

На правах рукописи



Романов Денис Александрович

Изучение изменчивости и молекулярных механизмов образования псевдогенов
митохондриального происхождения в геноме дрозофил

03.02.07- генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории генетики насекомых Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

Научный руководитель:

Андрианов Борис Витальевич
Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории
генетики насекомых Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Института общей генетики им. Н.И.
Вавилова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Ким Александр Иннокентьевич
Доктор биологических наук,
профессор кафедры генетики
биологического факультета Московского
государственного университета им. М.В.
Ломоносова

Гордеев Михаил Иванович
Доктор биологических наук, профессор,
зав. кафедры общей биологии и
биоэкологии Государственного
образовательного учреждения высшего
профессионального образования
Московского государственного областного
университета

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии
развития им. Н.К. Кольцова Российской
академии наук

Защита диссертации состоится «24» декабря 2013 года в _____ на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д.3. Тел. (499)135-62-13, факс: (499)132-89-62, e-mail: aspirantura@vigg.ru, адрес в Интернете: www.vigg.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Автореферат диссертации разослан « _____ » ноября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Т.А. Синельщикова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Митохондриальные последовательности в ядерном геноме выявлены у всех изученных к настоящему времени эукариотических организмов. Впервые их обнаружили с помощью методов гибридизации нуклеиновых кислот и рестрикционного анализа. В течение долгого времени полученные данные рассматривались лишь как частные случаи, которые не имеют общебиологического значения. Ситуация изменилась, когда начались многочисленные работы с митохондриальной ДНК методами ПЦР и были получены первые полные геномы эукариотов. Во-первых, обнаружение множества фрагментов митохондриальной ДНК в составе хромосом не оставило места сомнениям относительно реальности переноса ДНК из митохондрий в ядро. Во-вторых, получила окончательное признание теория симбиотического происхождения эукариотической клетки и, в частности, происхождения митохондрий от альфа-протеобактерий (Lang et al., 1999; Adams, Palmer, 2003). В рамках этой теории закономерен постоянно идущий процесс переноса ДНК из изолированных геномов органелл, лишённых рекомбинации, в ядерный геном. Механизмы возникновения псевдогенов митохондриального происхождения (далее в тексте обозначаемые для краткости «митохондриальные псевдогены») различны. Наиболее вероятно непосредственное встраивание фрагментов митохондриальной ДНК в места двойных разрывов хромосом по механизму негомологичной рекомбинации (Blanchard, Schmidt, 1996), хотя и возможно наличие этапа обратной транскрипции РНК, считанной с митохондриальных генов (Gellissen, Michaelis, 1987). Отсутствие единого механизма возникновения и очевидной клеточной функции позволяет рассматривать митохондриальные псевдогены как молекулярные ископаемые и использовать для филогенетических реконструкций и уточнения систематического статуса близкородственных видов. В последнее время появились данные, позволяющие по-новому взглянуть на феномен псевдогенов митохондриального происхождения. Получены доказательства возникновения новых копий митохондриальных псевдогенов в соматических клетках, причем этот процесс резко активизируется в трансформированных клетках при некоторых вирусных инфекциях, подавлении клеточного дыхания и при действии ионизирующего излучения. Эти открытия позволяют рассматривать динамику формирования митохондриальных псевдогенов как чувствительный генетический маркер геномной нестабильности, и ставят их изучение в ряд приоритетных биомедицинских исследований.

Многими исследователями отмечалась ассоциация митохондриальных псевдогенов с ретротранспозонами (Hadler et al., 1998; Mishmar et al., 2004; Mularoni et al., 2012; Tsuji et al., 2012). У дрозофил группы *virilis* имеется функционально-активное семейство ретротранспозонов *Tv1*. *Tv1* относится к суперсемейству *gypsy* (Andrianov et al., 1999). Ретротранспозон *Tv1* обладает свойством сайт-специфично встраиваться в область микросателлитных повторов (ТА)_n. Спейсерная область между митохондриальными генами *atp6* и

cox3 у дрозофил группы *virilis* содержит такой микросателлитный повтор, что позволит выявлять псевдогены митохондриального происхождения в ядерном геноме, если они маркированы инсерцией ретротранспозона *Tv1* (Andrianov et al., 2010). Эти данные позволили спланировать и провести более подробное исследование митохондриальных псевдогенов у дрозофил группы *virilis*.

Группа близкородственных видов дрозофил *virilis* состоит из 12 видов, морфологически слабо различимых и относимых к четырём филадам: *virilis* (*D. virilis*, *D. lummei*, *D. novamexicana*, *D. americana americana*, *D. americana texana*), *montana* (*D. montana*, *D. lacicola*, *D. flavomontana* и *D. borealis*), *kanekoi* (*D. kanekoi*, *D. ezoana*) и *littoralis* (*D. littoralis*) (Morales-Hojas et al., 2011). В настоящее время данная группа является активно изучаемым модельным объектом для изучения процессов микроэволюции и видообразования.

В данном исследовании проведено сравнительное изучение псевдогенов митохондриального происхождения мух и клеточной культуры *Drosophila virilis*. Изучена ассоциация митохондриальных псевдогенов с ретротранспозном *Tv1* и определены возможности использования митохондриальных псевдогенов как филогенетических маркёров у дрозофил.

Степень разработанности темы исследования

Наибольшее внимание привлекают псевдогены митохондриального происхождения млекопитающих (особенно приматов) и насекомых. Большинство исследований митохондриальных псевдогенов основано на биоинформационном анализе полных геномов. Ряд работ сочетают биоинформационный анализ с экспериментальным выделением псевдогенов митохондриального происхождения (Mishmar et al., 2004; Ricchetti et al., 2004; Sawamura et al., 2008; Nergadze et al., 2010). Недавно показана активизация процесса образования митохондриальных псевдогенов при старении и в опухолевых клетках позвоночных (Caro et al., 2010; Muradian et al., 2010). Число исследований, посвященных изучению псевдогенов митохондриального происхождения дрозофил, в настоящее время невелико (Sawamura et al., 2008; Rogers, Griffiths-Jones, 2012). Анализ митохондриальных псевдогенов в клеточной культуре дрозофил проводился впервые. Представленные в работе данные являются оригинальными.

Цели и задачи исследования

1. Изучение псевдогенов митохондриального происхождения как маркёров геномной нестабильности в клеточной культуре.
2. Изучение ассоциаций псевдогенов митохондриального происхождения с ретротранспозоном *Tv1*, специфичным для дрозофил группы *virilis*.
3. Изучение возможности реконструкции филогенетических связей у дрозофил на основе анализа изменчивости псевдогенов митохондриального происхождения.

Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

1) изучить состав и особенности псевдогенов митохондриального происхождения в первичной и пересееваемой клеточных линиях *D. virilis* и в геноме дрозофил, образующих группу *virilis*;

- 2) провести *in silico* анализ псевдогенов митохондриального происхождения на основе полного генома *D. virilis* и описать ассоциации псевдогенов митохондриального происхождения с ретротранспозоном *Tv1*;
- 3) определить характер нуклеотидной изменчивости псевдогенов митохондриального происхождения в группе *virilis*;
- 4) уточнить порядок филиации в группе *virilis* на основе анализа изменчивости последовательности фрагмента гена *kl-2 1-beta dynein heavy chain* Y-хромосомы;
- 5) провести реконструкцию филогенетических связей дрозофил группы *virilis* на основе анализа изменчивости псевдогенов митохондриального происхождения.

Научная новизна

Впервые проанализирована изменчивость псевдогенов митохондриального происхождения у мух, в первичной и в пересеваемой клеточных культурах *D. virilis*.

Впервые показано возникновение новых копий псевдогенов митохондриального происхождения в пересеваемой клеточной культуре *D. virilis*.

