

ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОЗОНА *MARINER* ИЗ ГЕНОМА ПАРАЗИТИЧЕСКОГО ПЛОСКОГО ЧЕРВЯ *HIMASTHLA ELONGATA*

© Н. К. Галактионов, О. И. Подгорная, А. В. Федоров

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: nikolai.galaktionov@gmail.com

В геноме плоского паразитического червя *Himasthla elongata* впервые выявлен и охарактеризован ДНК-транспозон *Hemar1*, представитель широко распространенного у эукариот семейства *mariner*. Транспозон *Hemar1* принадлежит к подсемейству *capitata* и высокогомологичен элементу *mariner* пресноводной турбеллярии *Dugesia tigrina*. Установлено, что транспозон *Hemar1* является диспергированным повтором. Элементы *mariner*, гомологичные *Hemar1*, составляют 0.01 % генома *H. elongata*. Идентифицированный транспозон *Hemar1* является удобным инструментом для дальнейшего изучения функционирования мобильных элементов в геноме *H. elongata*.

Ключевые слова: ДНК-транспозоны, *mariner*, плоские черви, паразитология.

Мобильные повторяющиеся элементы составляют значительную часть геномов эукариот (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Перемещение этих последовательностей оказывает серьезное воздействие на геном клетки. Транспозиция мобильных элементов может модифицировать экспрессию генов, приводить к геномным перестройкам, в частности к появлению клональной изменчивости (DeMarco et al., 2006). Однако особенности организации и функционирования мобильных элементов в геноме до сих пор мало изучены, чем объясняется необходимость выбора адекватной модельной системы, включающей в себя как транспозоны, так и организм-хозяин, где проявлялись бы различные воздействия мобильных элементов на геном.

Мобильный элемент ДНК *mariner* может послужить удобной моделью для исследования функций транспозонов в геноме. Впервые *mariner* был выявлен у *Drosophila mauritiana* (Jacobson et al., 1986) при изучении мутации, которая фенотипически сопровождалась образованием желто-оранжевого окрашивания глаз. ДНК-транспозоны *mariner* имеют длину около 1.3 т. п. н., фланкированы инвертированными повторами и кодируют транспозазу — фермент, способствующий перемещению элементов *mariner* с помощью механизма вырезания—встраивания (Miskey et al., 2005). Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей элементов *mariner*, выявленных у разных видов — показал, что, несмотря на невысокую (около 50 %) гомологию различных представителей *mariner*, в составе этих элементов можно выделить консервативные на аминокислотном уровне последовательности, соответствующие функциональным доменам транспозазы. Это наблюдение позволило разработать эффективный подход для выявления элементов *mariner* в различных геномах. В его основе лежит ПЦР-анализ с вырожденными праймерами к консервативным на аминокислотном уровне участкам гена транспозазы (Robertson, MacLeod, 1993).

С помощью этого подхода последовательности, гомологичные элементам *mariner*, были обнаружены у широкого круга животных, включая насекомых (Robertson, MacLeod, 1993), нематод (Sedensky et al., 1994), плоских червей (Garcia-Fernandez et al., 1993), земноводных и приматов (Robertson, 1997; Robertson, Zumpano, 1997). Совокупность этих последовательностей формирует семейство транспозонов *mariner*, которое содержит активные, способные к перемещению копии (Bryan et al., 1987; Medhoga et al., 1991, Munoz-Lopez et al., 2008).

Данные о присутствии в одном геноме разных подсемейств *mariner* высокой степени гомологии ряда представителей *mariner*, идентифицированных в геномах филогенетически отдаленных друг от друга животных (Maruyama, Hartl, 1991; Robertson, 1993; Robertson, MacLeod, 1993), а также отсутствие элементов *mariner* в геномах некоторых видов (Casse et al., 2006; Feschotte, Pritham, 2007; Laha et al., 2007) послужили основанием для выдвижения гипотезы о горизонтальном переносе элементов *mariner* (Maruyama, Hartl, 1991; Hartl, 1997). Несмотря на большой объем накопленных данных, до сих пор неясны некоторые особенности организации и функционирования в геноме элементов *mariner*.

