

ТРЕ ПОВТОРИ *hobo* ЕЛЕМЕНТА В ГЕНОМАХ ПРЕДСТАВНИКІВ ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАЇНИ

І.А.Козерецька

*Київський національний університет ім.Тараса Шевченка
(Київ)*

Вступ

Мобільні генетичні елементи (МГЕ) є поширеними в природних популяціях *Drosophila melanogaster* [9]. Сьогодні існує думка, що автономні генетичні елементи слід вважати драйверами еволюції геномів [11]. Виходячи з цього слід визнати вкрай важливим дослідження динаміки поширення МГЕ в природних популяціях плодових мух як у просторі, так і у часі. Відомо, що частина МГЕ, такі як *P* та *hobo* транспозони, є активними в даний період дослідження в природних популяціях [8, 17], тому вони становлять особливий інтерес, як МГЕ, які почали інвазію геномів представників природних популяцій [5, 10] в період початку дослідження популяційних процесів в природних популяціях *D. melanogaster* [4] і, таким чином, можуть обумовлювати, частково, чи повністю, процеси, які в них спостерігаються.

Послідовність *hobo* містить так званий S region, який складається з тандемних повторів АСТССАГАА. Оскільки ця послідовність кодує три амінокислоти, а саме треонін, пролін, глутамін, то і отримала назву ТРЕ повтору [7]. Було показано, що цей повтор є високополіморфним в природних популяціях дрозофіл [5, 6]. Вказаному поліморфізму притаманний географічний градієнт. З найбільшою частотою зустрічається три-ТРЕ *hobo* елементи, зі значно меншою чотири-ТРЕ та п'ять-ТРЕ *hobo* транспозони. В Східній Африці та Південній Америці поширені 4-ТРЕ елементи, тоді як для Західної Європи характерні 5-ТРЕ транспозони [5].

Для *hobo* елементів з геномів дрозофіл двох природних популяцій України (Гурзуф, 1961; Умань, 1970; Умань, 1983) було продемонстровано наявність три-ТРЕ повторів [5].

Метою роботи був пошук відповіді на питання, чи змінився і якщо так, то як саме патерн ТРЕ повторів в геномах природних популяцій *D. melanogaster* України, які існують в умовах різного радіоактивного забруднення [2], яке може виступати фактором, який впливає на інвазію та поширення МГЕ [12], враховуючи, що поширеною є думка про визначну роль оточуючого навколишнього середовища в еволюції живих організмів [3, 15].

Матеріали та методи дослідження

Лінії дрозофіл. *D. melanogaster* утримували при кімнатній температурі на стандартному середовищі.

Природні популяції. Досліджено 8 природних популяцій з різних регіонів України 2009 року збору (табл. 1). Всі проаналізовані лінії сформовано з ізосамкових ліній за два покоління до проведення аналізу.

ПЦР ампліфікація та секвенс. ДНК виділяли з 15 самок масової культури за допомогою QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, USA). ПЦР проводили з використанням власноруч підібраних праймерів до ділянки *hobo* елемента, який містить ТРЕ повтори (5'ACC CGC AGC ACA TCT TCA GG, 5'TTC AGC TGC TGC GCT ACT GG. Очікуваний фрагмент з три-ТРЕ повторами *hobo* транспозону має довжину 412 по. Близько 50 ng ДНК використовували в 20 μ l загальної реакційної суміші з додаванням 1 одиниці Taq полімерази (Lucigen). Ампліфікацію проводили в MJ Research Cycler 35 циклів. Умови ПЦР: денатурація 94°C/30 хв, відпал 56°C/20 с, елонгація 72°C/20 с; остаточна елонгація 72°C/4 хв. Для деяких ліній, ПЦР продукт був ампліфікований, а потім очищений з використанням Gel Extraction Kit (BIO-RAD, USA). Фрагменти з трьох популяцій (Одеса, Чорнобиль та Водойма-охолоджувач ЧАЕС) були відсеквеновані з використанням 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Аналіз послідовностей виконано з використанням BLAST [1].

ДНК чіп. Кількість ТРЕ повторів оцінювали відповідно до довжини ПЦР-продукту та розміру повтору (а саме, три ТРЕ - 409 по, шість ТРЕ - 429 по, та 7 ТРЕ - 435 по). ПЦР продукти аналізували з використанням Bioanalyzer 2100 (Agilent) з DNA 7500 чіпом. Електрофореграми аналізували за допомогою Agilent 2100 Expert Software (version B.02.07).