В данной работе получены данные, указывающие на высокую степень изменчивости псевдогенов митохондриального происхождения после их интеграции в хромосомы, что противоречит представлению о них как о “молекулярных ископаемых”.

На основе анализа изменчивости последовательности фрагмента гена *kl-2 1-beta dynein heavy chain* Y-хромосомы получены данные, позволяющие уточнить филогенетическую структуру дрозофил группы *virilis*. В частности, показано, что *D. kanekoi* и *D. ezoana* образуют единый кластер, а *D. littoralis* имеет более древнее происхождение; получено подтверждение разделения вида *D. littoralis* на два подвида – *D. littoralis littoralis* и *D. littoralis imeretensis*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанный метод выделения митохондриальных псевдогенов может быть применён к тем видам животных, которые имеют активно перемещающиеся семейства ретротранспозонов. Полученные результаты вносят вклад в фундаментальные исследования по генетике геномной нестабильности в клеточных культурах животных. Описание и анализ псевдогенов митохондриального происхождения дрозофил группы *virilis* позволили получить новые данные для изучения эволюции фрагментов митохондриальной ДНК в ядерном геноме. Результаты работы вносят вклад в фундаментальные исследования по молекулярной генетике, разрабатываемые на дрозофиле в качестве модельного объекта. Полученные данные важны для исследований в области изучения стабильности генома и биологии старения.

Результаты работы могут быть применены в исследованиях, проводимых в учреждениях системы РАН: в Институте Общей генетики РАН, Институте Молекулярной биологии РАН, Институте Биологии развития РАН, Институте Биологии гена РАН. Результаты работы могут быть применены в

исследованиях, проводимых в учреждениях системы РАСХН: Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Всероссийском научно-исследовательском институте охотничьего хозяйства и звероводства РАСХН.

Положения, выносимые на защиту:

- В клетках пересеваемой культуры ускоряется перенос митохондриальной ДНК в ядро с образованием псевдогенов митохондриального происхождения.
- Новые инсерции ретротранспозона *Tv1* в пересеваемой культуре клеток происходят преимущественно, но не исключительно, в последовательности недавно возникших псевдогенов митохондриального происхождения.
- Перенос ДНК митохондриальных генов *atp6* и *cox3* в ядро может быть обнаружен по инсерциям ретротранспозона *Tv1* в область (AT)_n микросателлита, локализованного в межгенном спейсере *atp6* и *cox3* у дрозофил группы *virilis*.

Апробация результатов диссертации

Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях:

- Svetlana Y. Sorokina, **Denis A. Romanov**, Boris V. Andrianov, Ilya A. Zakharov // 54th Annual Drosophila Research Conference Washington, DC April 3-7. 2013. P.168. 525C.
- **Романов Д.А.**, Горелова Т.В., Сорокина С.Ю., Андрианов Б.В. // Актуальные проблемы биологической и химической экологии: сб. М.: Изда-во МГОУ, 2012. С.57-59.
- Svetlana Y. Sorokina, Boris V. Andrianov, **Denis A. Romanov**, Prohor A. Proshakov, Vladimir G. Mitrofanov // 53rd Annual Drosophila Research Conference. Chicago, IL. March 7 – March 11. 2012. P. 270. 518B.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, заключения, выводов, списка публикаций по теме диссертации, списка цитируемой литературы, в который входит 123 ссылок. Работа проиллюстрирована 1 таблицей и 16 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение тотальной ДНК, проведение ПЦР, клонирование и секвенирование ПЦР фрагментов проводили согласно стандартным методам.

Биоинформационный анализ

Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ проводили при помощи пакета программ Lasergene 97 “DNASTAR” и MEGA 5 (Tamura et al., 2007). Построение статистической парсимониальной сети митохондриальных гаплотипов проводили в программе TCS ver. 1.18 (Clement et al., 2000). В работе использовались следующие интернет – сервисы: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://genome.ucsc.edu/index.html>.

Получение первичной эмбриональной клеточной линии

Культуру получали по модифицированному протоколу (Echalier, 1997). Клеточную суспензию высевали в чашку Петри и культивировали при 26°C.

Рост первичной культуры отмечался через 2 суток и продолжается несколькими волнами до 12 месяцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение и характеристика фрагментов митохондриальной ДНК из ядерного генома дрозофил группы *virilis* и пересеваемой клеточной культуры *D. virilis*

Метод экспериментального выделения псевдогенов митохондриального происхождения у дрозофил группы *virilis* основан на сайт-специфичности инсерций ретротранспозона *Tv1* в сайт микросателлита (AT)_n. Данный микросателлит локализован в спейсерной области между митохондриальными генами *atp6* и *cox3* у дрозофил группы *virilis* (Andrianov et al., 2010). Эта особенность митохондриальной ДНК дрозофил группы *virilis* позволяет детектировать недавние события инсерций митохондриальных псевдогенов, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в ядерный геном. Инсерции ретротранспозона *Tv1* метят митохондриальные последовательности в ядерном геноме и позволяют их выделение с помощью ПЦР.

На **рисунке 1** приведено сравнение форм *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в прямой и обратной ориентациях, из генома мух и пересеваемой клеточной культуры 79f7Dv3g *D. virilis*. ПЦР фрагменты *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в прямой ориентации, могут быть получены только на матрице ДНК самцов, но не самок, что указывает на их локализацию в Y-хромосоме. Анализ нуклеотидных последовательностей индивидуальных клонов ПЦР фрагментов выявил ожидаемые инсерции *Tv1* в последовательность микросателлита (AT)_n в область межгенного спейсера *atp6* и *cox3*. Различия в длине ПЦР фрагментов, наблюдаемые только на матрице ДНК клеточной культуры, определяются различиями в длине длинных концевых повторов ретротранспозона *Tv1* (**рисунок 2**). Эти различия в длине связаны с наличием или отсутствием дупликаций длиной от 1 до 40 п.н. (**рисунки 1б и 3а**).

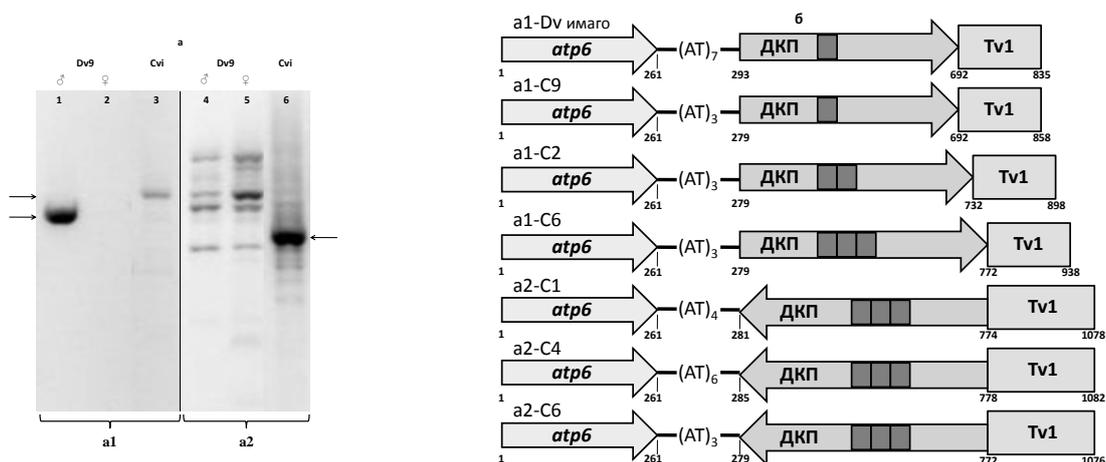


Рисунок 1. Выделение и структура *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения из генома мух *D. virilis* и пересеваемой клеточной культуры.

