

ПОЛИМОРФИЗМ ПО ГЕНУ *YELLOW* У *DROSOPHILA MELANOGASTER* ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

© Л. П. Захаренко,^{1,2,*} М. П. Перепелкина,² И. К. Захаров^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск,

и ² Кафедра цитологии и генетики Новосибирского государственного университета;

* электронный адрес: zakharlp@bionet.nsc.ru

Исследовали молекулярно-генетические характеристики гена *yellow* (*y*; 1—0.0), определяющего окраску тела у фенотипически нормальных и мутантных аллелей, выделенных в разные годы из географически удаленных популяций *Drosophila melanogaster*. Карты рестрикции всех исследованных линий отличаются друг от друга и от маркерной линии Oregon. Из результатов FISH-анализа следует, что в районе X-хромосомы, где локализован ген *yellow*, в линии *y*¹⁻⁷⁷⁵ не выявлено ни *P*-, ни *hobo*-элементов, в линиях *y*¹⁻⁸⁵⁹ и *y*¹⁻⁸⁶⁶ обнаружен *hobo*-элемент, в линии *sn*⁸⁴⁹ — *P*-элемент, в линии *y*¹⁻⁷¹⁹ обнаружены оба типа мобильных элементов. Таким образом, все исследованные мутации по гену *yellow* имеют независимое происхождение. В гене *yellow*, расположенном на самом конце X-хромосомы (цитологический район 1A5—8), по сравнению с геном *white* (район 3C2) достоверно больше мутаций, индуцированных транспозонами, чем ретротранспозонами. Возможно, на концах хромосом *D. melanogaster* транспозоны более активны, чем ретротранспозоны.

Ключевые слова: полиморфизм, *yellow*, *Drosophila melanogaster*, *hobo*, *P*-элемент.

Большую часть спонтанных мутаций *Drosophila melanogaster* связывают с перемещением мобильных элементов, представляющих собой несколько десятков семейств и составляющих почти четверть генома *D. melanogaster* (Karitonov, Jurka, 2003). По крайней мере два мобильных элемента (*P*- и *hobo*-транспозоны) появились в геноме *D. melanogaster* в середине прошлого века. Скорость перемещения этих мобильных элементов настолько высока, что на базе *P*- и *hobo*-элементов созданы векторы, используемые для насыщения генома *D. melanogaster* мутациями.

Анализ распределения мобильных элементов в полностью секвенированном геноме показывает, что плотность их распределения по хромосомам обратно пропорциональна частоте рекомбинации (Rizzon et al., 2002; Campuzano et al., 2007). Для транспозонов эта зависимость выражена сильнее, чем для ретротранспозонов (Rizzin et al., 2002). В частности, плотность распределения транспозонов достоверно выше вблизи теломерной ДНК X-хромосомы, где частота рекомбинаций ниже, чем в центральной части хромосомы. Поскольку скорость перемещения *P*- и *hobo*-элементов иногда сопоставима со скоростью перемещения всех остальных мобильных элементов, вместе взятых, в случайной выборке спонтанных мутаций, особенно если ген находится на конце хромосомы, по крайней мере в половине случаев мутации должны быть вызваны внедрением этих двух семейств мобильных элементов. Другими словами, в гене *yellow* мутации должны возникать чаще за счет транспозонов, чем за счет ретротранспозонов.

Из природных популяций *D. melanogaster* были выделены различные аллели гена *yellow*. Исследование моле-

кулярной природы мутаций по гену *yellow* пяти *y*¹-мутаций показало, что карты рестриктазы гена *yellow* в этих линиях отличаются друг от друга и от маркерной линии. Только в одном случае из 5 проанализированных аллелей в районе гена *yellow* не было обнаружено *P*- и (или) *hobo*-элементов. Кроме этого, даже у фенотипически нормальной по гену *yellow* линии *y*⁺*sn*⁸⁴⁹ по сравнению с маркерной линией Oregon отмечаются изменения в структуре гена *yellow*.

