, но их удалось обнаружить при помощи других методических подходов (Hoskins *et al.*, 2002). Кроме того, была осуществлена *in situ* гибридизация (в качестве ДНК-проб выступали некоторые представители TIR-элементов *D. melanogaster*) для установления хромосомной локализации некоторых МГЭ у *D. orena* и саузерн-блот-гибридизация для установления наличия/отсутствия этих же МГЭ в геноме данного вида (Bi'ement, Cizeron, 1999). В результате и *in situ*, и саузерн-блот-гибридизации показано отсутствие TIR-элементов в геноме *D. orena*. Однако показано их высокое содержание в геномах *D. melanogaster* и *D. simulans* (Bi'ement, Cizeron, 1999).

Среди LTR-ретротранспозонов были обнаружены: *gypsy* (8 клонов), *Idefix* (3 клона), *Zam* (3 клона), *roo* (3 клона), *Quasimodo* (2 клона), *Stalker* (2 клона), *HMS Beagle* (1 клон), *copia* (1 клон), *Tv1* (1 клон), *Circe* (1 клон), *DM297* (1 клон). Четыре клона гомологичны участкам не-LTR-ретротранспозонов (LINE-элементов): *DMCR1A* (1 клон), *G3*, *Helena*, *I* (по 1 клону) (табл. 1). Таким образом, при анализе минибιβотеки хромосомы *D. orena* показано, что различные представители семейства *gypsy* преобладали над представителями других семейств МГЭ. Интересно, что *gypsy*-подобные ретротранспозоны содержат инсуляторные последовательности, по молекулярным свойствам являющиеся MAR/SAR ДНК и ДНК ядерной ламины (Nabirochkin *et al.*, 1998; Gerasimova *et al.*, 2000). Кроме того, установлено, что последовательности инсулятора *gypsy* вызывают в интерфазном ядре у *D. melanogaster* прикрепление сайтов даже единичных инсерций к ядерной оболочке.

Также показано, что у *D. melanogaster*, содержащей эти элементы в прицентромерном гетерохроматине, политенные хромосомы трофоцитов яичников образуют прочные контакты с ядерной оболочкой, причем независимые для каждой хромосомы (Стегний, Вассерлауф, 1994). Возможно, что способность района прицентромерного гетерохроматина к прикреплениям к оболочке зависит от присутствия в нем в достаточном количестве встроок *gypsy*-подобных LTR-ретротранспозонов. Принимая во внимание все вышесказанное, можно предположить, что обилие *gypsy*-подобных ретротранспозонов в хромосоме *D. orena* дает ему возможность прикрепляться к ядерной оболочке.

Кроме того, была найдена значимая гомология клона P43F (табл. 1) с участком одного из представителей недавно открытого подкласса ДНК-транспозонов, названных полинтонами (Polintons) (Kapitonov, Jurka, 2006; Feschotte *et al.*, 2009): *Polinton-1_DYD. yakuba*. Полинтоны являются самыми сложными ДНК-транспозонами эукариот, так, например, *Polinton-1_DYD. yakuba* имеет длину 14782 п.н. Необходимо отметить, что *Polinton-1_DY* обнаружен в геноме *D. yakuba* совсем недавно и пока не найден в геномах других видов *Drosophila* (Kapitonov, Jurka, 2006). Таким образом, удалось впервые

показать наличие данного полинтонна в геноме *D. oreana*.

Также была найдена значимая гомология трех клонов минибиблиотеки с участками сравнительно недавно открытых транспозонов, гелитронов (*Helitrons*), которые даже предложили выделить в отдельный подкласс ДНК-транспозонов (Kapitonov, Jurka, 2001; Poulter *et al.*, 2003; Hood, 2005; Feschotte *et al.*, 2009): *DNAREPI D. melanogaster* (2 клон) и *Helitron-1 D. yakuba* (1 клон) (табл. 1). Семейство МГЭ *DNAREPI* является древним семейством МГЭ, появившимся в геноме *D. melanogaster* около 10 млн лет назад, и в настоящее время эти элементы, согласно исследованиям некоторых авторов, являются наиболее многочисленными в геноме *D. melanogaster*. На *DNAREPI* приходится до 1 % генома данного вида (Kapitonov, Jurka, 2003, 2007). Присутствие элемента *DNAREPI*, также называемого *Drosophila interspersed element 1 (DINE-1)*, свойственного геному *D. melanogaster*, в геноме *D. oreana* не является необычным, так как этот элемент найден в геномах многих видов рода *Drosophila*, геномы которых были частично или полностью секвенированы. Но в то же время *DINE-1* не был обнаружен за пределами отряда Diptera (Kapitonov, Jurka, 2007). Известно, что геном *D. melanogaster* содержит огромное количество копий *DNAREPI* – до нескольких тысяч (Kapitonov, Jurka, 2003), однако подобной обогащенности гетерохроматина хромосомы *D. oreana* этим элементом найдено не было. Что касается *Helitron-1 D. yakuba*, то он обнаружен совсем недавно по сравнению с *DINE-1*, вследствие этого его присутствие в геномах других видов рода *Drosophila* изучено недостаточно. Таким образом, было впервые показано наличие в геноме *D. oreana* мобильного элемента *Helitron-1 D. yakuba*.