а – фракционирование ПЦР фрагментов в агарозном геле, образованных *atp6* псевдогенами митохондриального происхождения, ассоциированными с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в прямой (a1) и обратной (a2) ориентациях. Окрашивание бромидом этидия. На дорожках 1 – 2 и 4 – 5 фракционированы ПЦР фрагменты, полученные на матрицах геномной ДНК самцов и самок линии В9 *D. virilis*. На дорожках 3 и 6 фракционированы ПЦР фрагменты, полученные на матрице геномной ДНК клеточной культуры 79f7Dv3g. Стрелками указаны ПЦР фрагменты ожидаемого размера. **б** – карты клонов *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1*, из генома клеточной культуры и имаго *D. virilis*. Карта, обозначенная a1-Dv имаго, соответствует хромосомному локусу Y-хромосомы, выявленному у всех проанализированных линий мух *D. virilis* (GenBank ID: JX560762 – JX560765); карты, обозначенные a1-C9, a1-C2, a1-C6, соответствуют разным типам *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в прямой ориентации, выявленным в геноме клеточной линии 79f7Dv3g (GenBank ID: JX560766, JX 560767, JX560769); карты, обозначенные a2-C1, a2-C4, a2-C6, соответствуют разным типам *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в обратной ориентации, выявленных в геноме клеточной культуры 79f7Dv3g (GenBank ID: KF669862-KF669864). Внизу карт отмечены размеры *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения и ассоциированных с ними ретротранспозонов *Tv1*. Тёмными прямоугольниками выделена последовательность длиной 40 п.н., образующая прямые дупликации.

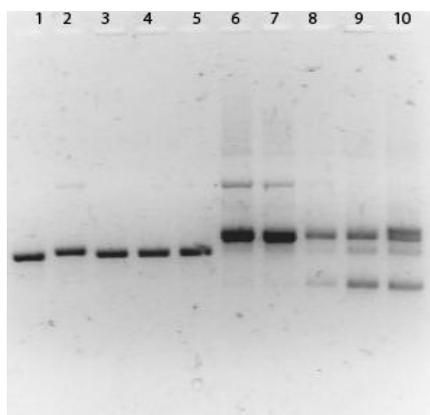
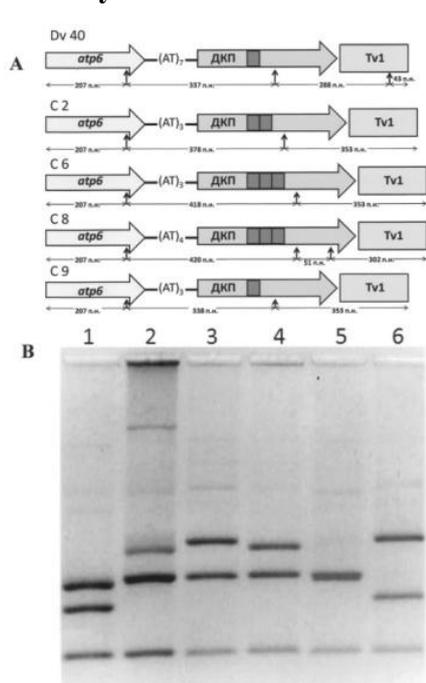


Рисунок 2. Фракционирование ПЦР фрагментов образованных *atp6* псевдогенами митохондриального происхождения, ассоциированными с ретротранспозоном *Tv1* в агарозном геле. Окрашка бромидом этидия.

На дорожках 1 – 5 фракционированы ПЦР фрагменты, полученные на матрицах геномной ДНК самцов из следующих линий мух *D. virilis*: B9, L160, Dv1, Dv40, Sa96, соответственно. На дорожках 6 – 10 фракционированы ПЦР фрагменты, полученные на матрицах геномной ДНК клеточной культуры 79f7Dv3g, выделенной в 2004, 2005,

2008, 2010 и 2012 годах, соответственно.

Рисунок 3. Изменчивость *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения .



А – карты клонов *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1*, из генома клеточной культуры. Карта обозначенная Dv40, соответствует хромосомному локусу Y-хромосомы, выявленному у всех проанализированных линий мух *D. virilis* (GenBank ID: JX560762 - JX560765); карты обозначенные: C-2, C-6, C-8, C-9 соответствуют разным типам *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с ретротранспозоном *Tv1*, выявленным в геноме клеточной линии 79f7Dv3g (GenBank ID: JX560766 – JX560769). Стрелками отмечены *HinfI* сайты. Ожидаемые размеры *HinfI* фрагментов отмечены внизу карт. Тёмными прямоугольниками выделена последовательность длиной 40 н.п., образующая прямые дубликации и ответственная за наблюдаемую разницу в длине *HinfI* фрагментов.

В – *HinfI* ПДРФ суммарного препарата ПЦР фрагментов *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1*

полученных на матрице ДНК линии мух Dv40 – дорожка 1; клеточной культуры 79f7Dv3g – дорожка 2; и на матрице плазмидной ДНК индивидуальных клонов C-6, C-2, C-9, C-8, на дорожках 3,4,5 и 6 соответственно. Карты представленных клонов даны в секции «А».

Длина митохондриальных псевдогенов в геноме мух и клеточной линии постоянна и равна длине соответствующей митохондриальной последовательности. Используемые нами праймеры амплифицируют *atp6* псевдоген митохондриального происхождения длиной 261 н.п. Все пять линий мух *D.virilis* содержат идентичный митохондриальный псевдоген, содержащий 17 точковых нуклеотидных замен по сравнению с соответствующей митохондриальной последовательностью. Отмеченные замены приводят к 6 аминокислотным замещениям, но не приводят к образованию стоп-кодонов. Совпадение сиквенсов *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения из линий мух *D.virilis* различного географического происхождения указывает на существование данного псевдогена митохондриального происхождения в предковой форме *D.virilis* до её экспансии по современному ареалу.

Все проанализированные клоны из клеточной культуры относятся к одному из четырёх типов (рисунок 3а). На рисунке 3 приведено сравнение карт индивидуальных клонов ПЦР фрагментов, а также представлен *HinfI* ПДРФ ПЦР фрагментов, полученных на матрицах плазмидной ДНК клонов, и суммарного ПЦР препарата, полученного на матрице геномной ДНК клеточной культуры. Митохондриальные псевдогены из клеточной культуры идентичны митохондриальной последовательности, за исключением псевдогена митохондриального происхождения типа C-8. В этом клоне обнаружена точковая синонимичная замена Т > С в позиции № 4716 согласно последовательности полного митохондриального генома *D.virilis* (GenBank ID: VK006340.1). Тип C-8 интересен ещё и тем, что специфический только для него *HinfI* фрагмент не выявляется в суммарном препарате, полученном на матрице

геномной ДНК клеточной культуры (**рисунок 3б**). Эта особенность, вероятно, связана с низкой копийностью типа С-8. Это возможно в случае, если псевдоген митохондриального происхождения С-8 образовался уже после возникновения пересееваемого клона клеток, давшего начало пересееваемой клеточной культуре. Дополнительно данное предположение поддерживается разной длиной микросателлита (АТ)_n, который в случае С-8 на один АТ динуклеотид длиннее, чем в случае остальных трёх типов (**рисунок 3а**). Различия типов С-2, С-6 и С-9 касаются разного числа коротких дупликаций в последовательности длинного концевой повтора *Tv1. atp6* псевдоген митохондриального происхождения, характерный для генома мух *D. virilis*, оказался потерян в ходе культивирования пересееваемой клеточной линии. Известно, что в клеточных культурах иногда наблюдается спонтанная потеря некоторых хромосом. Чаще всего теряется Y-хромосома и возникают моносомии по X хромосоме и хромосоме IV (Eshalier, 1997). Потеря Y-хромосомы в пересееваемой культуре *D. virilis* было подтверждено по потере гена *kl-2 1-beta dynein heavy chain*, стабильно выявляемого у всех представителей группы *virilis*.