Открыт и вопрос о возможной роли транспозонов *mariner* в генетической вариабельности организмов, ответ на который может дать изучение элемента *mariner* в геноме паразитического организма, обладающего широким кругом хозяев. Система паразит—хозяин перспективна, поскольку дает возможность параллельно изучать функционирование мобильных элементов в геноме паразита и их возможное влияние на геномы организмов хозяев. Поэтому для проведения настоящего исследования выбрана система, представленная плоским паразитическим червем *Himasthla elongata* (Trematoda, Echinostomatidae) и его хозяевами. Жизненный цикл *H. elongata* протекает с чередованием партеногенетических и гермафродитного поколе-

ний в широком круге филогенетически удаленных хозяев. Свободноживущая личинка гермафродитного поколения — мирацидий (рис. 1, I) попадает в первого промежуточного хозяина — *Littorina littorea*, *L. obtusata* или *L. saxatilis* (Mollusca, Gastropoda), где претерпевает метаморфоз, преобразуясь в материнскую спороцисту и затем в редию (рис. 1, II). Размножаясь патреногенетически, редии производят свободноживущих личинок — церкарий (рис. 1, III). Попадая во второго промежуточного хозяина — *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia), церкарии инцистируются (рис. 1, IV) до попадания в окончательного хозяина — *Larus argentatus* (Aves, Laridae), где преобразуется в гермафродитную стадию — мариту (рис. 1, V). Необходимым этапом исследования функций мобильных элементов в представленной системе является определение структурной организации транспозонов в геноме *H. elongata*. Это имеет важное значение как для определения клональной изменчивости партенит, описанной для родственных *H. elongata* видов (Grevelding, 1999; Bayne et al., 2003), так и с эволюционной точки зрения. В настоящее время геном *H. elongata* мало изучен, и в его составе не выявлено ни одного мобильного элемента. Цель настоящей работы — выявление и характеристика транспозона семейства *mariner* из генома плоского паразитического червя *H. elongata*.

Материал и методика

Сбор материала. Животные собраны в окрестностях Беломорской биологической станции «Картеш» Зоологического института РАН. Моллюски *Littorina littorea*, *L. saxatilis* и *L. obtusata* (рис. 1, II) взяты на литорали в районе станции. В качестве источника ДНК паразитов служили церкарии *H. elongata* (рис. 1, III), выделенные из зараженных моллюсков.

Выделение геномной ДНК из паразитического плоского червя *H. elongata* проводили по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра СФ26 при длине волны 260/280 нм методом Вабурга и Кристиана (Досон и др., 1991).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). В геноме *H. elongata* транспозоны семейства *mariner* выявляли с помощью ПЦР с вырожденными праймерами Mar-124F 5'-TGGGTNCCNCAYGARYT-3' и Mar-276R 5'-GGNGCNARRTCNGGNSWRTA-3' (Robertson, 1993) (рис. 2, а). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 2 мкл буфера для Taq-полимеразы, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 mM каждого dNTP, по 20 пМ праймеров Mar-124F и Mar-276R, 200 нг геномной ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы (Силекс, Россия). Амплификацию проводили по следующей программе: 30 циклов (денатурация 1 мин при 95 °С, отжиг 1 мин при 55 °С, синтез 1 мин при 72 °С).

