

РЕТРОТРАНСПОЗОН КЛАССА LINE ЯВЛЯЕТСЯ КОМПОНЕНТОМ ПАТТЕРНА ПОЛИМОРФНЫХ ФРАГМЕНТОВ ПАРТЕНИТ ТРЕМАТОДЫ *HIMASTHLA ELONGATA*

© А. И. Соловьева,^{1, 2} Н. К. Галактионов,¹ О. И. Подгорная^{1, 2}

¹Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета
и ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: orcinusa@gmail.com

Мы определили, что метод S-SAP (sequence specific amplification polymorphism) выявляет клональную изменчивость партеногенетических личинок червя *Himasthla elongata* (Trematoda, Echinostomatiidae), ранее считавшихся генетически однородными. Провели клонирование и секвенирование консервативного продукта длиной ~500 п. н. Клонированный фрагмент обозначили как В1 по зоне агарозного электрофореза, из которого он клонирован. Анализ последовательности В1 показал, что фрагмент имеет максимальное сходство с элементами класса LINE CR1-семейства воробья и гидры. Гибридизация *in situ* (FISH) выявляет диспергированное распределение В1. Остальные фрагменты, клонированные из той же зоны, соответствуют, как и В1, консервативной области обратной транскриптазы (RT) элементов семейства CR1. Таким образом, показано: 1) церкарии трематоды *H. elongata* обладают клональной изменчивостью; 2) метод S-SAP позволяет получить паттерн распределения фрагментов, характеризующий отдельных церкарий; 3) консервативный район RT вносит свой вклад в образование паттерна полиморфных фрагментов при выявлении клональной изменчивости партенит *H. elongata* методом S-SAP. В дальнейшей работе предполагается определить наличие транскриптов CR1 в церкариях *H. elongata* и определить состав переменных фрагментов паттерна клональной изменчивости.

Ключевые слова: LINE, CR1, S-SAP, клональная изменчивость, плоские черви.

Принятые сокращения: п. н. — пара нуклеотидов, AFLP — Amplified fragment length polymorphism, CR1 — chicken repeat 1, СТАВ — цетилтриметиламмоний бромистый, LINE — long interspersed nuclear elements.

Значительную часть генома высших эукариот составляют повторяющиеся последовательности ДНК (Manuelidis, 1990; Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Диспергированные повторы представлены в основном мобильными элементами генома — ДНК-транспозонами и ретротранспозонами (Caru et al., 1998; Lander et al., 2001). Ретротранспозоны перемещаются в геноме с помощью механизма «copy-and-paste» посредством обратной транскрипции через РНК-интермедиат. Изучение повторяющихся последовательностей важно не только для понимания организации генома, но и существенно для исследования путей эволюции живых организмов.

Автономные и неавтономные повторы ретропозонного типа занимают не менее 40 % эухроматина геномов мыши, крысы и человека. Наличие ретропозонов связывают с половым размножением, так как у имеющих только бесполое размножение животных они не обнаружены (Arkhipova, Meselson, 2000).

Как мобильные элементы ретропозоны имеют потенциальную возможность перемещаться в геноме, имея для этого ген, кодирующий обратную транскриптазу. Такие перемещения приводят к геномным перестройкам и могут модифицировать экспрессию генов. Перемещаясь в геноме, мобильные элементы могут становиться серьезным эволюционным фактором, приводящим к потере или

к приобретению функции. Однако большинство копий мобильных элементов несут различного рода мутации (нуклеотидные замены, делеции, дубликации), приводящие к потере способности перемещаться. К сожалению, природа и функции транспозонов изучены совершенно недостаточно, если учесть их количество в геноме. Для изучения функций ретропозонов необходим подходящий объект.

В настоящей работе исследование выполняли на представителе класса *Trematoda* — одной из наиболее успешных и широко распространенных групп паразитических червей. Особый интерес к трематодам обусловлен тем, что многие их виды являются причиной тяжелых заболеваний человека и животных. Так, вызываемый представителями рода *Schistosoma* шистосоматоз классифицируется как одно из наиболее серьезных паразитарных заболеваний, от которого в мире страдает более 200 млн человек (Botros et al., 2004). Трематоды имеют сложный жизненный цикл, который протекает со сменой животных-хозяев и чередованием партеногенетических и гермафродитного поколений. Долгое время считалось, что особи партеногенетического поколения — редии или дочерние спороцисты, происходящие от одной материнской особи и обитающие в первом промежуточном хозяине (моллюске), равно как и производимые ими расселитель-

ные личинки — церкарии, представляют собой генетически идентичные клоны. Однако в последнее время появились данные (Greveling, 1999; Халтурин и др., 2000; Семенова и др., 2005), полученные с использованием маркеров ДНК, которые указывают на существование индивидуальной изменчивости клонов дочерних спороцист и их производных — церкарий. Это увеличивает генетическую вариабельность паразитов и, соответственно, шанс на успешную инвазию хозяина. С другой стороны, высокая генетическая вариабельность затрудняет разработку медикаментозных препаратов против патогенных видов трематод, но делает изучение механизма их генетической изменчивости весьма актуальным.

Недавние исследования сателлитного повтора в геномах партеногенетических поколений *Schistosoma mansoni* выявили неоднородность его распределения в дочерних особях партенит. При этом использовали праймеры на основе сателлитной ДНК — элемента W1 (Greveling, 1999). Клональная изменчивость метацеркарий рода *Micropophallus* (Халтурин и др., 2000) и церкарий шистосоматид рода *Trichobilharzia* (Семенова и др., 2005) показана с помощью метода RAPD (random amplified polymorphic DNA), широко применяемого при изучении внутривидовой изменчивости. В основе метода лежат полимеразная цепная реакция (ПЦР) и использование универсальных коротких праймеров, которые случайно отжигаются на ДНК и обеспечивают амплификацию набора фрагментов разной длины.

Полиморфизм сиквенса-специфичных амплифицированных фрагментов, или S-SAP (sequence specific amplification polymorphism), — это метод, базирующийся на ПЦР, который используется для поиска генетического полиморфизма зукариот, связанного, как полагают, с сайтами инсерций транспозонов (Waugh et al., 1997). Фактически он является модификацией метода AFLP (amplified fragment length polymorphism), используемого для получения «отпечатков пальцев» ДНК, т. е. полиморфизма амплифицированных рестрикционных фрагментов (Vos et al., 1995). Главное отличие S-SAP заключается в выборе фермента рестрикции, который должен иметь сайт узнавания в консервативной последовательности мобильного элемента. Метод относительно прост и позволяет генерировать большое количество фланкированных транспозонами полиморфных маркеров (Behura, 2006). S-SAP

позволил обнаруживать внутри- и межпопуляционный полиморфизм у насекомых (Behura et al., 2001).