В установившейся клеточной линии выявлены несколько разных копий *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения, идентичных по сиквенсу с исходной митохондриальной формой. В свою очередь, такие митохондриальные псевдогены не выявляются в геноме мух. Эти факты позволяют предположить их возникновение в клетках пересееваемой культуры. Существуют две возможности возникновения многих копий митохондриальных псевдогенов в геноме. Либо (1) путём нескольких независимых инсерций митохондриальной ДНК в геном, либо (2) путём дупликаций единственного псевдогена митохондриального происхождения. Такие дупликации могут происходить при амплификации отдельных локусов или как результат общей полиплоидизации генома клетки. Анализ нуклеотидной изменчивости ретротранспозона *Tv1*, ассоциированного с разными копиями псевдогенов митохондриального происхождения, свидетельствует в пользу первого предположения о независимом происхождении разных копий псевдогенов митохондриального происхождения. Следовательно, ядерный геном пересееваемой клеточной культуры подвержен инсерциям фрагментов митохондриальной ДНК, что может служить причиной трансформации первичной клеточной культуры в пересееваемую, и вызывать геномную нестабильность клеток в пересееваемой культуре.

В геноме *D. laticola* был обнаружен *atp6* псевдоген митохондриального происхождения, ассоциированный с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в прямой ориентации, содержащий 8 точковых нуклеотидных замен по сравнению с соответствующей митохондриальной последовательностью *D. laticola* (GenBank ID: FJ536200.1), 2 из которых приводят к аминокислотным замещениям.

ПЦР фрагменты *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в обратной ориентации, могут быть получены только на матрице ДНК пересееваемой клеточной культуры *D. virilis*. ПЦР продукты ожидаемого размера на матрице ДНК самцов

и самок *D. virilis* не были получены. Анализ нуклеотидных последовательностей индивидуальных клонов ПЦР фрагментов позволил выявить ожидаемые инсерции *Tv1* в последовательность микросателлита (AT)_n в область межгенного спейсера *atp6* и *cox3*. Длина псевдогенов митохондриального происхождения в клеточной линии постоянна и равна длине соответствующей митохондриальной последовательности. Используемые нами праймеры амплифицируют *atp6* псевдоген митохондриального происхождения длиной 261 п.н. Все проанализированные клоны из клеточной культуры относятся к одному из трёх типов, карты которых представлены на **рисунке 16**. Митохондриальный псевдоген типа a2-C4 идентичен митохондриальной последовательности. Митохондриальный псевдоген типа a2-C1 содержит одну точковую несинонимичную замену А > С в позиции № 4502 согласно последовательности полного митохондриального генома *D. virilis* (GenBank ID: VK006340.1), приводящую к аминокислотной замене треонина на пролин. Псевдоген митохондриального происхождения типа a2-C6 содержит одну точковую несинонимичную замену А > С в позиции № 4709 согласно последовательности полного митохондриального генома *D. virilis*, приводящую к аминокислотной замене серина на аргинин. Ретротранспозоны *Tv1*, ассоциированные с *atp6* псевдогенами митохондриального происхождения этих трёх типов, отличаются друг от друга только немногочисленными точковыми нуклеотидными заменами. Размеры микросателлитов (AT)_n специфичны для каждого типа.

В геноме *D. montana* был обнаружен *atp6* псевдоген митохондриального происхождения, ассоциированный с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в обратной ориентации, содержащий 19 точковых нуклеотидных замен по сравнению с соответствующей митохондриальной последовательностью *D. montana* (GenBank ID: FJ536202.1), 4 из которых приводят к аминокислотным замещениям, одна – к появлению стоп-кодона. Кроме того, в данном митохондриальном псевдогене имеется делеция одного нуклеотида, приводящая к сдвигу рамки.

Для изучения образования митохондриальных псевдогенов *de novo*, нами была получена первичная клеточная культура из эмбрионов *D. virilis*. Данная культура представлена клетками двух типов: эпителиально-подобными и нейроно-подобными. Эти клетки плотно прикреплены к субстрату и морфологически заметно отличаются от клеток пересеваемой клеточной культуры 79f7Dv3g.

На **рисунке 4** представлено сравнение форм *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения в геноме мух *D. virilis*, в первичной и пересеваемой клеточных культурах. Из приведённой фотографии электрофореза в агарозном геле видно, что ПЦР продукты, полученные на матрице ДНК из эпителиально-подобных клеток первичной клеточной культуры не отличаются от ПЦР продуктов, полученных на матрице ДНК самцов *D. virilis*. ПЦР продукты, полученные на матрице ДНК из нейроно-подобных клеток первичной клеточной культуры идентичны ПЦР продуктам, полученным на матрице ДНК из эпителиально-подобных клеток первичной

клеточной культуры. Аналогичные результаты были получены при сравнении форм *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения в геноме мух *D. virilis*, в первичной и пересееваемой клеточных культурах. Новые копии псевдогенов выявлены только в клетках пересееваемой культуры.

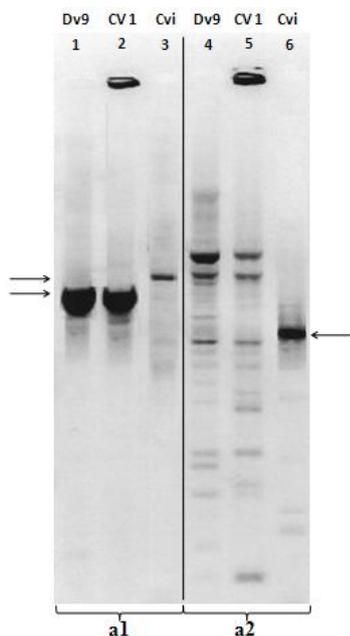


Рисунок 4. Сравнение форм *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения в геноме мух *D. virilis*, в первичной и пересееваемой клеточных культурах.

Фракционирование в агарозном геле ПЦР фрагментов, образованных *atp6* псевдогенами митохондриального происхождения, ассоциированными с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в прямой (**a1**) и обратной (**a2**) ориентациях. Окрашивание бромидом этидия. На дорожках 1 и 4 фракционированы ПЦР фрагменты, полученные на матрице геномной ДНК самцов мух линии В9 *D. virilis*; на дорожках 2 и 5 фракционированы ПЦР фрагменты, полученные на матрице геномной ДНК эпителиально-подобных клеток первичной клеточной культуры *D. virilis*; на дорожках 3 и 6 фракционированы ПЦР фрагменты, полученные на матрице геномной ДНК пересееваемой клеточной культуры 79f7Dv3g *D. virilis*. Стрелками указаны ПЦР фрагменты ожидаемого размера.

На **рисунке 5** приведено сравнение форм *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в прямой и обратной ориентациях, из генома мух и пересееваемой клеточной культуры 79f7Dv3g *D. virilis*. ПЦР фрагменты *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в прямой ориентации, могут быть получены только на матрице ДНК пересееваемой клеточной культуры *D. virilis*. ПЦР продукты ожидаемого размера на матрице ДНК самцов и самок *D. virilis* не были получены. Анализ нуклеотидных последовательностей индивидуальных клонов ПЦР фрагментов позволил выявить ожидаемые инсерции *Tv1* в последовательность микросателлита $(AT)_n$ в область межгенного спейсера *atp6* и *cox3*. Проанализированные клоны из клеточной культуры относятся к одному из четырёх типов, карты которых представлены на **рисунке 5б**. Митохондриальный псевдоген типа c1-C10 идентичен митохондриальной последовательности. Митохондриальный псевдоген типа c1-C2 содержит одну точковую несинонимичную замену Т > С в позиции № 5211 согласно последовательности полного митохондриального генома *D. virilis*, приводящую к аминокислотной замене серина на пролин.