Электрофорез ДНК в агарозном геле. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле в 1-кратном ТАЕ-буфере (40 mM Трис-ацетат, pH 8.0, 1 mM ЭДТА) (Sambrook et al., 1989). ДНК выявляли окрашиванием водным раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл) и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Клонирование и секвенирование. Продукты ПЦР клонировали в вектор pTZ57R/T с помощью набора InsTAclone (Fermentas, Литва) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Клетки *Escherichia coli* DH5alpha трансформировали продуктами лигазной реакции с по-

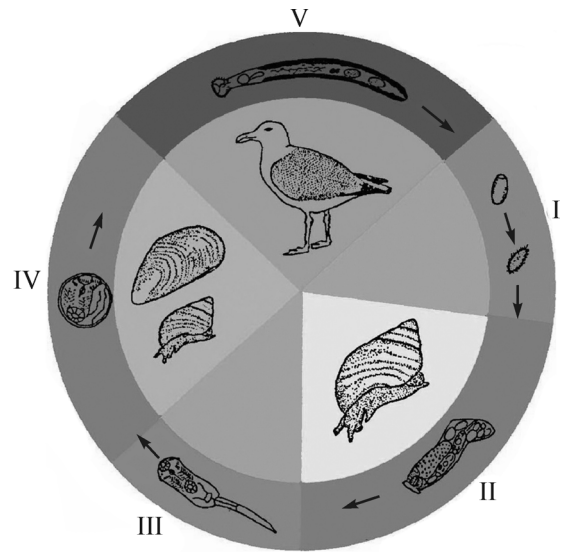


Рис. 1. Жизненный цикл *Himasthla elongata* (модифицировано по: Wreding et al., 1969).

I — яйцо и вылупившийся мирацидий, плавающий в толще воды, II — редия, паразитирующая в представителях рода *Littorina*, III — свободноживущая личинка партеногенетического поколения — церкария, IV — инцистировавшаяся в *Mytilus edulis* метациркария, V — марита, паразитирующая в *Larus argentatus*.

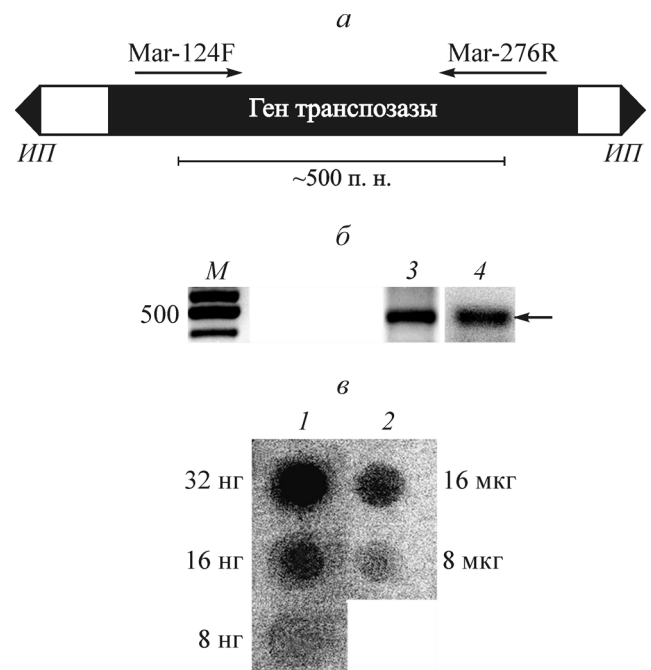


Рис. 2. Выявление транспозона *mariner* в геноме *Himasthla elongata*.

а — схематическое изображение транспозона *mariner*; ИП — инвертированные повторы; относительное положение праймеров Mar-124F и Mar-276R показано стрелками. б — электрофорез продуктов ПЦР с праймерами Mar-124F и Mar-276R на геномной ДНК: *E. coli* (2), *H. sapiens* (3), *H. elongata* (4); 1 — геномная ДНК в реакции отсутствовала. М — маркер молекулярной массы, стрелки указывают положение специфично амплифицирующегося фрагмента. в — определение относительного количества ДНК, гомологичный элементу *Hemar 1* в геноме *H. elongata*. Дот-блот-гибридизация радиоактивно меченого фрагмента HemC1 с плазмидой pHemC1 (1) и геномной ДНК *H. elongata* (2). Цифрами обозначены количества ДНК, нанесенные на мембрану.