Информации об использовании этого метода для поиска полиморфизма на уровне клональных популяций трематод не найдено. Геном *Himasthla elongata* (Mehlis, 1831) (Trematoda; Echinostomatidae) неизвестен. Из повторяющихся элементов клонирована только часть ДНК-транспозона *mariner* — *Nemar1* (Галактионов и др., 2009). Поэтому в качестве базовой рестриктазы для S-SAP выбрали *HindIII*, которая имеет один сайт узнавания внутри последовательности транспозона *Nemar1*, предположив, что сайты расщепления есть и в других мобильных элементах.

Задача настоящей работы состояла в том, чтобы определить, какие последовательности являются источником клональной изменчивости при ее выявлении методом S-SAP. Мы клонировали одну из консервативных зон, проанализировали ее последовательность и определили положение в геноме. Оказалось, что клонированный фрагмент представляет собой часть домена обратной транскриптазы LINE-подобного ретротранспозона CR1.

Материал и методика

Сбор животных и выделение ДНК. Сбор и первичную обработку материала проводили на Беломорской биологической станции Зоологического института РАН «Картеш» в июле и августе 2011 г. Источником ДНК паразитов служили церкарии *Himasthla elongata* (Mehlis, 1831) (Trematoda; Echinostomatidae). Для их получения собранных на литорали моллюсков *L. Littorea* (Gastropoda, Prosobranchia) рассаживали поодиночке в небольшие емкости (50 мл) с морской водой и выдерживали 1—2 ч при дневном освещении. Под бинокулярной лупой МБС-10 выявляли особей, населенных искомым видом паразитов. ДНК *H. elongata* выделяли с помощью детергента СТАВ (Winnepenninckx et al., 1993) из отдельных церкарий, полученных непосредственно из редиц путем препарирования. Образцы для S-SAP пронумерованы согласно схеме на рис. 1.

Порядок проведения S-SAP показан на рис. 2. За основу взято опубликованное описание метода (Vos et al., 1995; Drew, Brindley, 1997; Waugh et al., 1997). Ге-

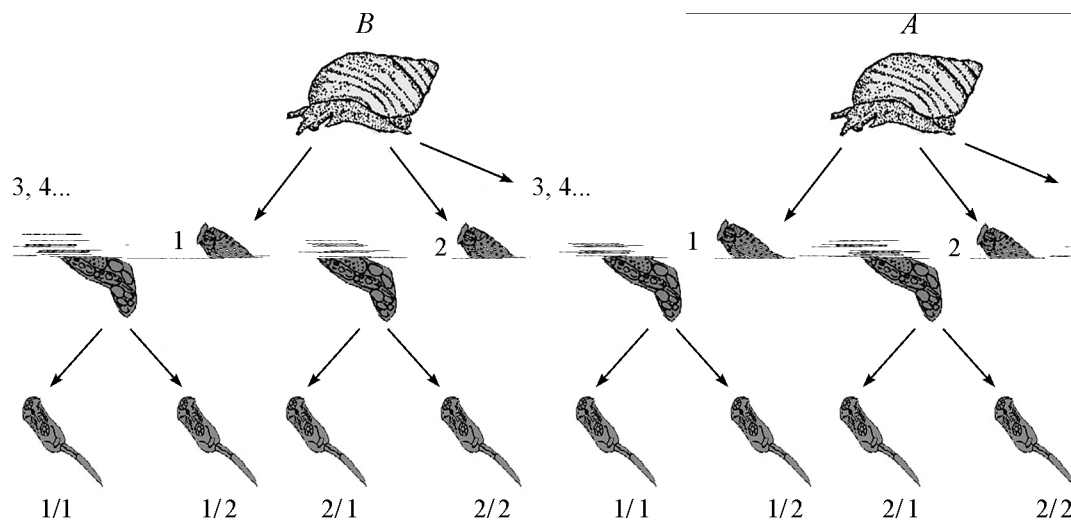


Рис. 1. Правила нумерации церкарий (на примере клональных популяций А и В).

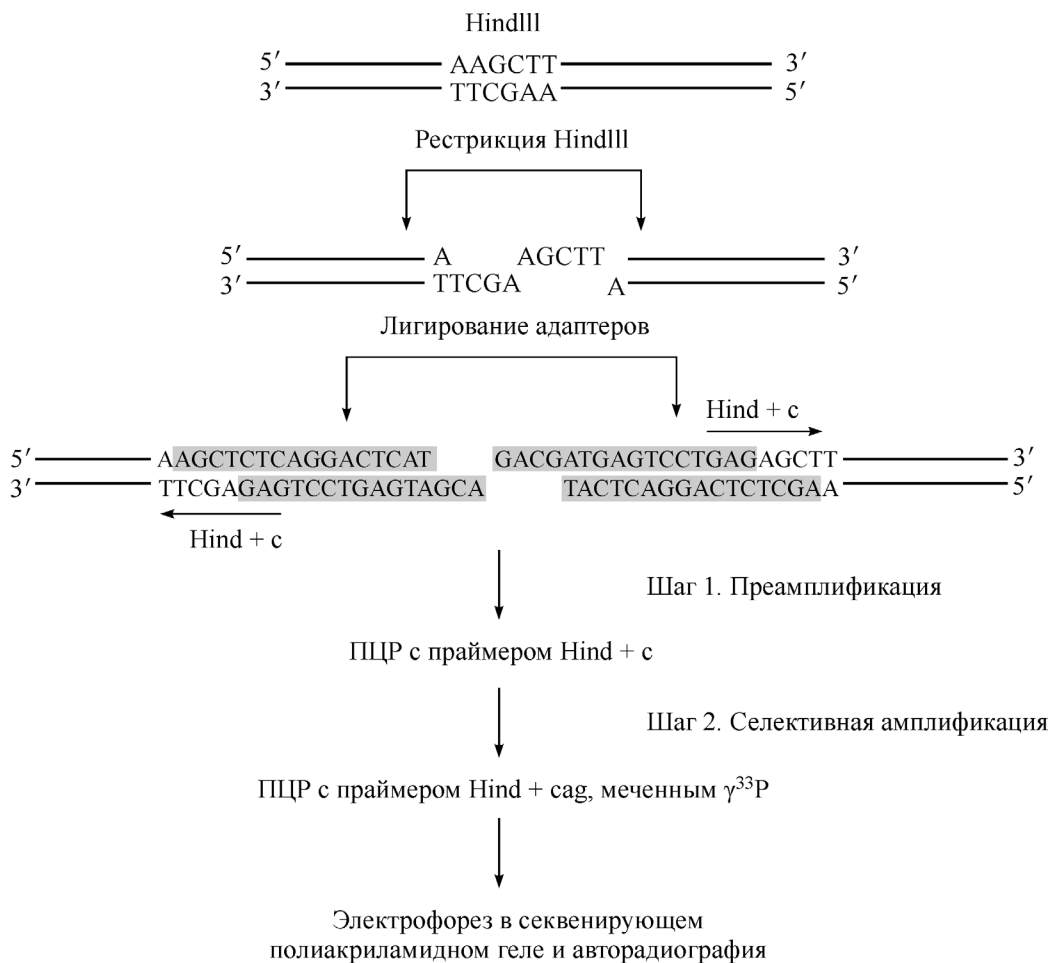


Рис. 2. Схема применения метода S-SAP.