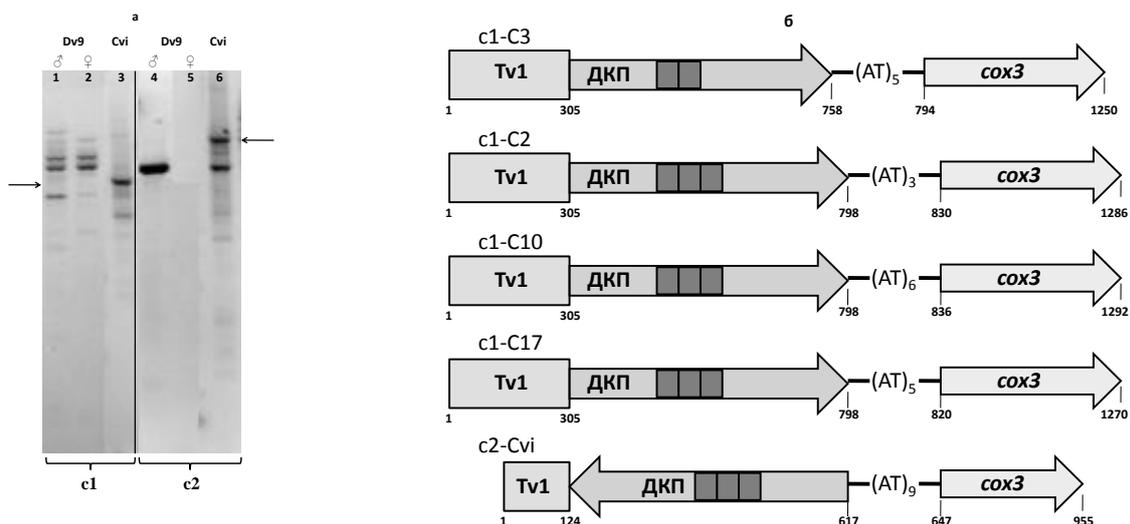


Рисунок 5. Выделение и структура *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения из генома мух *D. virilis* и пересеваемой клеточной культуры.

а – фракционирование в агарозном геле ПЦР фрагментов, образованных *cox3* псевдогенами митохондриального происхождения, ассоциированными с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в прямой (с1) и обратной (с2) ориентациях. Окрашивание бромидом этидия. На дорожках 1 – 2 и 4 – 5 фракционированы ПЦР фрагменты, полученные на матрицах геномной ДНК самцов и самок линии В9 *D. virilis*. На дорожках 3 и 6 фракционированы ПЦР фрагменты, полученные на матрице геномной ДНК клеточной культуры 79f7Dv3g. Стрелками указаны ПЦР фрагменты ожидаемого размера. **б** – карты клонов *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1*, из генома клеточной культуры *D. virilis*. Карты, обозначенные с1-C3, с1-C2, с1-C10, с1-C17, соответствуют разным типам *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в прямой ориентации, выявленным в геноме клеточной линии 79f7Dv3g (GenBank ID: KF669865- KF669868); карта, обозначенная с2-Cvi, соответствует типу *cox3* псевдогену митохондриального происхождения, ассоциированного с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в обратной ориентации, выявленной в геноме клеточной культуры 79f7Dv3g (GenBank ID: FJ539165). Внизу карт отмечены размеры *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения и ассоциированных с ними ретротранспозонов *Tv1*. Тёмными прямоугольниками выделена последовательность длиной 40 п.н., образующая прямые дубликации.

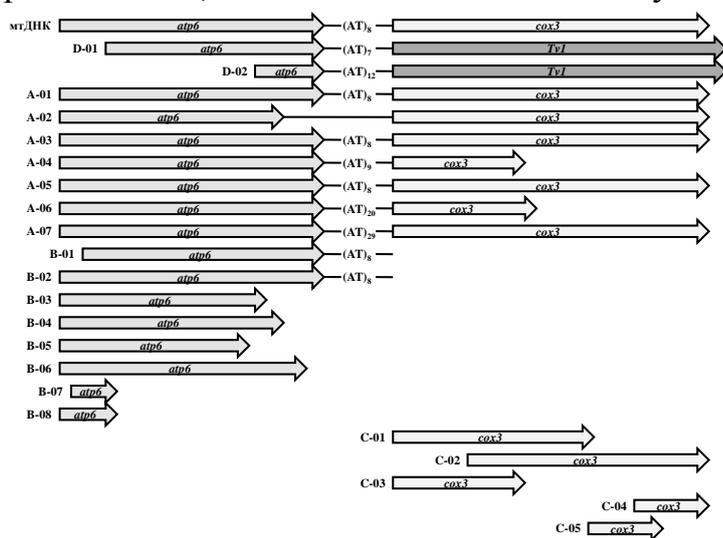
Псевдоген митохондриального происхождения типа с1-C3 содержит одну точковую несинонимичную замену Т > С в позиции № 5088 согласно последовательности полного митохондриального генома *D. virilis*, приводящую к аминокислотной замене триптофана на аргинин. Митохондриальный псевдоген типа с1-C17 содержит 13 точковых нуклеотидных замен по сравнению с соответствующей митохондриальной последовательностью, 5 из которых приводят к аминокислотным заменам, и одну делецию размером в 6 нуклеотидов. Длина митохондриальных псевдогенов в клеточной линии постоянна, за исключением типа с1-C17, и равна длине соответствующей митохондриальной последовательности. Используемые нами праймеры амплифицируют *cox3* псевдоген митохондриального происхождения длиной 457 п.н. Ретротранспозоны *Tv1*, ассоциированные с *cox3* псевдогенами митохондриального происхождения этих четырёх типов отличаются друг от

друга наличием или отсутствием дупликаций длиной от 1 до 40 п.н. Размеры микросателлитов (AT)_n специфичны для каждого типа.

ПЦР фрагменты *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерцией ретротранспозона *Tv1* в обратной ориентации, могут быть получены только на матрице ДНК пересеваемой клеточной культуры *D. virilis*. ПЦР продукты ожидаемого размера на матрице ДНК самцов и самок *D. virilis* не были получены. Карта клона представлена на **рисунке 5б**. Митохондриальный псевдоген типа с2-Сvi содержит 11 нуклеотидных замен, приводящих к 3 аминокислотным заменам.

***In silico* анализ псевдогенов митохондриального происхождения, гомологичных митохондриальным генам *atp6* и *cox3*, полного генома *D. virilis* линии Dv 149**

Был выполнен поиск псевдогенов митохондриального происхождения, гомологичных митохондриальным генам *atp6* и *cox3* в полном геноме *D. virilis*, сборка августа 2005 (Agencourt prelim/droVir2), доступного на интернет-ресурсе <http://genome.ucsc.edu/>. Поиск митохондриальных псевдогенов осуществлялся с помощью Vlat-анализа с параметрами поиска, заданными по умолчанию. В качестве поискового запроса использовались полные последовательности митохондриальных генов *atp6* и *cox3*. Полученные в результате последовательности скаффолдов, содержащих последовательности, гомологичные митохондриальным, были проанализированы с помощью программы BLAST с параметрами поиска, заданными по умолчанию. Последовательности, имеющие сходство с митохондриальной ДНК *D. virilis*, равное 99%, из дальнейшего анализа удалялись. Обнаруженные псевдогены



происхождения сравнивались вручную с последовательностями соответствующих митохондриальных генов.

Рисунок 6. Схемы *atp6* и *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения в геноме мух *D. virilis*, построенные на основе анализа полного генома *D. virilis*.