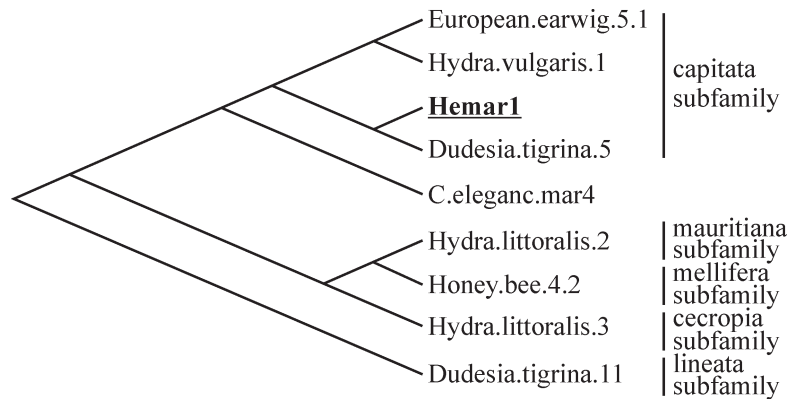


Рис. 3. Кладограмма элементов *mariner*, основанная на выравнивании предсказанных аминокислотных последовательностей фрагментов транспозаз, принадлежащих к характерным представителям известных подсемейств *mariner* (Robertson, 1997), и фрагмента транспозазы элемента *Hemar 1*.

Справа указаны названия подсемейств, к которым принадлежат исследованные ранее элементы *mariner*, согласно Robertson, 1997.

мощью набора TransformAid (Fermentas, Литва). Вставку полученной плазмиды, названной рHemC1, секвенировали в фирме Силекс (Москва).

Введение меченых нуклеотидов в последовательности ДНК. Фрагмент транспозона *mariner* *H. elongata* метили [α - 32 P]-dATP (Amersham, Великобритания) методом ПЦР. Матрицей в такой реакции служила плазида рHemC1. Меченые фрагменты очищали от не включившихся нуклеотидов при помощи электрофореза в 0.5%-ном агарозном геле.

Дот-блот-гибридизация. Геномную ДНК *H. elongata* и плазмиду рHemC1 денатурировали, перенесли на нейлоновую мембрану Hybond N+ (Amersham, Великобритания) в буферном растворе (0.2 М NaOH, 10 · SSC, pH 7.5) и фиксировали ультрафиолетом. Гибридизацию проводили по стандартному протоколу (Wahl et al., 1979). Для детекции участков гибридизации мембрану высушивали и экспонировали на рентгеновскую пленку XAR-5 Kodak.

Компьютерные методы анализа. Для сравнения фрагментов ДНК применяли программу BLAST (Altschul et al., 1990). Трансляцию нуклеотидной последовательности фрагмента гена транспозазы проводили с помощью программы DNASIS 2.5. Филогенетический анализ выполняли с использованием ресурса TreeTop-Phylogenetic Tree Prediction (Yushmanov, Chumakov, 1988). Сравнительную денситометрию сигналов дот-блот-гибридизации проводили с использованием программного обеспечения Gel-Pro Analyser 3.1.

Результаты и обсуждение

Для выявления транспозонов *mariner* в геноме *H. elongata* применяли успешно используемый на представителях других видов подход ПЦР-анализа с вырожденными праймерами (Robertson, MacLeod, 1993; Robertson, 1997; Yoshiyama et al., 2001). В качестве контроля в этом эксперименте использовали ДНК видов, для которых известны наличие и отсутствие транспозонов *mariner* в геноме — ДНК человека и *E. coli* соответственно (Arkhipova, Meselson, 2000). В результате ПЦР с праймерами Mar-124F и Mar-276R на геномной ДНК *H. elongata* амплифицирован фрагмент ДНК ожидаемой длины (рис. 2, б, дорожка 4). Это позволило предположить присутствие

транспозонов семейства *mariner* в геноме *H. elongata*. На следующем этапе работы амплифицированный с геномной ДНК *H. elongata* продукт был клонирован и секвенирован, как это описано в разделе «Материал и методика».