Материал и методика

В работе были использованы линии, выделенные в разные годы из природных популяций *Drosophila melanogaster*: *y*¹⁻⁷¹⁹ (г. Краснодар, 1983 г.), *y*¹⁻⁷⁷⁵ (г. Умань, 1984 г.), *y*⁺*sn*⁸⁴⁹ (г. Краснодар, 1974 г.), *y*¹⁻⁸⁵⁹ (г. Запорожье, 1991 г.), *y*¹⁻⁸⁶⁶ (г. Бийск, 1991 г.) и лабораторная линия Oregon. Линия *y*⁺*sn*⁸⁴⁹ имеет нормальный фенотип по гену *yellow* и мутантный по гену *singed* (1; *sn* — 21.0) и дает реверсию к нормальному *sn*⁺-фенотипу с частотой 10⁻³. С момента выделения все линии дрозофил поддерживаются в фонде Лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН.

Тотальную ДНК из взрослых мух для гибридизации по Саузерну выделяли, как описано ранее (Sambrook et al., 1982; Ashburner, 1989). Клоны из гена *yellow* были получены от д-ра J. Modolell (Campuzano et al., 1985) и д-ра V. Corces (Geyer et al., 1986, 1990; Geyer, Corces, 1987) через проф. П. Г. Георгиева. Мечение ДНК ³²P-АТФ и Саузерн-блот-анализ проводили согласно Ашбурнеру (Ashburner, 1989).

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) проводили на давленных препаратах слонных желез личинок по стандартной методике. Препараты прогревали при 60 °С 1 ч в 2-кратном SSC и денатурировали в растворе 0.07 M NaOH 3 мин. В качестве зонда использовали клонированную ДНК мобильных элементов: *hobo* (получена от проф. J. Lim, США) и *P* (получена от д. б. н. С. А. Демакова, ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). ДНК зондов метили с помощью ник-трансляции биотинилированным дезокси-УТФ или дезоксиУТФ-дигоксигенином (Медиген, Новосибирск). Гибридизацию проводили при 37 °С в течение ночи. Состав гибридизационной смеси: 50%-ный формамид, 10%-ный декстрансульфат, 4-кратный SSC, 1-кратный раствор Денхардта, 0.1 M фосфатный буфер, pH 7.6, и 10–20 нг меченой ДНК на препарат. После гибридизации препараты промывали в 2-кратном SSC при 42 °С 3 раза по 5 мин. Детекцию биотина проводили с помощью авидин-FITC, детекцию дигоксигенина — с помощью антидигоксигенин-Су3 (Molecular Probes, США). В качестве антифейда использовали Vectashield с DAPI (Vector, США). Для анализа препаратов использовали микроскоп Axioskop-2 Plus с камерой CCD VC44 PCO, программное обеспечение ISIS3 (METSYSYSTEMS GmbH).

Результаты и обсуждение

Ген *yellow Drosophila melanogaster* имеет длину 7623 п. н., на интрон приходится 2716 п. н. (рис. 1; по: Geyer et al., 1986). Мутации по гену *yellow* разделяют в основном на два фенотипических класса: *yellow-1* (все тело желтое) и *yellow-2* (тело и крылья желтые, щетинки черные). Энхансер окраски тела и крыльев находится в регуляторной части гена *yellow*, т. е. мутации *yellow-2* возникают при повреждении регуляторной части гена, тогда как энхансер окраски щетинок расположен в интроне этого гена и мутации *yellow-1*, как правило, затрагивают структурную часть гена или интрон (Nash, Yarkin, 1974).



Рис. 1. Схема строения гена *yellow Drosophila melanogaster* (по данным: Geyer et al., 1986).

А — строение гена: G — *Bgl*II, H — *Hind*III, K — *Kpn*I, X — *Xho*I, R — *Eco*RI. Жирной линией обозначен зонд, стрелкой указано направление транскрипции открытой рамки считывания. Б — положение и длина фрагментов ДНК после рестрикции ДНК маркерной линии *Oregon R* разными рестриктазами с указанием длин фрагментов в тыс. нуклеотидных пар. Пунктиром обозначен интрон (схема составлена не в масштабе).