номную ДНК церкарий обрабатывали рестриктазой *HindIII* (СибЭнзим, Россия) в течение 1 ч при 37 °C в буфере W (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl и 1 mM DTT) в объеме 20 мкл. Контролем служила ДНК, которую инкубировали в тех же условиях, что и опытную, но без добавления рестриктазы. По сайтам рестрикции лигировали предварительно отоженные друг на друга олигонуклеотидные адаптеры (5'-AGCTTCTCAGGACTCAT-3' и 5'-CTGCTATCAGGACTC-3') в количестве 5 пмоль/мкл с помощью T4 ДНК-лигазы (10 ед. на реакцию; СибЭнзим) в рабочем буфере (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT и 1 mM ATP) в течение 1 ч при 37 °C. Адаптеры необходимы для повышения специфичности отжига праймеров. После инкубации лигазную смесь осаждали 96%-ным этанолом, осадок растворяли в 5 мкл деионизованной воды для использования в ПЦР.

В 20 мкл реакционной смеси для преамплификации каждой пробы содержалось: 1 мкл продуктов лигирования, 10 пмоль/мкл праймера HindIII+c (5'-GAGTCCTGAGAGCTT-3'), 2 мкл буфера для Taq-полимеразы, 2 mM MgCl₂, 1.6 мкл смеси dNTP (2.5 mM каждого нуклеотида) и 1 ед. Taq-полимеразы (СибЭнзим). Преамплификацию проводили в термоциклере Mastercycler personal 5332 erpendorf в течение 25 циклов по следующей программе: денатурация 45 с при 95 °C, отжиг 45 с при 53 °C, синтез 1 мин при 72 °C. В качестве отрицательного контроля ПЦР использовали реакционную смесь без добавления матрицы.

Селективную амплификацию проводили по программе «touch-down PCR»: 11 циклов — денатурация 45 с при 95 °C, отжиг 45 с при 62 °C с понижением температуры до 53 °C, синтез 1 мин при 72 °C и 15 циклов — денатурация 45 с при 95 °C, отжиг 45 с при 53 °C, синтез 1 мин при 72 °C. Реакционная смесь для каждой пробы содержала: 1 мкл разведенных в 50 раз деионизованной водой продуктов преамплификации, 10 пмоль меченного с 5'-конца $\gamma^{33}\text{P}$ (ОАО «ИРМ») по протоколу «Силекс-М» праймера HindIII+cag (5'-GAGTCCTGAGAGCTT-3'), 2 мкл буфера для Taq-полимеразы, 2 mM MgCl₂, 1.6 мкл смеси dNTP (2.5 mM каждого нуклеотида) и 1 ед. Taq-полимеразы (СибЭнзим).

Электрофорез в секвенирующем акриламидном геле и в агарозном геле. Для разделения продуктов ПЦР S-SAP использовали 5%-ный денатурирующий секвенирующий гель. Электрофорез проводили в течение 3 ч с напряжением 10 В/см, по завершении электрофореза гель высушивали и экспонировали 7 сут при -80 °C (Sambrook et al., 1989). Агарозный электрофорез для клонирования и проверки рестрикции проводили в 1%-ном агарозном геле в 1-кратном буфере TAE, pH 7.6 (Sambrook et al., 1989).

Клонирование консервативных фрагментов. Фрагменты B1, A1 и A1' продуктов первого шага S-SAP вырезали из геля после разделения методом агарозного электрофореза, реамплифицировали с праймером Hind+c (рис. 2, шаг 1) и клонировали в вектор pTZ57r/t

(Termofisher scientific) по стандартному протоколу (Sambrook et al., 1989). Фрагмент С вырезали из сухого геля после полного S-SAP по экспонированной пленке (рис. 3), реамплифицировали в соответствующих условиях праймером HindIII+cag в течение 25 циклов при температуре отжига 53 °С и также клонировали в вектор pTZ57r/t (Termofisher scientific) по стандартному протоколу. Вставки плазмид, получившихся при клонировании, амплифицировали и отправляли на секвенирование в фирму Синтол (Москва).

Рестрикционный анализ. Реамплифицированные фрагменты С и В1 обрабатывали рестриктазой *MspI* (СибЭнзим) в течение 2 ч при 37 °С в буфере В (10 мМ Tris-HCl, 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ DTT) в объеме 20 мкл. Контролем служил ПЦР-продукт, который инкубировали в тех же условиях, что и опытные фрагменты, но без добавления рестриктазы.

Получение метафазных хромосом *Himasthla elongata*. Условия для получения метафазных хромосом, пригодных для FISH, подбирали с учетом существующих в литературе данных (Richard, Voltz, 1987; Birstein, Mikhailova, 1989; Mutafova et al., 1991; Mutafova, 1994; Hirai, Hirai, 2004). Источником метафазных хромосом служили редии *H. elongata*, выделенные из зараженных моллюсков *L. littorea*. Изолированных из улиток партенит отмывали от тканей хозяина в 3 сменах морской воды, фильтрованной через фильтр Millipore 0.22 мкм. Отмытых редий переносили в чашки Петри с питательной средой Leibovitz L-15 (Sigma, США), содержащей 0.01 мг/мл гентамицина и 0.1 % колхицина (Пан-Эко, Россия), и инкубировали 4 ч при комнатной температуре. Затем обрабатывали гипотоническим раствором 5 мМ KCl в течение 40 мин, после чего фиксировали животных модифицированным раствором Карнуа (смесью метанола с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3 : 1). После фиксации редий измельчали путем многократного пропускания через шприц с иглой 22G, а полученную суспензию клеток переносили в пробирку и оставляли на 3—5 мин для осаждения крупных фрагментов. Верхнюю фазу отбирали и трижды центрифугировали при 2.5 тыс. об/мин в течение 10 мин, заменяя фиксатор после каждого осаждения. Для достижения лучшего качества метафазных пластинок предметные стекла перед приготовлением препаратов помещали во влажную камеру.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Для гибридизации *in situ* вставку pB1 метили флуоресцентным Cy3-dUTP с помощью ПЦР в соответствующих условиях. Гибридизацию проводили по стандартному протоколу Rouche (nonradioactive *in situ* hybridization application manual), ядра и хромосомы контрастировали красителем DAPI и анализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа DM13000B Leica Microsystems GmbH в Центре коллективного пользования «Хромас». Для компьютерной обработки изображений использовали пакет программ Adobe Photoshop™ 4.0.