Интересно, что степень дивергенции консенсусных последовательностей элементов *Polinton-1_DY* и *Helitron-1 D. yakuba* и последовательностей, найденных у *D. oreana*, очень низка (8,7 и 10,5 % соответственно), что, очевидно, связано с филогенетической близостью *D. oreana* и *D. yakuba*.

Кроме того, была обнаружена гомология одного клона (P41F) (табл. 1) минибиблиотеки «Dore1» с участком МГЭ *MINIME_DN*, который принадлежит к открытой в 2001 г. у

видов *D. dunni* и *D. nigrodunni* группе ретропозонов *mini-me* (Wilder, Hollocher, 2001). Эти элементы, в настоящее время относимые к не-LTR-ретротранспозонам, принимают участие в образовании микросателлитов. Они очень многочисленны в геноме *D. melanogaster* (3395 копий на геном) и найдены в геномах 16 видов *Drosophila*, принадлежащих к различным филогенетическим группам (Wilder, Hollocher, 2001). Стоит отметить, что клон P41F имеет гомологию не только с участком элемента *mini-me*, но и с участком элемента *DNAREPI*. Согласно одной из классификаций (Yang, Barbash, 2008), эти элементы относятся к одному надсемейству (*SINE*-подобные элементы) и, возможно, частично гомологичны друг с другом.

В целом надо сказать, что дивергенция найденных элементов от консенсусной последовательности варьирует от 4,4 до 32,7 % (табл. 1), в среднем составляя 17 %, что несколько больше, чем составляет в норме варьирование внутри семейства МГЭ у *D. melanogaster* (13,4 %). Однако это вполне объяснимо, если принять во внимание тот факт, что *D. oreana* достаточно далеко отстоит от *D. melanogaster* в филогенетическом отношении, а большинство из МГЭ, представленных в базе данных «RepBase», принадлежат геному *D. melanogaster*.

Необходимо отметить, что среди МГЭ, обнаруженных в составе минибиблиотеки ДНК «Dore1» (табл. 1), встречались как молодые МГЭ, так и древние, от которых сохранились лишь небольшие фрагменты с низким уровнем гомологии.

В настоящее время детально описаны разнообразные семейства МГЭ, входящие в состав эухроматина *D. melanogaster* (Kaminker *et al.*, 2002). Кроме того, проводятся активные работы в этом направлении и для гетерохроматина *D. melanogaster* (Smith *et al.*, 2007). Также были секвенированы геномы (ДНК эухроматина) 12 видов *Drosophila* (в том числе *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. erecta* и *D. yakuba*) и получены предварительные результаты по содержанию различных МГЭ (Clark *et al.*, 2007). Что касается *D. oreana*, то литературные данные по разнообразию МГЭ в эухроматине, а тем более в гетерохроматине, практически отсутствуют за исключением работы С. Vi'emon и G. Cizeron, (1999). В этой работе была предпринята попытка оце-

нить количество и распределение копий целого ряда МГЭ, относящихся к разным классам, в геномах 228 видов рода *Drosophila*, среди которых был и вид *D. orena*. Однако относительно полные данные представлены опять же только для *D. melanogaster*. В целом можно отметить, что самое большое число копий различных МГЭ было обнаружено в геномах *D. melanogaster* и *D. simulans*. Количество же копий МГЭ в геномах других видов подгруппы *melanogaster* в целом ниже, а у *D. erecta*, *D. teissieri* и *D. orena* МГЭ вообще удается локализовать только в хромосоме. Однако преимущественная локализация в хромосоме может быть характерна для последовательностей, гомологичных МГЭ *D. melanogaster*, использованных в экспериментах в качестве проб (Bi'émont, Cizeron, 1999).

Таким образом, в результате настоящего исследования впервые описано разнообразие мобильных генетических элементов, которые локализованы в хромосоме трофоцитов *D. orena*. Среди обнаруженных МГЭ преобладали LTR-ретротранспозоны, но также были выявлены МГЭ, которые принадлежат к группе LINE-элементов. Кроме того, были обнаружены такие представители ДНК-транспозонов, как гелитроны и полиинтоны, и один представитель не-LTR-ретротранспозонов, *mini-me* (который принимает участие в образовании микросателлитов).

Авторы выражают искреннюю благодарность Е.А. Елисафенко (лаборатория эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск) за помощь в анализе последовательностей ДНК *in silico*, а также благодарят всех сотрудников лаборатории эпигенетики развития за методическую помощь и полезное обсуждение работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке: проект ФЦП № П 801; грант РФФИ № 10-04-01059.

Литература

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
 Рубцов Н.Б., Жимулев И.Ф., Алексеенко А.А. и др. Микроклонирование и характеристика ДНК из районов прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1999. Т. 35. № 1. С. 55–61.