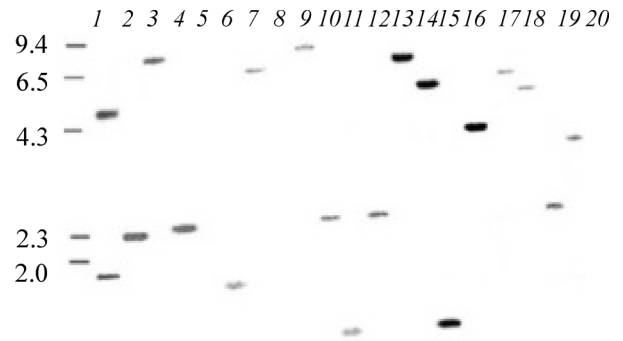


Рис. 2. Блот-гибридизация геномной ДНК линий y^{1-866} (1, 5, 9), y^{1-719} (2, 6, 10), y^{1-775} (3, 7, 11) и y^{1-859} (4, 8, 12) после рестрикции рестриктазами *Bgl*II-*Xho*I (1–4), *Bgl*II-*Hind*III (5–8), *Kpn*I (9–12); линий *Oregon R* (13–16) и $y^{+sn^{849}}$ (17–20) после рестрикции рестриктазами *Bgl*II-*Xho*I (13–17), *Bgl*II-*Hind*III (14, 18), *Kpn*I (15, 19), *Eco*RI-*Hind*III-*Sal*GI (16, 20) и гибридации с зондом *Hind*III-*Bam*HI.

Слева указаны молекулярные массы фрагментов (λ) — *Hind*III в тыс. пар нуклеотидов.

Муши линий y^{1-866} , y^{1-719} и y^{1-859} имеют одинаковый фенотип *yellow-1*: из-за отсутствия пигмента, кодируемого геном *yellow*, тело, крылья, щетинки и другие придатки имеют желтую окраску. Для анализа молекулярной структуры гена *yellow* в этих линиях мы использовали рестриционное картирование, которое позволяет выявлять не только полиморфизм по сайтам рестрикции, вызванный нуклеотидными заменами, но и существенные изменения в структуре генов, произошедшие из-за встроек/вырезаний фрагментов ДНК.

Результаты блот-гибридизации геномной ДНК линий y^{1-866} , y^{1-719} , y^{1-775} , y^{1-859} после рестрикции рестриктазами *Bgl*II-*Xho*I, *Bgl*II-*Hind*III, *Kpn*I и линий *Oregon*, $y^{+sn^{849}}$ после рестрикции рестриктазами *Bgl*II-*Xho*I, *Bgl*II-*Hind*III, *Kpn*I, *Eco*RI-*Hind*III-*Sal*GI и гибридации с зондом *Hind*III-*Bam*HI из регуляторной зоны гена *yellow* и свидетельствуют о том, что все эти линии отличаются друг от друга по молекулярно-генетическим характеристикам (рис. 2).

Характер нарушений, исходя из данных Саузерн-блот-гибридизации, следующий. В пределах разрешающей способности метода линия y^{1-775} не отличается от маркерной линии *Oregon* по набору фрагментов ДНК и их длине, исключая несколько большую длину фрагмента, вырезаемого *Bgl*II-*Hind*III. В линии $y^{+sn^{849}}$ все фрагменты, расположенные правее сайта рестрикции *Bgl*II, несколько короче, чем в маркерной линии, кроме фрагмента, вырезаемого рестриктазой *Kpn*I. Поскольку, несмотря на изменение структуры гена, фенотип линии $y^{+sn^{849}}$ не изменен, возможно, в интроне гена *yellow* этой линии произошла короткая делеция. Что касается результатов рестрикции по *Kpn*I, то по крайней мере еще в двух исследуемых линиях (y^{1-719} и y^{1-859}) эта рестриктаза вырезает из генома фрагмент ДНК той же длины (рис. 2). По-видимому, в природных популяциях *D. melanogaster* существует полиморфизм по этому сайту рестрикции. Линия y^{1-866} имеет, скорее всего, дубликацию или инверсию части гена *yellow*, поскольку после рестрикции по *Bgl*II-*Xho*I на геномных блоках выявляются два фрагмента ДНК (один из них сравнительно короткий — длиной 1 т. п. н.). Не исключено, что в линиях y^{1-859} и y^{1-719} структурная часть гена *yellow* имеет отличающиеся друг от друга крупные делеции, по-