Клонированный в плазмиде рHemC1 фрагмент HemC1 имеет длину 484 п. н. и ограничен последовательностями, гомологичными праймерам Mar-124F и Mar-276R. С помощью программы BLAST в базе данных секвенированной ДНК из коллекций GenBank, EMBL и DDBJ выявлено 8 последовательностей, показавших высокую степень гомологии с HemC1. Все выявленные последовательности определены как фрагменты генов транспозазы транспозонов *mariner* различных животных. Наибольшую (88 %) и существенно отличающуюся от остальных степень гомологии с фрагментом HemC1 проявил фрагмент ДНК транспозона *mariner* представителя отряда трематод — пресноводной турбеллярии *Dugesia tigrina* (клон *D. tigrina*. 5; accession U51176). Полученные результаты доказывают, что клонированная последовательность HemC1 есть фрагмент транспозона *mariner*. Эксперименты по гибридизации (рис. 2, в) подтвердили принадлежность выявленного транспозона к геномной ДНК *H. elongata*. Таким образом, последовательность HemC1 представляет собой фрагмент впервые идентифицированного у *H. elongata* транспозона семейства *mariner*. Согласно рекомендациям по использованию номенклатуры мобильных элементов (Caru, 2005), выявленный транспозон получил название *Hemar1* (*H. elongata mariner 1*).

Определение относительного количества ДНК, гомологичной элементу *Hemar1* в геноме *H. elongata*, было проведено методом дот-блот-гибридизации фрагмента *Hemar1* с плазмидой рHemC1 и геномной ДНК *H. elongata* (рис. 2, в, колонки 1 и 2). Картины гибридизации, полученные в двух независимых опытах, не различались. В результате количественного анализа сигналов гибридизации мы установили, что ДНК, гомологичная фрагменту HemC1, занимает 0.01 % генома *H. elongata*.

Анализ предсказанных аминокислотных последовательностей фрагментов транспозаз *mariner* из геномов различных животных показал высокую гетерогенность элементов *mariner*. Это позволило выделить семь подсемейств *mariner*: *cecropia*, *mauritiana*, *melifera*, *capitata*, *lineata*, *irritianas* и *mori*. При этом геном одного животного может нести транспозоны *mariner*, относящиеся к разным подсемействам (Garcia-Fernandez et al., 1995; Robert-

son, Zumpano, 1996; Robertson, Martos, 1997; Carr, 2008). Степень гомологии элементов *mariner* из разных подсемейств существенно ниже степени гомологии транспозонов внутри одного подсемейства. Поэтому принадлежность к тому или иному подсемейству является важной характеристикой транспозонов *mariner*. Филогенетический анализ показал, что элемент *Hemar1* принадлежит к подсемейству *capitata* (рис. 3). Среди описанных в литературе элементов *mariner* к подсемейству *capitata* принадлежат транспозоны из геномов *Dugesia tigrina*, *Hydra littoralis*, *H. vulgaris*, а также транспозон Ear. wig. 5. 1 из генома уховертки *Forficula auricularia* (Robertson, 1997). Высокая степень гомологии элементов *Hemar1* и Ear. wig. 5. 1 из геномов животных, принадлежащих к разным таксономическим группам, не исключает участия этих мобильных элементов в процессе горизонтального переноса. Кроме этого, следует отметить высокую степень гомологии транспозонов *Hemar1* из генома *H. elongata* и *D. tigrina*. 5 из генома *D. tigrina*. Несмотря на то что оба этих организма относятся к типу Trematoda, они принадлежат филогенетически весьма отдаленным семействам: *H. elongata* относится к семейству Echinostomata, тогда как *D. tigrina* — к Turbellaria. Разнятся и ареалы их обитания: *H. elongata* обитает в морях северных широт (Белое и Баренцево моря), тогда как *D. tigrina* — в пресноводных водоемах южных широт (Гинецинская, 1968). Таким образом, прямого горизонтального переноса элемента *mariner* между этими видами произойти не могло. Тем не менее ряд видов рода *Himasthla* обитает в южных морях и существует мнение о том, что этот род был изначально распространен в местах с теплыми климатическими условиями и уже позднее интродуцирован на север. Можно допустить, что выявленная высокая степень гомологии элементов *mariner Hemar1* и *D. tigrina*. 5 связана с возможным горизонтальным переносом этих транспозонов между предками современных *D. tigrina* и *H. elongata*.