Компьютерный анализ. Поиск рестриктазы для моделирования рестрикции фрагментов вставки pB1 и С проводили с помощью онлайн-ресурса Nebcutter v 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>; Vincze et al., 2003). Анализ параметров последовательностей адаптеров и праймеров осуществляли с использованием программы FastPCR 6.1 (Kalendar et al., 2009). Для сравнения фрагментов ДНК использовали программы BLAST (Altschul

et al., 1990) и CENSOR (Kohany et al., 2006). Трансляцию нуклеотидной последовательности В1 проводили с помощью программы BioEdit (Hall, 1999).

Результаты

Протекающая внутри моллюска фаза жизненного цикла *H. elongata* начинается с поражения улитки мирацидием. Мирацидий превращается в материнскую спороцисту, которая дает начало последующим поколениям редий (или дочерних спороцист), продуцирующим расселительных личинок — церкарий. Стоит подчеркнуть, что материнская спороциста, редии (или дочерние спороцисты) и церкарии всех поколений являются продуктами диплоидного партеногенеза (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). Таким образом, все редии и церкарии внутри моллюска-хозяина, инфицированного одним мирацидием, по-видимому, должны иметь одинаковый генотип.

На рис. 3 представлены результаты генотипирования редии и 15 церкарий из клональных популяций А—С. Видно, что присутствуют как консервативные, так и полиморфные фрагменты. Области максимального полиморфизма показаны на рис. 3 (вертикальные отрезки справа). Таким образом, S-SAP выявляет клональную изменчивость в партеногенетической стадии *H. elongata*. Для клонирования выбрали консервативный участок размером около 500 п. н., названный С (стрелка на рис. 3, церкария 2/1 в популяции С). Выбранный фрагмент вырезан из высушенного акриламидного геля и реамплифицирован.

Реамплификация фрагмента из высушенного геля является рискованной процедурой, с помощью которой не всегда удается получить достаточное для клонирования количество материала. С другой стороны, известно, что даже S-SAP, выполненный в один шаг (рис. 2), дает возможность выявить наиболее консервативные зоны (Galaktionov et al., 2013). Поэтому для клонирования провели S-SAP с выявлением зон с помощью агарозного электрофореза (рис. 4).

Видно, что общая картина зон (паттерн) на дорожках А и В сходна, но отличается от таковой на дорожке С. В этом случае церкарии выделены из разных моллюсков и не являются клонами. Консервативная зона длиной ~500 п. н. видна во всех случаях. Она вырезана из геля и прошла стандартную процедуру клонирования с анализом вставок ПЦР (Sambrook et al., 1989). Плазмиду с первым секвенированным фрагментом из набора плазмид, полученных при клонировании зоны В, обозначили pB1. Последовательность вставки В1 приведена на рис. 5.

Секвенированный фрагмент В1 длиной 542 п. н. содержит открытую рамку считывания (open reading frame, ORF) длиной 109 аминокислотных остатков со множественными стоп-кодонами. Анализ последовательности фрагмента с помощью программ BLAST и CENSOR показал, что полученный участок соответствует фрагменту обратной транскриптазы ретротранспозона семейства CR1 из класса non-LTR ретроэлементов (LINE-like: L-1) и имеет максимальное сходство с обратной транскриптазой элемента CR1-X1_Pass (Smit, 2009) и CR1-22_HM (Bao, Jurka, 2008), принадлежащих к семейству CR1 из класса non-LTR ретроэлементов. Первый представитель семейства CR1 (chicken repeat1) был обнаружен в геноме курицы (Silva et al., 1989). Консенсусная последовательность элемента имеет длину около 4500 п. н. и содержит две от-

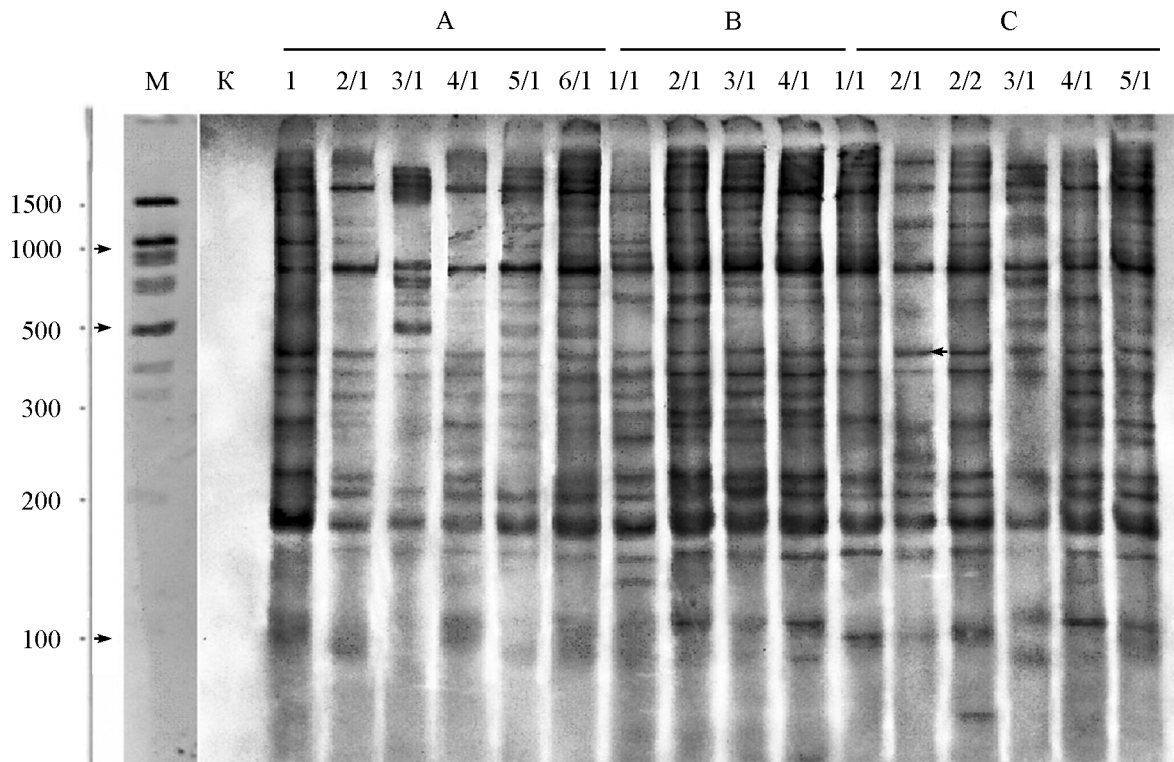


Рис. 3. Авторадиограмма результатов S-SAP, проведенного с редией (1) и церкариями (1/1, 2/1 и т. д.) из клональных популяций А—С.