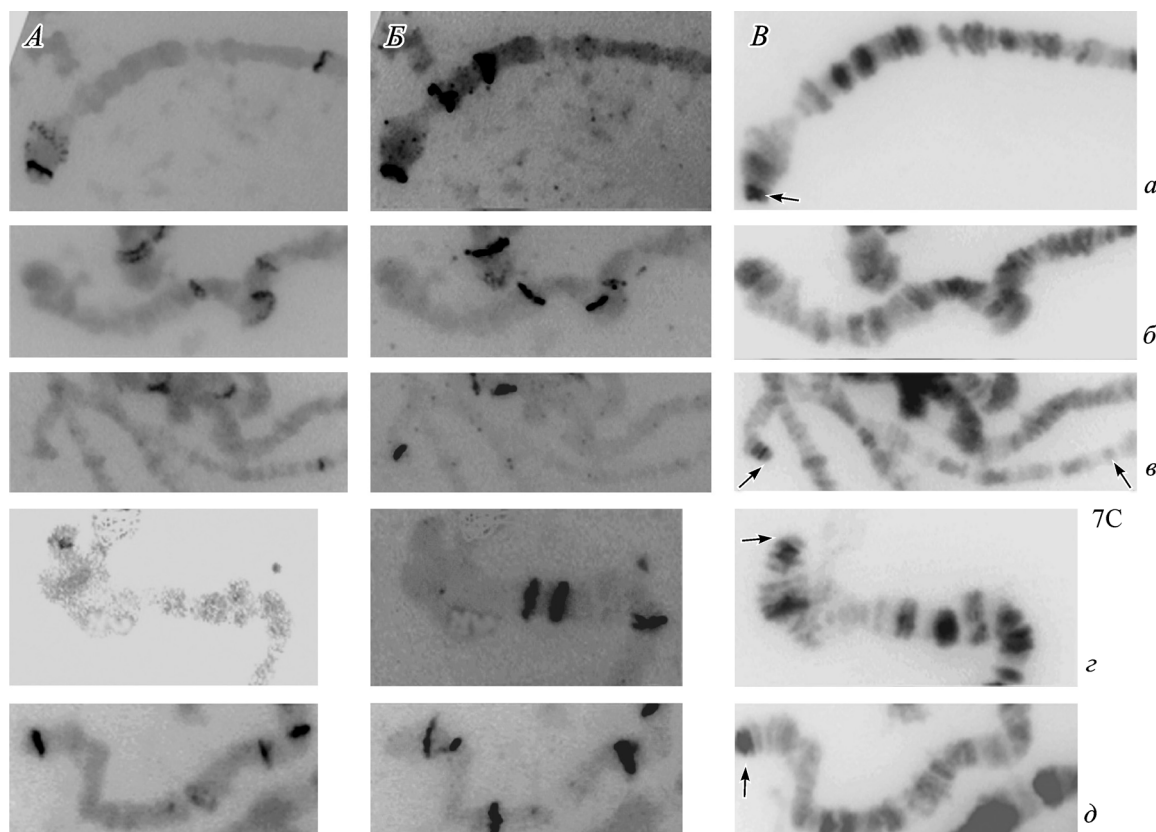


Рис. 3. Флуоресцентная гибридизация in situ (А) ДНК *hobo* (FITC) и (Б) *P*-элемента (Cy3) на конце X-хромосомы линий *Drosophila melanogaster*.

В — тот же фрагмент хромосомы после окрашивания DAPI. а — линия y^{1-719} , б — линия y^{1-775} , в — линия $y^{+sn^{849}}$, г — линия y^{1-859} , д — линия y^{1-866} . Стрелка без подписи указывает на район 1А X-хромосомы.