Определение первичной нуклеотидной последовательности элементов *Hemar1*, их дисперсный характер распределения и высокая копияность в геноме *H. elongata* делают выявленный транспозон *Hemar1* чрезвычайно удобным и на данный момент единственным подходящим маркером для изучения феномена клоальной изменчивости церкарий *H. elongata*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01385).

Список литературы

- Гинецинская Т. А. 1968. Трёматоды, их жизненные циклы и эволюция. Л.: Наука. 143 с.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. 1991. Справочник биохимика. М.: Мир. 544 с.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 5 : 403—410.
- Arkhipova I., Meselson M. 2000. Transposable elements in sexual and ancient asexual taxa. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 19 : 14 473—14 477.
- Bayne C. J., Grevelding C. G. 2003. Cloning of *Schistosoma mansoni* sporocysts *in vitro* and genetic heterogeneity among individual within clones. J. Parasitol. 89 : 1056—1060.
- Bryan G. J., Jacobson J. W., Hartl D. L. 1987. Heritable somatic excision of a *Drosophila* transposon. Science. 27 : 1636—1638.
- Capry P. 2005. Classification and nomenclature of retrotransposable elements. Cytogenet. Genome Res. 110 : 457—461.
- Carr M. 2008. Multiple subfamilies of mariner transposable elements are present in stalk-eyed flies (Diptera: Diopsidae). Genetica. 132 : 113—122.
- Casse N., Bui Q. T., Nicolas V., Renault S., Bigot Y., Laulier M. 2006. Species sympatry and horizontal transfers of Mariner transposons in marine crustacean genomes. Mol. Phylogenet. Evol. 40 : 609—619.
- DeMarco R., Venancio T. M., Verjovski-Almeida S. 2006. SmTRC1, a novel *Schistosoma mansoni* DNA transposon, discloses new families of animal and fungi transposons belonging to the CACTA superfamily. BMC Evol. Biol. 7 : 86—89.
- Feschotte C., Pritham E. J. 2007. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. Annu. Rev. Genet. 41 : 331—368.
- Garcia-Fernandez J., Bayasacas-Ramirez J. R., Marfany G., Munoz-Marmol A. M., Casali A., Baguna J., Salo E. 1995. High copy number of highly similar mariner-like transposons in planarian (Platyhelminth): evidence for a trans-phyla horizontal transfer. Mol. Biol. Evol. 12 : 421—431.
- Garcia-Fernandez J., Marfany G., Baguna J., Salo E. 1993. Infiltration of mariner elements. Nature. 8 : 109—110.
- Grevelding C. G. 1999. Genomic instability in *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 101 : 207—216.
- Hartl D. L. 1997. Mariner sails into Leishmania. Science. 276 : 1659—1660.
- Jacobson J. W., Medhora M. M., Hartl D. L. 1986. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 83 : 8684—8688.
- Laha T., Loukas A., Wattanasatitarpa S., Somprakhon J., Kewgrai N., Sithithaworn P., Kaewkes S., Mitreva M., Brindley P. J. 2007. The bandit, a new DNA transposon from a hookworm-possible horizontal genetic transfer between host and parasite. PLoS Negl. Trop. Dis. 1 : e35.
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C. et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 409 : 860—921.
- Maruyama K., Hartl D. L. 1991. Evidence for interspecific transfer of the transposable element mariner between *Drosophila* and *Zaprionus*. J. Mol. Evol. 33 : 514—524.
- Medhora M., Maruyama K., Hartl D. L. 1991. Molecular and functional analysis of the mariner mutator element Mos1 in *Drosophila*. Genetics. 128 : 311—318.
- Miskey C., Izsvák Z., Kawakami K., Ivics Z. 2005. DNA transposons in vertebrate functional genomics. Cell. Mol. Life. Sci. 62 : 629—641.
- Munoz-Lopez M., Siddique A., Bischerour J., Lorite P., Chalmers R., Palomeque T. 2008. Transposition of Mboumar—9 : identification of a new naturally active mariner-family transposon. J. Mol. Biol. 382 : 567—572.
- Robertson H. M. 1993. The mariner transposable element is widespread in insects. Nature. 362 : 241—245.
- Robertson H. M. 1997. Multiple Mariner transposons in flatworms and hydras are related to those of insects. J. Hered. 88 : 195—201.
- Robertson H. M., MacLeod E. G. 1993. Five major subfamilies of mariner transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly, and related arthropods. Insect Mol. Biol. 2 : 125—139.
- Robertson H. M., Martos R. 1997. Molecular evolution of the second ancient human mariner transposon, Hsmar2, illustrates patterns of neutral evolution in the human genome lineage. Gene. 205 : 219—228.
- Robertson H. M., Zumpano K. L. 1997. Molecular evolution of an ancient mariner transposon, Hemar1, in the human genome. Gene. 205 : 203—217.
- Robertson H. M., Zumpano K. L., Lohe A. R., Hartl D. L. 1996. Reconstructing the ancient mariners of humans. Nat. Genet. 12 : 360—361.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1659 p.