Вертикальные отрезки справа — области наиболее переменных фрагментов; головкой стрелки обозначен выбранный для клонирования фрагмент С (популяция С, церкария 2/1). М — маркер молекулярной массы, К — контроль ПЦР.

крытые рамки считывания, кодирующие обратную транскриптазу и ДНК-связывающий белок (Haas et al., 1997).

Последовательность фрагмента дает возможность провести теоретическое предсказание рестрикции. С помощью программы Ncb cutter v2.0 подобрали рестриктазу (*MspI*), подходящую для анализа последовательностей В1 (рис. 6, I). *MspI* имеет один сайт узнавания в последовательности клонированного элемента и расщепляет его на 2 хорошо разделимых в агарозном геле фрагмента размерами 189 и 353 п. н. Реамплифицированный фрагмент С и

вставку плазмиды рВ1 обрабатывали *MspI* (рис. 6, II). Видно, что картина рестрикции фрагмента В1 полностью совпадает с предсказанной, а фрагмента С — частично. Следовательно, зоны С и В содержат одинаковые фрагменты, но в зоне С присутствуют и другие, отличные от В1, фрагменты.

Распределение в геноме *H. elongata* проверили флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH; рис. 7). Размеры ядер и хромосом трематоды соответствуют таковым для высших эукариот (Kuznetsova et al., 2006).

Сигнал В1 распределен по ядру дисперсно (рис. 7, а), что характерно для представителей класса non-LTR элементов и соответствует данным литературы (Staginnus et al., 2010). На хромосомах сигнал также распределен дисперсно, с концентрированием в некоторых районах, но без формирования больших кластеров (рис. 7, б). На хромосомах мыши и человека LINE располагаются в обедненных генами районах интеркалирующего гетерохроматина (Solovei et al., 2009). Возможно, фрагмент В1 также тяготеет к таким районам. Однако для проверки этого предположения нужна дифференцированная окраска хромосом, выявляющая хромосомные бэнды. Точные результаты кариотипирования дадут возможность точнее локализовать В1 по отношению к хромосомным бэндам.

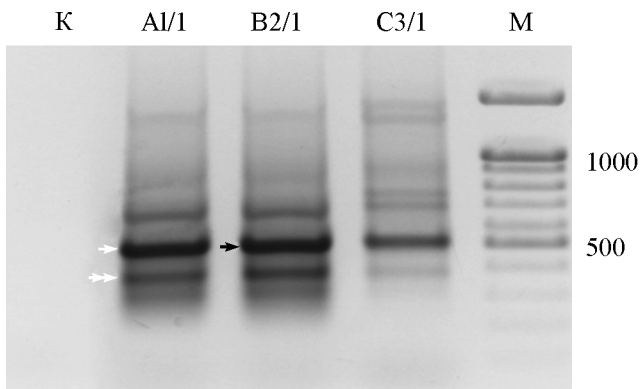


Рис. 4. Электрофореграмма результатов S-SAP, проведенного с геномной ДНК церкарий из клональных популяций А—С.

Стрелками обозначены выбранные для клонирования зоны; черная — фрагмент В1 (популяция В, церкария 2/1), белая — фрагмент А1 (популяция А, церкария 1/1), двойная белая — фрагмент А1' (популяция А, церкария 1/1).

Обсуждение

Описано много приемов изучения генетического разнообразия, и некоторые из них основаны на использовании мобильных элементов ДНК. Одним из таких методов служит S-SAP, который используют для поиска генетиче-

2	GCG ATG CTC TAG ATT <u>GAG TCC TGA GAG CTT</u> CGA GGG AAC GGA TGT	46
1	Arg Gly Asn Gly Cys	15
47	GTA TAA GCT GCT AAA GTC GTT GAA TCC CTA CAG TTC CTT GGG ACC	91
16	Val End Ala Ala Lys Val Val Glu Ser Leu Gln Phe Leu Gly Thr	30
92	CGA CAA GTT CCA TCC GCG CAT CCT CAA GGA AGC AGC GAC TAG CTT	136
31	Arg Gln Val Pro Ser Ala His Pro Gln Gly Ser Ser Asp End Leu	45
137	AGC AGG TCC ACT TTG CAG CGT TTT CCA CGC GTC CCT TAG TCA AGG	181
46	Ser Arg Ser Thr Leu Gln Arg Phe Pro Arg Val Pro End Ser Arg	60
182	TAT CCT ACC GGA TAT <u>ATG GAA AGA GGC GGT GGT GAC CCC AAT CTT</u>	226
61	Tyr Pro Thr Gly Tyr <u>Met Glu Arg Gly Gly Gly Asp Pro Asn Leu</u>	75
227	<u>CAA AAC TGG GGA TCG TCA CGA CCC TAA GAG TTA CCG CCC GAT CAG</u>	271
76	<u>Gln Asn Trp Gly Ser Ser Arg Pro End Glu Leu Pro Pro Asp Gln</u>	90
272	<u>CCT TAC TAG TAT ACC CTG CAA AAT ACT GGA AAG GTT GAT AAA ACG</u>	316
91	<u>Pro Tyr End Tyr Thr Leu Gln Asn Thr Gly Lys Val Asp Lys Thr</u>	105
317	<u>TAG GAT CAT GGC TCA CTT ACT AAG CGA TAA GCT AAT CTC CCA AGC</u>	361
106	<u>End Asp His Gly Ser Leu Thr Lys Arg End Ala Asn Leu Pro Ser</u>	120
362	<u>CCA GTA TGG TTT TCT CCC TGG TAA GTC CTG TGT TAG CAA TTT ACT</u>	406
121	<u>Pro Val Trp Phe Ser Pro Trp End Val Leu Cys End Gln Phe Thr</u>	135
407	<u>GAT CCT GAT GGA TAA TCT AAC ACA GGC AAG GGA CGA TGG GCT TAT</u>	451
136	<u>Asp Pro Asp Gly End Ser Asn Thr Gly Lys Gly Arg Trp Ala Tyr</u>	150
452	<u>AAC AGA TGC AAT TTT CTT TGA CTT CGC GAA AGC CTT CGA CAA AGT</u>	496
151	<u>Asn Arg Cys Asn Phe Leu End Leu Arg Glu Ser Leu Arg Gln Ser</u>	165
497	<u>GCC ACA CCG TCC ACT TCT TCA AAA AGT GGA AGC TCT CAG GAC TCA</u>	541
166	<u>Ala Thr Pro Ser Thr Ser Ser Lys Ser Gly</u>	

Рис. 5. Нуклеотидная последовательность (верхняя строка) и построенная по ней аминокислотная последовательность (нижняя строка) вставки плазмиды pB1.