сколько после рестрикции по *BglII-XhoI* вырезаемый фрагмент ДНК намного короче, чем в маркерной линии, а после рестрикции *BglII-HindIII* в линии y^{1-719} выявляется фрагмент ДНК длиной около 0.7 т. п. н., а в линии y^{1-859} — нет. Судя по характеру изменений структуры гена *yellow* в исследованных линиях по сравнению с маркерной линией *Oregon R*, все исследованные мутации y^1 имеют независимое происхождение и не являются результатом распространения одной и той же мутации в исследованных популяциях.

Из результатов FISH-анализа следует, что в районе 1А X-хромосомы, где локализован ген *yellow*, в трех случаях (рис. 3) обнаружен *hobo*-элемент (линии y^{1-719} , y^{1-859} и y^{1-866}) и в двух случаях (рис. 3, а, в) обнаружен *P*-элемент (линии y^{1-719} и sn^{849}). В линии y^{1-775} , меньше всего отличающейся, по данным Саузерн-блоттинга, от дикой линии, ни *P*-, ни *hobo*-элемента не обнаружено; возможно, мутация в этой линии вызвана сдвигом рамки считывания или нуклеотидными заменами. В линии y^{1-719} в районе 1А обнаружены оба мобильных элемента. Разрешающая способность FISH-анализа не позволяет сделать однозначные заключения о причастности *hobo* и *P*-элемента к y^1 -мутации, но и исключить их участие в появлении этих мутаций нельзя.

Скорее всего, мутация в гене *singed* в линии $y^{+sn^{849}}$ связана с *P*-элементами, поскольку в районе 7D, где локализован этот ген, есть сайт гибридизации *P*-элемента (рис. 3, в).

Таким образом, из 5 мутаций *yellow*, выделенных из природы в разные годы и из разных популяций, только

в 1 случае не обнаружено сайтов гибридизации транспозонов *P* и *hobo* в районе 1А X-хромосомы. В литературе описано несколько мутаций по гену *yellow*, индуцированных транспозонами *hobo* (Грачева и др., 1998; Gause et al., 1997) и *P* (Golovnin et al., 2002), а также ретротранспозонами *gypsy* (Melnikova et al., 2002) и *mdg4* (Georgiev, Kovzucina, 1996). Т. е. из 4 мобильных элементов, индуцированных описанные ранее в литературе мутации в гене *yellow*, 2 относятся к транспозонам. Итак, по крайней мере 6 мутаций в гене *yellow* из 9 (4 описанных в литературе и 5 исследованных в данной работе) интродуцированы транспозонами.

В гене *white*, расположенном ближе, чем ген *yellow*, к центральной части X-хромосомы (район 3С2), из 19 мутаций, вызванных мобильными элементами, только 4 мутации индуцированы транспозонами P и FB (Lindsley, Zimm, 1992). В гене *yellow* по сравнению с геном *white* достоверно больше мутаций, индуцированных транспозонами (критерий Фишера, уровень значимости 0.05).

Таким образом, можно предположить, что транспозоны могут вызывать больше мутаций на концах хромосом *D. melanogaster*, чем ретротранспозоны. Для проверки этого предположения необходимы дальнейшие исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-48838 и 06-04-48116) и программы президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