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.
 Bi'émont C., Cizeron G. Distribution of transposable elements in *Drosophila* species // Genetica. 1999. V. 105. P. 43–62.
 Boulesteix M., Weiss M., Bi'émont C. Differences in genome size between closely related species: The *Drosophila melanogaster* species subgroup // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. N 1. P. 162–167.
 Carvalho A.B. Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome // Curr. Opin. Genet. Dev. 2002. N 12. P. 664–668.
 Clark A.G., Eisen M.B., Smith D.R., Bergman C.M. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny // Nature. 2007. V. 450. N 8. P. 203–218.
 Feschotte C., Keswani U., Ranganathan N. Exploring repetitive DNA landscapes using REPCLASS, a tool that automates the classification of transposable elements in eukaryotic genomes // Genome Biol. Evol. 2009. V. 1. P. 205–220.
 Gerasimova T.I., Byrd K., Corces V.G. A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA // Mol. Cell. 2000. V. 6. N 5. P. 1025–1035.
 Haupt W., Fischer T.C., Winderl S. *et al.* The centromere 1 (CEN1) region of *Arabidopsis thaliana*: architecture and functional impact of chromatin // Plant J. 2001. V. 27. P. 285–296.
 Hood M.E. Repeat-induced point mutation and the population structure of transposable elements in *Microbotryum violaceum* // Genetics. 2005. V. 170. P. 1081–1089.
 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. N 10. P. 839–852.
 Hoskins R.A., Smith C.D., Carlson J.W. *et al.* Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly // Genome Biol. 2002. V. 3. N 12. R0085.1–R0085.16.
 Kaminker J.S., Bergman C.M., Kronmiller B. *et al.* The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective // Genome Biol. 2002. V. 3. N 12. R0084.1–R0084.20.
 Kapitonov V.V., Jurka J. Rolling-circle transposons in eukaryotes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 8714–8719.
 Kapitonov V.V., Jurka J. Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. N 11. P. 6569–6574.
 Kapitonov V.V., Jurka J. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes // Proc. Natl Acad. Sci. USA.

2006. V. 103. N 12. P. 4540–4545.
- Kapitonov V.V., Jurka J. Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons // Trends Genet. 2007. V. 23. N 10. P. 521–529.
- Mal'ceva N.I., Zhimulev I.F. Extent of polyteny in the pericentric heterochromatin of polytene chromosomes of pseudonurse cells of otu (ovarian tumor) mutants of *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1993. V. 240. P. 273–276.
- Nabirochkin S., Ossokina M., Heidmann T. Scaffold attachment region co-localizes with the *gypsy* retrotransposon insulator sequence // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 247–273.
- Poulter R.T., Goodwin T.J., Butler M.I. Vertebrate *helitrons* and other novel Helitrons // Gene. 2003. V. 313. P. 201–212.
- Smith C.D., Shu S.Q., Mungall Ch.J., Karpen G.H. The release 5.1 annotation of *Drosophila melanogaster* heterochromatin // Science. 2007. V. 316. P. 1586–1591.
- Wilder J., Hollocher H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in Dipterans // Mol. Biol. Evol. 2001. V. 18. N 3. P. 384–392.
- Yang H.-P., Barbash D.A. Abundant and species-specific *DINE-1* transposable elements in 12 *Drosophila* genomes // Genome Biol. 2008. V. 9. N 2. R 39.

TRANSPOSABLE ELEMENTS IN THE NURSE CELL CHROMOCENTER DNA OF *DROSOPHILA ORENA* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)

K.E. Usov, V.N. Stegnyy

Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University, Tomsk, Russia,
e-mail: usovke@rambler.ru

Summary

A region-specific library was constructed by microdissection of chromocenter DNA polytene chromosomes from *Drosophila orena* nurse cells. Fragments of the library were cloned in a plasmid vector to yield 133 clones. A total of 76 clones were sequenced. A search for similarity between the fragments cloned and transposable elements known in the genomes of different *Drosophila* species was performed with the RepeatMasker program in RepBase. We found that 26 of the 33 clones homologous to regions of various mobile genetic elements shared similarity with regions of LTR retrotransposons (*Gypsy*, *Idefix*, *Zam*, *Roo*, *Quasimodo*, *Stalker*, *HMS Beagle*, *Copia*, *Tv1*, *Circe*, and *DM297*) and 4, with LINE regions (*DMCR1A*, *G3*, *Helena*, and *I*). Other clones showed significant degrees of similarity to regions of DNA transposons, polintons and helitrons: *DNAREP1_DM*, *Polinton-1_DY* and *Helitron-1_DYak*. One clone was similar to a region of *MINIME-DN*, belonging to *mini-me* non-LTR retrotransposons.

Key words: *Drosophila orena*, polytene chromosomes, heterochromatin, ovary nurse cells, microdissection, sequencing, molecular genetics, transposable elements.