Серым цветом выделен участок обратной транскриптазы, жирным шрифтом с подчеркиванием выделены стоп-кодоны, двойным подчеркиванием — последовательности адаптеров.

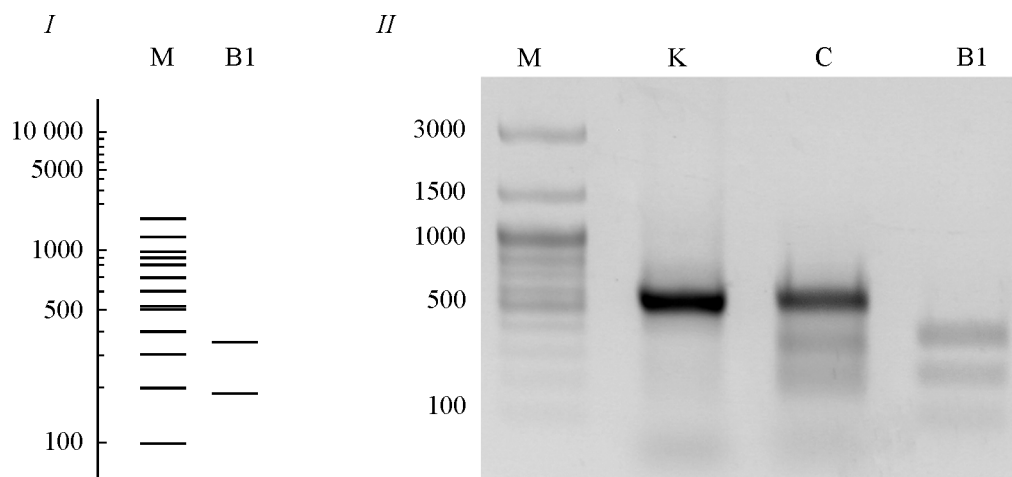


Рис. 6. Рестрикция фрагментов C и B1 рестриктазой *MspI*.

I — моделирование рестрикции в программе Ncb cutter v 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>, Vincze et al., 2003). II — электрофореграмма экспериментальной рестрикции. M — маркер молекулярной массы (п. н.), K — контроль рестрикции.

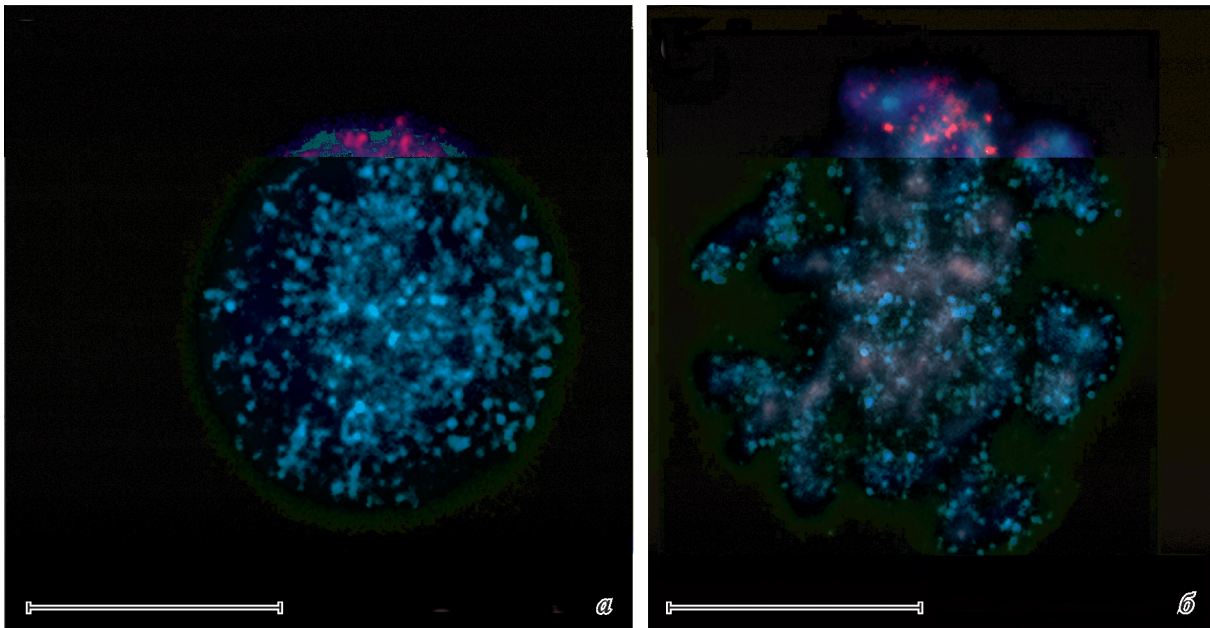


Рис. 7. Флуоресцентная *in situ* гибридизация пробы В1 на ядро (а) и хромосомы (б) *Himasthla elongata*. В1 — красный, ядро и хромосомы окрашены DAPI (синий). Масштабные отрезки — 10 мкм.

ского полиморфизма эукариот, опосредованного инсерциями транспозонов (Waugh et al., 1997).

Фактически S-SAP является модификацией метода AFLP, используемого для получения «отпечатков пальцев» ДНК или амплифицированных рестрикционных фрагментов (Vos et al., 1995). Большинство методов на основе ПЦР для выявления полиморфизма базируется на известной клонированной последовательности того или иного транспозона (Queen et al., 2004; Zampicini et al., 2004). Проверка того, что наблюдаемые полиморфные фрагменты действительно содержат в своем составе тот транспозон, который послужил основой для выбора рестриктазы и конструирования праймеров, обычно считается избыточной. Поэтому, несмотря на безусловную пользу основанных на ПЦР методов для выявления полиморфизма, остается неясным, чем же вызван полиморфизм и какие именно последовательности полиморфны.

В настоящей работе основой для выбора рестриктазы и праймеров послужила частичная клонированная последовательность ДНК-транспозона *Nemar1* — *mariner H. elongata* (Галактионов и др., 2009). Действительно, по-

лиморфные фрагменты, полученные с применением рестриктазы *HindIII*, выявляют картину клональной изменчивости в партеногенетическом поколении трематоды (рис. 3). Однако без клонирования и секвенирования фрагментов нельзя утверждать, что только исходный *Nemar1* является источником полиморфизма. Задача настоящей работы состояла в определении природы консервативных фрагментов полиморфного паттерна.