На **рисунке 6** приведена схема *atp6* и *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения в геноме мух *D. virilis*. На схеме отражено соответствие обнаруженных митохондриальных псевдогенов с фрагментом митохондриального генома, содержащего гены *atp6* и *cox3*, разделённых межгенным спейсером. Из представленной схемы видно, что в полном геноме мух *D. virilis* имеется всего два *atp6* псевдогена митохондриального происхождения, ассоциированных с ретротранспозоном

Tv1. *atp6* псевдоген митохондриального происхождения, обозначенный D-01, является аналогом псевдогена митохондриального происхождения, обнаруженного нами экспериментально в Y-хромосоме мух *D. virilis*. *atp6* псевдоген митохондриального происхождения, обозначенный D-02, не был найден нами экспериментально, поскольку не содержит сайта для отжига использованных праймеров. Митохондриальный псевдоген D-02 предположительно локализован в хромосоме VI, поскольку фланкирующий его участок имеет сходство с последовательностью хромосомы VI, равное 95%. Карты митохондриальных псевдогенов D-01 и D-02 приведены на **рисунке 7**.

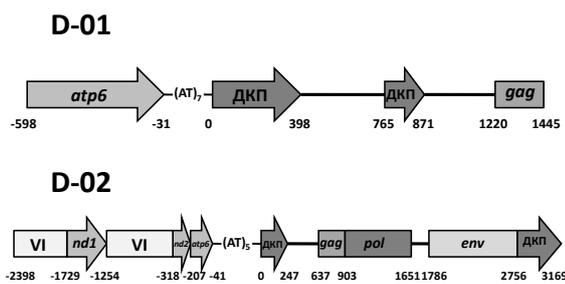


Рисунок 7. Карты *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения и их генетического окружения в геноме мух *D. virilis*. (По данным анализа полного генома *D. virilis*).

Карта фрагмента Y-хромосомы обозначена D-01; карта фрагмента хромосомы VI обозначена D-02. Внизу указаны расстояния (п.н.) от начала длинного концевой повтора ретротранспозона *Tv1*, принятого за ноль.

Остальные типы митохондриальных псевдогенов, изображённые на **рисунке 6**, не имеют ассоциаций с ретротранспозоном *Tv1* и являются составными частями более крупных псевдогенов митохондриального происхождения с неизвестной локализацией в геноме. Исключение из них составляют митохондриальные псевдогены B-01, B-02, B-07, C-01, C-03 и C-5, представляющие собой одиночные фрагменты митохондриальной ДНК с неизвестной локализацией в ядерном геноме. Поскольку анализ всех митохондриальных псевдогенов не входил в задачи исследования, на схеме отражены лишь те фрагменты крупных псевдогенов митохондриального происхождения, которые гомологичны митохондриальным генам *atp6* и *cox3*.

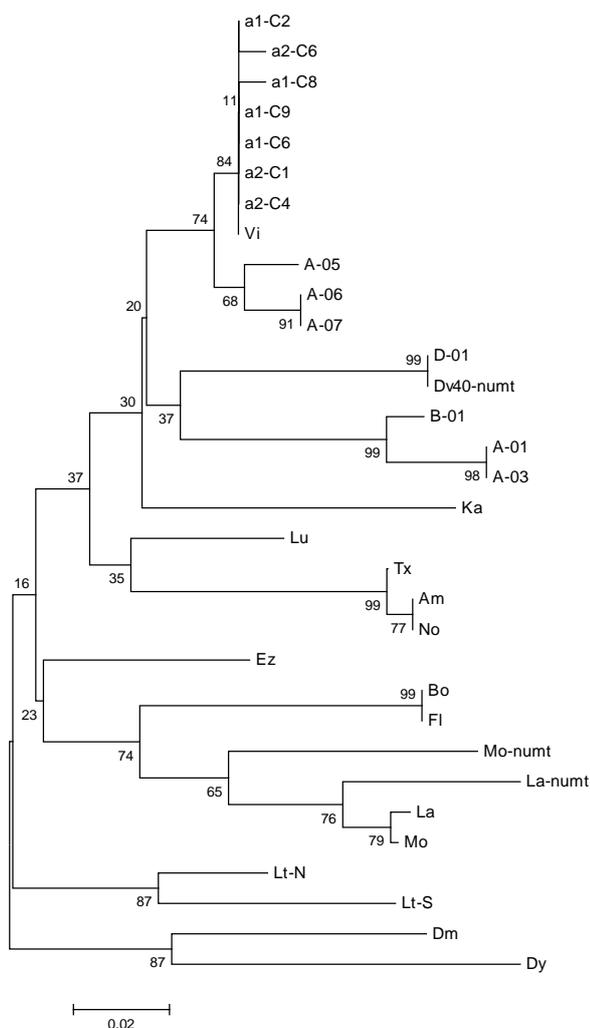
Филогенетический анализ псевдогенов митохондриального происхождения

На **рисунке 8** приведена реконструкция возникновения *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения в группе дрозофил *virilis*, выявленных как экспериментально, так и с помощью *in silico* анализа. Для построения данной филограммы были использованы последовательности митохондриальной ДНК и псевдогенов митохондриального происхождения дрозофил группы *virilis* длиной 180 п.н. Из приведённой филограммы видно, что *atp6* псевдогены митохондриального происхождения *D. virilis* обладают наибольшим сходством с последовательностью соответствующего митохондриального гена *D. virilis* и образуют четыре кластера. *atp6* псевдогены митохондриального происхождения, найденные в пересеваемой клеточной культуре *D. virilis*, практически идентичны митохондриальной ДНК *D. virilis* (их сходство с мтДНК составляет 99 – 100%) и формируют вместе с мтДНК единый кластер. Другой кластер образован сравнительно недавно возникшими

митохондриальными псевдогенами, не ассоциированными с ретротранспозоном *Tv1*, – A-05, A-06 и A-07. Отдельный кластер представлен *atp6* псевдогеном митохондриального происхождения, локализованным в Y-хромосоме мух *D. virilis*. На филограмме ему соответствуют две последовательности, одна из которых была получена с помощью *in silico* анализа (D-01), а другая – экспериментально (Dv40-numt). Судя по филограмме, данный *atp6* псевдоген митохондриального происхождения возник вскоре после дивергенции *D. virilis* от остальных дрозофил филады *virilis*, что также подтверждается отсутствием аналогичного псевдогена митохондриального происхождения в геномах *D. lummei*, *D. novamexicana*, *D. americana americana* и *D. americana texana*. В четвёртый кластер вошли более древние митохондриальные псевдогены, не ассоциированные с ретротранспозоном *Tv1*, – B-01, B-02, A-01, A-03.

Рисунок 8. Филогенетическая реконструкция возникновения *atp6* псевдогенов митохондриального происхождения в группе дрозофил *virilis*.

Последовательности митохондриальной ДНК разных видов дрозофил группы *virilis* обозначены двухбуквенным кодом (Bo - *Drosophila borealis*, Vi – *Drosophila virilis*, Ez - *Drosophila ezoana*, Fl - *Drosophila flavomontana*, Ka - *Drosophila kanekoi*, La - *Drosophila laticola*, Lt-N – *Drosophila littoralis* North population, Lt-S – *Drosophila littoralis* South population, Lu – *Drosophila lummei*, Mo - *Drosophila montana*, No - *Drosophila novamexicana*, Tx - *Drosophila americana texana*, Am - *D. americana americana*). В качестве внешней группы использовалась митохондриальная ДНК *D. melanogaster* линии oregonR – Dm и *D. yakuba* – Dy.



Митохондриальные псевдогены, выделенные в данном исследовании из мух и пересееваемой клеточной культуры *D. virilis*, обозначены четырёхзначным обозначением через тире. Первые два знака обозначают тип опыта (см. **рисунок 1**), вторые два знака обозначают уникальный номер клона. Митохондриальные псевдогены, выделенные из мух *D. laticola* и *D. montana*, обозначены *La-numt* и *Mo-numt*, соответственно.