Отримані результати та їх обговорення

Аналіз з використанням ДНК чіпу продемонстрував поліморфність досліджуваної ділянки hobo елемента в природних популяціях України. Популяції Києва, Чорнобиля та Водойма-охолоджувача ЧАЕС виявились мономорфними та містили тільки 3-TPE повтори. Всі інші популяції продемонстрували поліморфізм досліджуваного регіону, оскільки крім 3 TPE повтору містили ще 6- та 7 TPE мотиви. Всі досліджені популяції містили велику кількість 3-TPE повторів (рис. 1), що відповідає даним Bonplivatd et al. (2000). Геноми представників 5-ти популяцій містили окрім трьох іще і 7-TPE повтори (Варва, Одеса, Ялта (Магарач) та Умань), а також 6-TPE мотив (Поліське) (рис. 1).

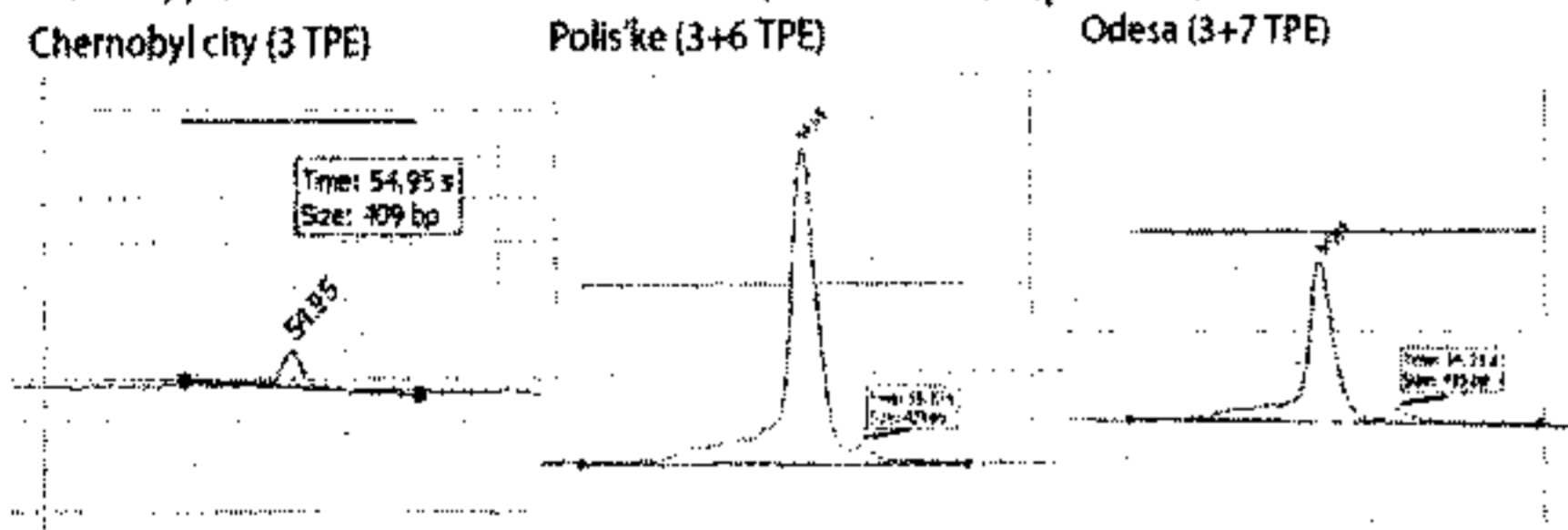


Рис.1. Три типи TPE повторів hobo елемента в геномах *D. melanogaster* з природних популяцій України. Водойма-охолоджувач ЧАЕС має подібний патерн до популяції м. Чорнобиль, всі решта досліджених популяцій - подібно до м. Одеса.

Всі досліджені популяції відповідно до класифікації Bonplivatd et al. [5] можна розбити на три класи: 1) мономорфні популяції з 3-TPE елементами; 2) поліморфні популяції з 3-7-TPE транспозонами та 3) поліморфні популяції з 3-6-TPE мотивами.