Список литературы

- Голубовский М. Д., Захаров И. К., Соколова О. А. 1987. Анализ нестабильных аллелей гена *yellow*, выделенных из природной популяции дрозофил в период вспышки мутабельности. Генетика. 23 (9) : 1595—1603. [Golubovsky M. D., Zakharov I. K., Sokolova O. A. 1987. Analysis of instability in *yellow* gene originated from natural population of *Drosophila* during mutational burst. Genetika (Russian). 23 : 1595—1603.]
- Грачева Е. М., Захаров И. К., Волошина М. А., Георгиев П. Г., Голубовский М. Д. 1998. Вспышки мутаций гена *yellow* в природной популяции *Drosophila melanogaster* связаны с инсерцией транспозона *hobo*. Генетика. 34 (4) : 462—468. [Gracheva E. M., Zakharov I. K., Voloshina M. A., Georgiev P. G., Golubovskii M. D. 1998. Mutation bursts of the *yellow* gene in a natural *Drosophila melanogaster* population is connected with insertion of the *hobo* transposon. Genetika *D. melanogaster* (Russian). 34 : 462—468.]
- Ashburner M. 1989. *Drosophila*: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab., CSH. 1331 p.
- Campuzano S., Carramolino L., Cabrera C., Ruiz Gomez M., Villares R., Boronat A., Modolell J. 1985. Molecular genetics of the *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster*. Cell. 44 : 327—338.
- Gause M., Hovannisian H., Kan T., Kuhfittig S., Mogila V., Georgiev P. 1998. The *hobo*-induced rearrangements in the *yellow* locus influence the insulation effect of *gypsy su(Hw)*-binding region in the *Drosophila melanogaster*. Genetics. 149 : 1393—1405.
- Georgiev P., Kozycina M. 1996. Interaction between mutations in the suppressor of Hairy wing and modifier of *mdg4* genes of *Drosophila melanogaster* affecting the phenotype of *gypsy*-induced mutations. Genetics. 142 : 425—436.
- Geyer P. K., Corces V. G. 1987. Separate regulatory elements are responsible for the complex pattern of tissue-specific and development transcription of the *yellow* locus in *Drosophila melanogaster*. Genes and Development. 1 : 996—1004.
- Geyer P. K., Green M. M., Corces V. G. 1990. Tissue-specific transcriptional enhancers may act in trans on the gene located in the homologous chromosome: the molecular basis of transvection in *Drosophila*. EMBO J. 9 : 2247—2256.
- Geyer P. K., Spana C., Corces V. G. 1986. On the molecular mechanisms of *gypsy*-induced mutations at the *yellow* locus of *Drosophila melanogaster*. EMBO J. 5 : 2657—2662.
- Golovnin A., Georgieva S., Hovhannisyann H., Barseguyan K., Georgiev P. 2002. *P* element-mediated duplications of genomic regions in *Drosophila melanogaster*. Chromosoma. 111 : 126—138.
- Kapitonov V. V., Jurka J. 2003. Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 6569—6574.
- Lindsley D. J., Zimm G. G. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego; New York: Acad. Press. 1134 p.
- Melnikova L., Gause M., Georgiev P. 2002. The *gypsy* insulators flanking *yellow* enhancers do not form a separate transcriptional domain in *Drosophila melanogaster*: the enhancers can activate an isolated *yellow* promoter. Genetics. 160 : 1549—1560.
- Nash W. G., Yarkin R. J. 1974. Genetic regulation and pattern formation: a study of the *yellow* locus in *Drosophila melanogaster*. Genet. Res. 24 : 19—26.
- Rizzon C., Marais G., Gouy M., Bietmont C. 2002. Recombination rate and the distribution of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. Genome Res. 12 : 400—407.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab., CSP. 545 p.

Поступила 2 VIII 2007

POLYMORPHISM OF *YELLOW* LOCUS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* FROM NATURAL POPULATIONSL. P. Zakharenko,^{1,2,*} M. P. Perepelkina,² I. K. Zakharov^{1,2}¹ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of RAS, Novosibirsk, and² Department of Cytology and Genetics, Novosibirsk State University;

* e-mail: zakharp@bionet.nsc.ru

We studied molecular characteristics of *yellow* (*y*; 1—0.0) locus, which determines the body coloration of phenotypically wild-type and mutant alleles isolated from geographically distant populations of *Drosophila melanogaster* in different years. According to Southern data, restrictions map of *yellow* locus of all studied strains differ from each other as well as from that of Oregon stock. FISH analysis shows that in the neighborhood of *yellow* locus in X chromosome neither *P* nor *hobo* elements are found in *y*¹⁻⁷⁷⁵ stock, while only *hobo* is found there in *y*¹⁻⁸⁵⁹ and *y*¹⁻⁸⁶⁶ stocks, only *P* element in *y*⁺sn⁸⁴⁹ stock, and both elements in *y*¹⁻⁷¹⁹ stock. Thus, all studied mutant variants of *yellow* are of independent origin. *Yellow* locus residing at the very end of X chromosome (region 1A5—8 of cytologic map) carries significantly more transposon than retrotransposon-induced mutations, as compared to *white* locus (regions 3C2). It is possible that transposons are more active than retrotransposons at the chromosomal ends of *D. melanogaster*.