Митохондриальные псевдогены, выявленные с помощью *in silico* анализа полного генома *D. virilis*, обозначены трёхзначным обозначением через тире (см. **рисунок 6**).

atp6 псевдогены митохондриального происхождения, выявленные в геномах дрозофил *D. montana* и *D. laticola*,

оказались близки к соответствующим последовательностям митохондриальной ДНК этих видов. Скорее всего, они возникли вскоре после дивергенции *D. montana* и *D. laticola* от ближайших видов *D. borealis* и *D. flavomantana*.

Интересно отметить, что указанные *atp6* псевдогены митохондриального происхождения значительно различаются между собой в отличие от последовательностей митохондриального гена *atp6*, что позволяет предположить наличие ускоренной эволюции фрагментов митохондриальной ДНК в ядерном геноме дрозофил.

На **рисунке 9** приведена реконструкция возникновения *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения в группе дрозофил *virilis*, выявленных как экспериментально, так и с помощью *in silico* анализа. Из данной филограммы видно, что *cox3* псевдогены митохондриального происхождения *D. virilis* обладают наибольшим сходством с последовательностью соответствующего митохондриального гена *D. virilis* и образуют пять кластеров. Интересно отметить, что некоторые *cox3* псевдогены митохондриального происхождения, ассоциированные с ретротранспозоном *Tv1* в клеточной культуре (c1-17 и c2-01), оказались сходны с *cox3* псевдогенами митохондриального происхождения мух, не маркированными инсерцией ретротранспозона *Tv1* (A-05 и A-07). Это указывает на способность активно экспрессирующегося в пересеваемой

клеточной культуре *D. virilis* ретротранспозона *Tv1* маркировать не только недавние события интеграции митохондриальной ДНК в ядерный геном, но и более древние.

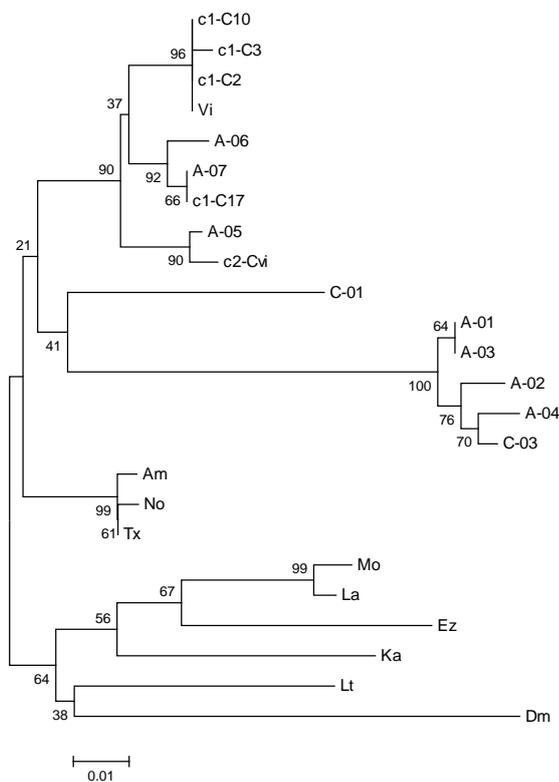


Рисунок 9. Филогенетическая реконструкция возникновения *cox3* псевдогенов митохондриального происхождения в группе дрозофил *virilis*.

Последовательности митохондриальной ДНК разных видов дрозофил группы *virilis* обозначены двухбуквенным кодом (см. **рисунк 8**). В качестве внешней группы использовалась митохондриальная ДНК *D. melanogaster* линии oregonR – *Dm*.

Митохондриальные псевдогены, выделенные в данном исследовании, обозначены четырёхзначным обозначением через тире. Первые два знака обозначают тип опыта (см. **рисунк 5**), вторые два знака обозначают уникальный номер клона.

Митохондриальные псевдогены, выявленные с помощью *in silico* анализа полного генома *D. virilis*, обозначены трёхзначным обозначением через тире (см. **рисунк 6**).

Идентификация транспозиционно-активного подсемейства ретротранспозонов *Tv1* в геноме *D. virilis*

На рисунке 10 приведено сравнение форм ДКП ретротранспозонов *Tv1* из геномов мух и пересееваемой клеточной культуры *D. virilis*, полученных как с помощью *in silico* анализа, так и выявленных экспериментально по ассоциации с псевдогенами митохондриального происхождения, гомологичными митохондриальным генам *atp6* и *cox3*. Ретротранспозон *Tv1*, ассоциированный с *atp6* псевдогеном митохондриального происхождения, локализованным в Y-хромосоме мух *D. virilis*, является одной из наиболее древних форм *Tv1*, обнаруженным в геноме *D. virilis*. Выявленный в геноме пересееваемой клеточной культуры активно идущий процесс образования новых митохондриальных псевдогенов, ассоциированных с инсерциями ретротранспозона *Tv1*, позволяет выявлять транспозиционно-активные формы *Tv1*. Из 12 независимых инсерций *Tv1*, ассоциированных с псевдогенами митохондриального происхождения, 11 вызваны транспозицией только одной формы ретротранспозона, которая формирует молодое подсемейство ретротранспозонов. Все новые инсерции ретротранспозонов *Tv1*, за исключением двух, произошли в молодые митохондриальные псевдогены, возникшие в пересееваемой клеточной культуре, и только в двух случаях инсерция *Tv1* произошла в микросателлит (AT)_n, ассоциированный со старыми *cox3* псевдогенами митохондриального происхождения, существующими в геноме мух, но без ассоциации с *Tv1*.

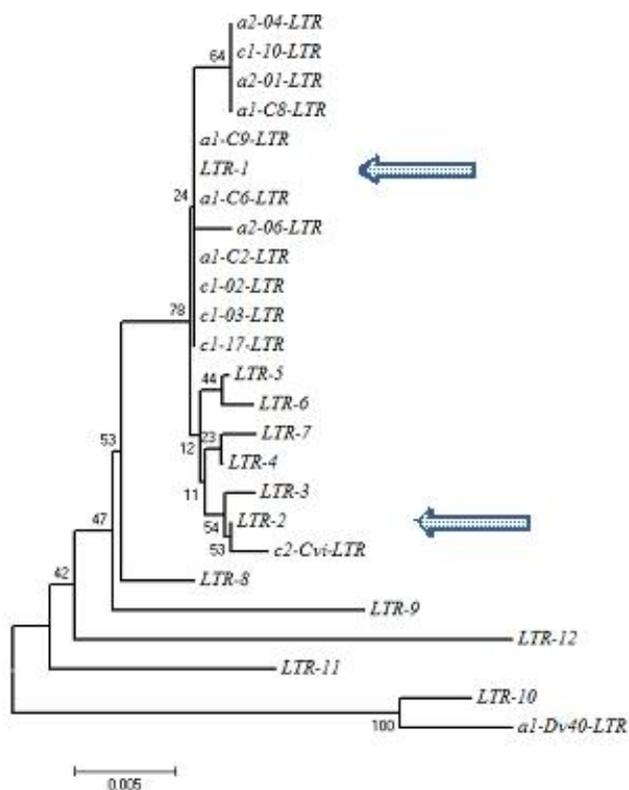


Рисунок 10. Сравнение форм ДКП ретротранспозона *Tv1* в геноме мух и пересееваемой клеточной линии *D. virilis*.

Название ДКП ретротранспозонов, ассоциированных с псевдогенами митохондриального происхождения, включает обозначение экспериментально полученного клона с пометкой LTR. Разные формы ДКП ретротранспозонов *Tv1*, найденные в геноме *D. virilis* с помощью анализа *in silico*, обозначены как LTR с цифровой пометкой. Стрелками отмечены два типа длинных концевых повторов ретротранспозона *Tv1*, соответствующих транспозиционно активным копиям *Tv1* в пересееваемой клеточной культуре.