У вивченні динаміки hobo елементів в природних популяціях використовується молекулярний підхід з дослідженням поліморфізмів TPE повторів в S регіоні hobo елемента [5, 6]. Для двох природних популяцій дрозофіли України (1961, 1970 та 1983 років збору) показано їх мономорфізм, оскільки геноми їх представників містили лише три-TPE повтори [5]. Використавши 8 ліній *D. melanogaster*, отриманих із 8 природних популяцій України, які представляють широтний зріз країни з півночі на південь (табл.), ми показали, що S регіон hobo елементів всіх дослідже-

них популяцій, серед яких були представники двох раніше вже досліджених нашими попередниками, містив три TPE елементи. В той же час нами встановлено наявність нових варіантів (шість-та сім-TPE повторів) досліджуваної мікросателітної ділянки hobo елементів. Такий результат є свідченням того, що за 40-50 років існування таких популяцій в природних умовах України S регіон hobo транспозонів зазнав змін. Цікаво відмітити, що змін не зазнали дві популяції з підвищеним рівнем радіації (м. Чорнобиль та Водойма-охолоджувач ЧАЕС) та популяція м Києва, яка за деякими параметрами поведила себе у попередні роки досліджень подібно до популяцій з радіоактивно забруднених регіонів [13]. Популяція Поліського, яка існує також в умовах підвищеного радіаційного забруднення, продемонструвала наявність іще одного, варіанту S ділянки hobo елемента з шістьма TPE повторами.

Таблиця 1

Опис, локалізація та TPE статус ліній, які походять з природних популяцій *D. melanogaster* України 2009 року збору

Ліній	Географічні координати		Рівень радіоактивного фону ($\mu\text{R}/\text{год}$)	Умови існування	Кількість ізосамкових ліній*	Кількість TPE повторів
	Широта	Довгота				
Київ	50°35'	30°48'	13	Сад	5	3
Одеса	46°30'	30°46'	14	Сад	5	3,7
Умань	48°45'	30°10'	16	Фруктовий завод	10	3,7
Магарач	44°30'	34°90'	11	Інститут винограду та вина	5	3,7
Варва	50°29'	32°43'	7	Фруктовий завод	10	3,7
Поліське	51°23'	29°39'	350	Закинутий сад	10	3,6
Чорнобиль	51°27'	30°14'	350	Закинутий сад	30	3
Водойма-охолоджувач ЧАЕС	51°37'	30°14'	2100	Дві дикі груші	30	3

Примітка: * - кількість самок, з яких формували масову культуру.

Мутаційний рівень мікросателітної ділянки (S регіону) hobo елементів набагато вищий ніж нейтральних мікросателітів у *D. melanogaster*, 4.2×10^{-4} та 6.5×10^{-6} відповідно [16]. Це досить

значний рівень мутування, який за такий період часу міг би забезпечити появу нових варіантів повторів досліджуваної ділянки транспозону. Цього не спостерігається в трьох популяціях, дві з яких походять з районів з високим рівнем радіоактивного забруднення. Відсутність мінливості в цій ділянці може бути пояснена тим, що зміни, які відбуваються з його елементами не є рівно розподіленими в часі, і, відповідно, є багаточисельними лише в момент безпосередньої інвазії. Вважається, що саме завдяки високим темпам мінливості на перших етапах інвазії і сформувався географічний градієнт, описаний [5].

Протиріччя, яке виникає між мутаційним рівнем мікросателітної послідовності кодуючого регіону його елемента та відсутністю нових варіантів цих повторів в трьох популяціях протягом 50 років на території України, може пояснюватися також існуванням додаткового механізму, який контролює мутаційні процеси цієї послідовності у дрозофіли в досліджених природних популяціях і який не був активним при аналогічних експериментах в лабораторних лініях [16]. Показано, що опромінення в низьких дозах (500 пістоGy) призводить до суттєвого зниження мутаційного рівня у порівнянні з контролем [14], що пов'язують з активацією систем репарації та відповіді на стрес. Відсутність нових алельних варіантів його TPE repeats в двох досліджених нами популяціях, які мешкають на території з підвищеним радіаційним забрудненням, за суттєвого їх спонтанного рівня мутування, таким чином може пояснюватися, принаймні для мух, які мешкають в Чорнобильському регіоні, впливом низькодозового опромінення, яке і призводить до зниження частоти мутування даної послідовності. Це узгоджується з даними, які свідчать, що рівень спонтанного мутування у організмів, які мешкають на радіоактивних територіях менше, ніж у таких які походять з місць з фоновим рівнем радіоактивного опромінення (Kozeretska et al., 2008). З'ясування остаточних причин відсутності нових алельних форм в послідовності його TPE repeats у трьох досліджених популяціях, дві з яких мешкають на територіях з підвищеним рівнем радіаційного забруднення, все ж потребує подальшого вивчення.