Оказалось, что все фрагменты, клонированные из консервативных зон агарозного электрофореза, картируются в консервативном районе обратной транскриптазы элемента CR1 (рис. 8). Элемент CR1 принадлежит к семейству автономных, не содержащих LTR (long terminal repeat) ретропозонов, которое представлено длинными диспергированными повторами (LINE-like, L1) у млекопитающих (Stocking, Kozak, 2008). Консенсусная последовательность CR1 (рис. 8) существенно короче L1 за счет различий в основном белков ORF1. Однако основной классификационный признак — наличие двух ORF — присутствует и дает возможность отнести CR1 к классу LINE. Как правило, обе ORF несут делеции, мута-

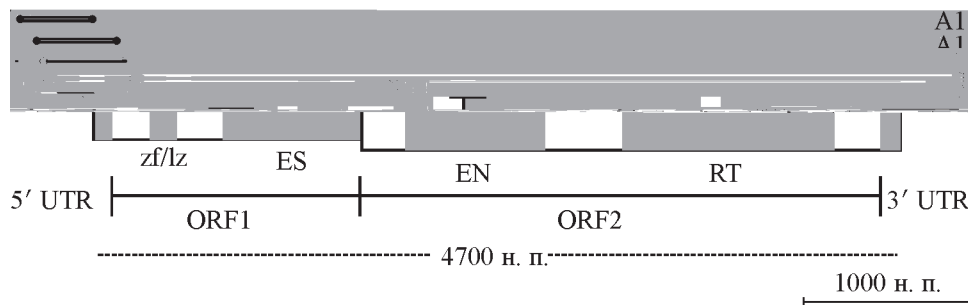


Рис. 8. Схема организации элемента CR1 и положение всех секвенированных фрагментов.

Показаны размер элемента, 5' и 3' нетранслируемые районы (UTR), 2 открытые рамки считывания (ORF). Внутри ORF показаны: домен *zf/lz* «цинковые пальцы» и «лейциновая молния», ES — эстеразы, EN — эндонуклеазы, RT — обратная транскриптаза. Над доменом RT отмечены положения всех секвенированных фрагментов из клонок соответствующих зон агарозного электрофореза, звездочкой отмечен фрагмент В1 (см. рис. 4). Построено по: Laha et al., 2005, с изменениями.

ции и стоп-кодона, которые запрещают транскрипцию и трансляцию с большинства копий. Подавляющее большинство CR1 одного генома не является полноразмерным, а «обрезано» с одного или обоих концов (truncated). Первая ORF кодирует ДНК-связывающий белок; вторая ORF кроме эндонуклеазного домена несет домен обратной транскриптазы (RT), который распознаваем у всех длинных ретропозонов — как LTR-содержащих, так и не содержащих. Именно эта область RT и попадает в наиболее консервативные из набора полиморфных фрагментов (рис. 3, 4).

CR1-подобный элемент клонирован из генома плоского червя шистосомы и назван SR1 (Drew, Brindley, 1997). Длина первоначально клонированного SR1 — 2.3 тыс. п. н., еще ~1 тыс. п. н. предсказана как конец ORF2, т. е. этот элемент «обрезан». Обычная для LINE неполнота последовательности (Burch et al., 1993; Giordano et al., 2007) затрудняет определение количества копий в геноме, так как полученные данные варьируют в зависимости от длины фрагмента, который используют в качестве пробы. Так, геном цыпленка содержит ~1000 копий CR1, если использована проба длиной 0.8 тыс. п. н. с 3'-конца, и только 30 копий длиной 2.2 тыс. п. н. Такая же ситуация и для SR1: в геноме шистосомы находят ~200 копий длиной 1.1 тыс. п. н. с 3'-конца и только 20 копий при пробе длиной 2.2 тыс. п. н. (Drew, Brindley, 1997). Однако несмотря на несовершенство копий SR1, гомологи семейства присутствуют во всех классах позвоночных и многих беспозвоночных (Drew, Brindley, 1997). Если CR1 и SR1 произошли от CR1-подобного элемента общего предшественника плоских червей и позвоночных, то элемент наследовался вертикально и, следовательно, консервативный район RT находился под сильным селективным давлением. Такое давление оправданно только при чрезвычайной важности домена, возможно, для процесса обратной транскрипции при перемещении. Именно в этот район попадают все клонированные из стабильных зон варибельного паттерна фрагменты (рис. 8).

Консервативный домен обратной транскриптазы (RT) высоко гомологичен не только у геномов филогенетически удаленных животных, но и у разных классов транспозонов (Xiong, Eickbush, 1990; Stocking, Kozak, 2008). Два обстоятельства (неполнота фрагмента и консервативность RT) затрудняют оценку количества копий фрагмента B1 в геноме *H. elongata*. Проведенная гибридизация in situ (рис. 7), безусловно, подтверждает диспергированный характер распределения B1, однако его количество может быть завышено (как артефакт) из-за гибридизации с RT- ретропозонов других классов.

В дальнейшем мы предполагаем проверить наличие транскриптов полноразмерного CR1-подобного элемента в транскриптоме церкарий *H. elongata*. При проверке наличия транскрипции, вероятно, удастся клонировать более протяженные фрагменты элемента. Они и послужат для уточнения количества копий в геноме как более достоверные. Мы также клонируем фрагменты из наиболее варибельных областей паттерна (рис. 3, вертикальные отрезки справа), для того чтобы определить природу этих последовательностей.

Настоящая работа показала, что элементы класса LINE и конкретный консервативный район RT вносят свой вклад в образование паттерна полиморфных фрагментов при выявлении клональной изменчивости партенит *H. elongata* методом S-SAP.

Авторы выражают благодарность персоналу ББС ЗИН РАН «Картеш» за возможность проведения полевых работ, Центру коллективного пользования «Хромас» за предоставленное оборудование, а также С. Ю. Демину (ИНЦ РАН) за помощь в проведении гибридизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (проект 01200955639) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01739а).