Sedensky M. M., Hudson S. J., Everson B., Morgan P. G. 1994. Identification of a mariner-like repetitive sequence in *C. elegans*. Nucl. Acids Res. 22 : 1719—1723.

Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J. et al. 2001. The sequence of the human genome. Science. 291 : 1304—1351.

Wahl G. M., Stern M., Stark G. R. 1979. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76 : 3683—3687.

Werding B. 1969. Morphologie, Entwicklung und Ökologie digener Trematoden-Larven der Strandschnecke *Littorina littorea*. Marine Biol. 3 : 306—333.

Yoshiyama M., Tu Z., Kainoh Y., Honda H., Shono T., Kimura K. 2001. Possible horizontal transfer of a transposable element from host to parasitoid. Mol. Biol. Evol. 18 : 1952—1958.

Yushmanov S. V., Chumakov K. M. 1988. Algorithms of the maximum topological similarity phylogenetic trees construction. Mol. Genet. Microbiol. Virusol. 3 : 9—15.

Поступила 12 II 2009

CHARACTERIZATION OF TRANSPOSON *MARINER* FROM THE *HIMASTHLA ELONGATA* GENOME

N. K. Galaktionov, O. I. Podgornaya, A. V. Fedorov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: nikolai.galaktionov@gmail.com

A novel transposable element *Hemar 1* was identified and characterized in the genome of *Himasthla elongata* flatworm. This element is a member of *mariner* family; it belongs to *capitata* subfamily and highly homologues to turbellarian worm *Dugesia tigrina mariner* transposon. *Hemar 1* is a dispersed repeat and accounts for about 0.01 % of *H. elongata* genome. Identified element *Hemar 1* represents useful tool for investigation of functions of the mobile elements in *H. elongata* genome.

Key words: DNA transposons, *mariner*, flatworms, parasitology.