Наявність в чотирьох досліджених популяціях окрім три-TPE повторів ще і сім-TPE мотивіві його елемента може пояс-

нюватися мутаційними процесами, які мали місце в останні 40-50 років, які пройшли з моменту попереднього дослідження, оскільки серед цих чотирьох популяцій, дві були досліджені Bonpivard et al., [5] і були на той час мономорфними та містили тільки три-TPE повтори. Про недавнє виникнення нових, раніше не притаманних українським популяціям дрозофіл варіантів його елементів (шість та сім TPE повтори) може також свідчити наявність їх в низьких концентраціях порівняно з 3-TPE повторами. Такий сценарій подій повністю відповідає даним про те, що S region його елементів характеризується у виду *D. melanogaster* підвищеними рівнями мутування [16].

Висновок

В геномах представників природних популяцій *D. melanogaster* України в 2009 році здору були наявні три типи TPE повторів його елементів, а саме три-TPE, шість-TPE та сім-TPE мотиви. Відмінність між різними популяціями в кількості та типі повторів ми пов'язуємо з різними рівнями радіаційного забруднення територій, на яких мешкають досліджені популяції.

Автор висловлює подяку проф. Г. Міліневському, співробітникам біологічного факультету Одеського національного університету імені І.І. Мечнікова, співробітникам Національного інституту винограду і вина УААН за допомогу у зборі мух, а також проф. Т. Мюссо за допомогу у секвенуванні та постановці експерименту з ДНК ціпом.

Література

1. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller [et al.] // *J. Mol. Biol.* -1990.-Vol. 215. -P 403-410.
2. Atlas Ukraine Radioactive contamination Ministry of Ukraine of Emergency and affairs of population protection from the consequences of Chernobyl catastrophe // *Intelligence Systems GEO Kyiv*, 2008.- 46 p.
3. Benton M.J. *The Red Queen and the Court Jester: Species Diversity and the Role of Biotic and Abiotic factors* / M.J. Benton // *Science*. -2009. - Vol. 323. -P. 728-732.
4. Berg R.L. *A genetical analysis of wild populations of Drosophila melanogaster* / R.L. Berg // *D I S.* -1941. - Vol.15.
5. A scenario for the homo transposable elements invasion, deduced from the structure of natural population of *Drosophila*

melanogaster using tandem TPE repeats / E. Bonniard, C. Bazin, B. Denis [et al.] // *Genet. Res. Camb.* - 2000. - Vol. 75. - P. 13-23.

6. Bonniard E. High polymorphism of TPE repeats within natural populations of *Drosophila melanogaster*: a gradient of the 5TPE hobo element in Western Europe / E. Bonniard, C. Bazin, D. Higuier // *Mol. Biol. Evol.* - 2002. - Vol. 19. - P. 2277-2284.

7. Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: hobo, Activator, and Tam3 / B.R. Calvi, T.J. Hong, S.D. Findley [et al.] // *Cell.* - 1991. - Vol. 66. - P. 465-471.

8. The hobo transposon and hobo-related elements are expressed as developmental genes in *Drosophila* / M. Depra, V.L. da Silva Valente, R. Margis [et al.] // *Gene.* - 2009. - Vol. 448. - P. 57-63.

9. Gonzalez J. A recent adaptive transposable element insertion near highly conserved developmental loci in *Drosophila melanogaster* / J. Gonzalez, J.M. Macpherson D.A. Petrov // *Mol. Biol. Evol.* - 2009. - doi:10.1093/molbev/msp107

10. Prevalence of full-size P and KP elements in North American populations of *Drosophila melanogaster* / M. Itoh, N. Takeuchi, M. Yamaguchi [et al.] // *Genetica.* - 2007. - Vol. 131. - P. 21-28.

11. Kazazian H.H.Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution / H.H.Jr. Kazazian // *Science.* - 2004. - Vol. 303. - P. 1626-1632.

12. Patterns of hobo elements and their effects in natural population of *Drosophila melanogaster* in Japan / K. Kikuno, K. Tanaka, M. Itoh [et al.] // *Heredity.* - 2006. - Vol. 96. - P. 426-433.