Список литературы

- Галактионов Н. К., Подгорная О. И., Федоров А. В. 2009. Характеристика транспозона mariner из генома паразитического плоского червя *Himasthla elongata*. Цитология. 51 (11): 924—928.
- Семенова С. К., Хрисанфова Г. Г., Филлипова Е. К., Бээр С. А., Воронин М. В., Рысков А. П. 2005. Индивидуальная и популяционная изменчивость церкарий шистосоматид группы *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda, Schistosomatidae), выявляемая с помощью полимеразной цепной реакции. Генетика 41 (1): 17—22.
- Халтурин К. В., Михайлова Н. И., Гранович А. И. 2000. Генетическая неоднородность природных популяций партенит *Microphallus piriformes* и *M. pygmaeus* (Trematoda: Microphallidae). Паразитология. 34 (6): 486—500.
- 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. PNAS. 97: 14 473—14 477.
- Bao W., Jurka J. 2008. CR1 families from *Hydra magnipapillata*. Rebase Reports. 8: 1850.
- Behura S., Nair S., Mohan M. 2001. Polymorphisms flanking the mariner integration sites in the rice gall midge (*Orseolia oryzae* Wood—Mason) genome are biotype-specific. Genome. 44: 947—954.
- Behura S., 2006 Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. Mol. Ecol. 15: 3087—3113.
- Birstein V. J., Mikhailova N. A. 1990. On the karyology of trematodes of the genus *Microphallus* and their intermediate gastropod host, *Littorina saxatilis* I. Chromosome analysis of three *Microphallus* species. Genetica. 80: 159—165.
- Botros S., William S., Ebeid F., Cioli D., Katz N., Day T., Bennett J. 2004. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrth in experimental animals. Amer. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 119—123.
- Capy P. 1998. Evolutionary biology. A plastic genome. Nature. 396: 522—523.
- Drew A. C., Brindley P. J. 1997. A retrotransposon of the non-long terminal repeat class from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. Similarities to the chicken-repeat-1-like elements of vertebrates. Mol. Biol. Evol. 14: 602—610.
- Galaktionov K. V., Dobrovolskiy A. A. 2003. The biology and evolution of trematodes. An essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes. The Netherlands. Kluwer Acad. Publ. 592 p.
- Galaktionov N. K., Fedorov A. V., Galaktionov K. V., Podgorная О. И. 2013. Analysis of inter- and intracolonial genomic diversity of *Himasthla elongata* (Trematoda; Echinostomatidae) cercariae by AFLP. Parasit. Res. (In press).
- Giordano J., Ge Y., Gelfand Y., Abrusan G., Benson G., Warburton P. E. 2007. Evolutionary history of mammalian transposons determined by genome-wide defragmentation. PLoS Comput. Biol. 3: e137.
- Greveling C. 1999. Genomic instability in *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 101: 207—216.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 41: 95—98.

- Hass N. B., Grabowski J. M., Silvit A. B., Burch J. B. 1997. Chicken repeat 1 (CR1) elements, which define an ancient family of vertebrate non-LTR retrotransposons, contain two closely spaced open reading frames. *Gene*. 197 : 305—309.
- Hirai H., Hirai Y. 2004. FISH mapping for helminth genomes. *Methods Mol. Biol.* 270 : 379—394.
- Kalendar R., Lee D., Schulman A. 2009. FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*. 3 : 1—14.
- Kohany O., Gentles A. J., Hankus L., Jurka J. 2006. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics*. 7 : 474.
- Kuznetsova I. S., Voronin A. P., Podgornaya O. I. 2006. Telomere and trf2/mtbp localization in respect to satellite dna during the cell cycle of mouse cell line 1929. *Rejuvenation Res.* 9 : 391—401.
- Laha T., Kewgrai N., Loukas A., Brindley J. P. 2005. Characterization of SR3 reveals abundance of non-LTR retrotransposons of the RTE clade in the genome of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics*. 6 : 154.
- Lander E., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409 : 860—921.
- Manuelidis L. 1990. A view of interphase chromosomes. *Science*. 250 : 1533—1540.
- Mutafova T. 1994. Karyological studies on some species of the families Echinostomatidae and Plagiorchiidae and aspects of chromosome evolution in trematodes. *Systematic Parasitol.* 28 : 229—238.
- Mutafova T., Kanev I., Eizenhut U. 1991. Karyological studies of *Isthmiophora melis* (Schrank, 1788) from its type locality. *J. Helminthol.* 65 : 255—258.
- Queen R. A., Gribbon B. M. C. James P., Jack A., Flavell J. 2004. Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Mol. Gen. Genomics*. 271 : 91—97.
- Richard J., Voltz A. 1987. Preliminary data on the chromosomes of *Echinostoma caproni* Richard, 1964 (Trematoda: Echinostomatidae). *Systematic Parasitol.* 9 : 169—172.
- Sambrook J., Fritsch E., Manniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2100 p.
- Silva R., Burch J. B. E. 1989. Evidence that chicken CR1 elements represent a novel family of retrotransposons. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 3563—3566.
- Solovei I., Kreysing M., Lanctot C., Kösem S., Peichl L., Cremer T., Guck J., Joffe B. 2009. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell*. 137 : 356—368.
- Smit A. F. 2009. CR1-X1 Pass — CR1 Non-LTR Retrotransposon from Passeriformes. *Repbases Rep.* 9 : 50.
- Staginnus C., Desel C., Schmidt T., Kahl G. 2010. Assembling a puzzle of dispersed retrotransposable sequences in the genome of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome*. 53 : 1090—1102.
- Stocking C., Kozak C. A. 2008. Murine endogenous retroviruses. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 : 3383—3398a.
- 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.
- Vincze T., Posfai J., Roberts R. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* 31 : 3688—3691.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijers M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23 : 4407—4414.
- Waugh R., McLean K., Flavell A. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol. General Genet.* 253 : 687—694.
- Winnepenninckx B., Backeljau T., De Wachter R. 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet.* 9 : 407.
- Xiong Y., Eickbush T. H. 1990. Origin and evolution of retroelements based on their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 9 : 3353—3362.
- Zampicini G., Blinov A., Cervella P., Guryev V., Sella G. 2004. Insertional polymorphism of a non-LTR mobile element (NLRCh1) in European populations of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) as detected by transposon insertion display. *Genome*. 47 : 1154—1163.

Поступила 10 IV 2013

LINE CLASS RETROPOSON IS THE COMPONENT OF THE DNA POLYMORPHIC FRAGMENTS PATTERN OF TREMATODE *HIMASTHLA ELONGATA* PARTHENITAE

A. I. Solovyeva,^{1,2} N. K. Galaktionov,¹ O. I. Podgornaya^{1,2}

¹ Faculty of Biology and Soil Sciences of St. Petersburg State University and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: orcinuca@gmail.ru

We have determined that S-SAP method (Sequence specific amplification polymorphism) reveals clonal variability in the genomes of larvae of flatworm *Himasthla elongata* (Trematoda, Echinostomatidae). Being parthenogenetic the larvae were previously considered to be genetically homogeneous. Cloning and sequencing of a ~500 bp conservative fragment (B1) from the fragments' pattern has been performed. Sequence analysis of B1 has shown that this fragment has maximum homology with LINE elements from CR1 family of Hydra and sparrow. *In situ* hybridization (FISH) has detected dispersed distribution of B1. Several other fragments cloned from the same lane of agarose electrophoresis correspond to conservative domain of reverse transcriptase (RT) from CR1 family. Thus, we have shown that 1) cercariae of trematode *H. elongata* have clonal variability; 2) the S-SAP method allows to obtaining patterns of fragment distribution characteristic of individual cercariae; 3) conservative domain of RT of CR1 family participates in the pattern of polymorphic fragments generation. Identification of the CR1 transcripts in cercariae of *H. elongata* transcriptome is the aim of the future work. Cloning of the variable fragments from the fragments' pattern is in progress.

Key words: LINE, CR1, S-SAP, clonal variability, flatworms.