13. Mutation processes in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *Hirundo rustica* from radiation-contaminated regions of Ukraine / I.A. Kozeretska, A.V. Protsenko, ES Afanas'eva [et al.] // *Cytology and Genetics.* - 2008. - Vol. 42. - P. 267-271.

14. Reduction in mutation frequency by very low-dose gamma irradiation of *Drosophila melanogaster* germ cells / K. Ogura, J. Magae, Y. Kawakami [et al.] // *Radiat. Res.* - 2009. - Vol. 171. - P. 1-8.

15. Schluter D. Evidence for ecological speciation and its alternative / D. Schluter // *Science.* - 2009. - Vol. 323. - P. 737-741.

16. High mutation rate of TPE repeats: a microsatellite in the putative transposase of the hobo element in *Drosophila melanogaster* / S. Souames, E. Bonniard, C. Bazin [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* - 2003. - Vol. 20. - P. 1826-1832.

17. Vieira C. Transposable element dynamics in two sibling species: *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* / C. Vieira, C. Bi'émont // *Genetica.* - 2004. - Vol. 120. - P. 115-123.

Резюме

Козерецька І.А. TPE повтори hobo елемента в геномах представників природних популяцій *Drosophila melanogaster* України.

Дослідження динаміки мобільного генетичного елемента hobo в природних популяціях свідчить про історичні закономірності, які дозволяють передбачити нещодавність інвазії цим елементом, яка відбулася у всьому світі в геномах *D. melanogaster*, можливо, за рахунок горизонтального переносу. У якості молекулярного маркера використовують TPE тандемні повтори нуклеотидної послідовності цього елемента. Вивчення TPE повторів у 8-ми природних популяціях дрозофіли з різних локалітетів, які розташовані на території України, формуючи широтний зріз, показало, що крім відомих три-TPE повторів зустрічаються також 6- та 7-TPE мотиви. Ми гіпотезуємо, що відсутність поліморфізму досліджуваної ділянки hobo елемента може пояснюватися радіоактивним забрудненням у місцях існування відповідних популяцій плодових мух.

Ключові слова: *drosophila*; hobo; природні популяції; радіоактивне забруднення; TPE тандемні повтори; транспозон.

Резюме

Козерецкая И.А. TPE повторы hobo элемента в геномах представителей природных популяций *Drosophila melanogaster* Украины.

Исследование динамики мобильного генетического элемента hobo в природных популяциях свидетельствует о исторических закономерностях, которые позволяют предположить инвазию эти элементов в недавнем времени, которая имела место во всем мире в геномах *D. melanogaster*, возможно, путем горизонтального переноса. В таких исследованиях в качестве молекулярного маркера используют TPE тандемные повторы нуклеотидной последовательности этого элемента. Изучение TPE повторов в 8-ми природных популяциях дрозофилы с разных локалитетов, которые располагаются на территории Украины, формируя широтный срез, показало, что кроме известных три-TPE повторов встречаются также 6- и 7-TPE мотивы. Выдвинуто предположение, что отсутствие полиморфизма исследованного участка hobo элемента может объясняться радиоактивным загрязнением в местах существования соответствующих популяций плодовых мух.

Ключевые слова: *drosophila*; hobo; природные популяции; радиоактивное загрязнение; TPE тандемные повторы; транспозон.

Summary

Kozeretska I.A. Tandem TPE repeats of hobo elements in natural populations of *Drosophila melanogaster* in Ukraine.

Temporal surveys of hobo transposable elements in natural populations reveal a historical pattern suggesting a recent world-wide invasion of *D. melanogaster* genome by these transposons, perhaps following a recent horizontal transfer. To clarify the dynamics of hobo elements in natural populations we used TPE tandem repeats observed of the element as molecular markers. We studied the number of TPE repeats in 8 wild populations collected in various places from the north to the south of Ukraine. Beside the three-TPE elements, five populations demonstrated the presence of hobo with seven-TPE tandem repeats. One population was found to have six-TPE repeats. We suggest that the absence of polymorphism in the tandem repeats of the TPE region of hobo element may be linked to radioactive contamination of the areas inhabited by respective populations.

Key words: *drosophila*; hobo; natural population; radioactive contamination; TPE tandem repeats; transposon.

Рецензент: к.б.н., м.н.с. О.В. Линчак