Интересно отметить, что в одном из этих двух случаев это была инсерция одной формы *Tv1* из 11 родственных друг другу, а в другом случае произошла инсерция иной формы *Tv1*. Возникновение новых митохондриальных псевдогенов и транспозиции *Tv1* выявлены только в пересееваемой клеточной культуре, но не обнаружены в первичной культуре

клеток. Полученные данные позволяют сделать вывод об ослаблении контроля за ретротранспозицией в трансформированной культуре клеток *D. virilis* с неограниченным ростом. Специфические прямые дубликации длиной 40 п.н. в структуре промотора транспозиционно активного подсемейства ретротранспозонов *Tv1*, характерны для сайтов связывания стероидных гормонов. Наличие таких сайтов, возможно, определяет повышенный уровень транскрипции данного подсемейства *Tv1* в клетках пересееваемой культуры и определяет его способность к ретротранспозиции.

Сравнительный анализ фрагмента гена *kl-2 1-beta dynein heavy chain* Y-хромосомы у дрозофил группы *virilis* и филогенетическая реконструкция порядка филиации в группе

С целью доказать потерю Y-хромосомы в трансформированной клеточной линии, мы выбрали и тестировали ген *kl-2 1-beta dynein heavy chain* в клеточной культуре и в геномах 12 видов дрозофил, образующих группу *virilis*. Виды дрозофил группы *virilis* представляют собой одну из хорошо изученных моделей видообразования и микроэволюции (Morales-Hojas et al., 2011). В настоящей работе была впервые изучена изменчивость последовательности ДНК Y-хромосомы у 12 видов дрозофил группы *virilis* для разрешения неопределённых аспектов филогенеза группы. Благодаря отсутствию рекомбинации генов, локализованных на Y-хромосоме, изучение изменчивости этих генов, обеспечивает особые возможности для определения порядка дивергенции в группе. Ген *kl-2 1-beta dynein heavy chain* был приобретён Y-хромосомой предка рода *Drosophila* перед разделением его на подроды *Drosophila* и *Sophophora*, произошедшего между 260 и 63 млн. лет назад (Koerich et al., 2008). У всех секвенированных видов *Drosophila kl-2* ген остался связанным с Y-хромосомой за исключением *D. pseudoobscura* (Koerich et al., 2008). Был выполнен сравнительный анализ ПЦР фрагментов гена *kl-2* всех 12 видов дрозофил группы *virilis*.

В полученном комплекте сиквенсов фрагментов гена *kl-2* число нуклеотидных замен на сайт при попарном сравнении колеблется в десять раз от 0,005 в паре *D. americana americana* и *D. americana texana* до 0,051 в паре *D. americana americana* и *D. borealis*. Общая средняя дистанция для всей группы равна 0,036. Основываясь на этих данных, была построена медианная сеть гаплотипов Y-хромосомы группы *virilis*, с помощью программного обеспечения TCS (**рисунок 11**). TCS осуществляет оценку генных генеалогий на основе полиморфных последовательностей ДНК и строит медианную парсимониальную сеть взаимопревращений гаплотипов (Clement et al., 2000). Результаты, представленные на **рисунке 11**, в общем соответствуют полученным ранее, основанным на сравнении мультилокусных данных (Morales-Hojas et al., 2011), в выявлении четырёх главных кластеров группы: филлады *D. virilis*, филлады *D. montana*, филлады *D. kanekoi* и филлады *D. littoralis*. Самый интересный момент касается определения порядка филиации филад. Мультилокусный анализ, основанный на 6 ядерных генах и 2

митохондриальных генах, показал, что последний общий предок группы имел голарктическое распространение, от которого североамериканские и евразийские линии эволюционировали от 7,5 до 8,9 млн лет назад. Были предложены и сравнены две конкурирующие эволюционные гипотезы (Morales-Нојas et al., 2011). Первая, простая консенсусная модель дерева для анализа мультилокусных данных, приводит к заключению, что *D. kanekoi* и *D. ezoana* образуют один кластер, а *D. littoralis* имеет более древнее происхождение. Более сложный метод, использующий многовидовую модель выравнивания (BEST), приводит к альтернативному заключению: *D. kanekoi* – это первый вид, отделившийся от общего предка этих трех видов. Это заключение подтверждается локализацией древнего ретротранспозона *old bilbo*-подобного ретроэлемента без ДКП, который имеется у *D. littoralis* и *D. virilis*, но отсутствует у *D. kanekoi* (Reis et al., 2008). Полученные в настоящей работе данные надёжно подтверждают первую эволюционную модель и показывают, что *D. kanekoi* и *D. ezoana* образуют один кластер. Кроме этого, ясно, что скорость фиксации нуклеотидных замен сильно отличается у разных видов, возможно, из-за различий в численности популяций. Маленькие островные популяции *D. kanekoi* из Японии эволюционируют значительно быстрее, чем большие континентальные популяции *D. littoralis*.

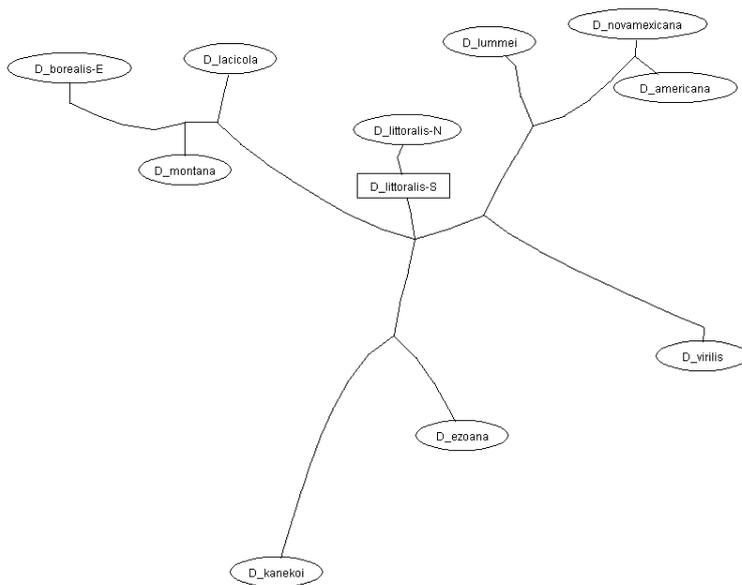


Рисунок 11. Медианная сеть гаплотипов Y-хромосомы дрозофил группы *virilis*, построенная с помощью программы TCS (Clement et al., 2000).

Реконструкция основана на нуклеотидном полиморфизме фрагмента гена *kl-2* (GenBank ID: KF600714 – KF600726). Длины ветвей пропорциональны минимальному числу нуклеотидных замен, являющихся необходимыми для трансформации одного гаплотипа в другой. Если гаплотипы синонимичны, то указывается лишь один из них.

Различий между последовательностями *kl-2* у разных лабораторных линий *D. virilis* не было выявлено. Это не удивительно, поскольку *D. virilis* представляет собой почти мономорфный вид (Miro1 et al., 2008). Напротив, последовательности *kl-2* двух линий *D. littoralis* из южно-кавказской популяции и из североевропейской популяции (Andrianov et al., 2010) отличаются. Южная популяция является предковой по отношению к северной популяции. Эти данные поддерживают сделанное ранее заключение о том, что южная популяция *D. littoralis* представляет собой отдельный вид – *D. imeretensis*.

Также не было обнаружено различий между последовательностями *kl-2* *D. borealis* East population и *D. flavomontana*. Линии мух из *D. borealis* West

population были для нас недоступны. *D. borealis* включает в себя две разных формы: East population и West population. *D. borealis* East population является более близким родственником *D. flavomontana*, чем *D. borealis* West population (Morales-Hojas et al., 2011). Полученные данные позволяют предположить гибридное происхождение *D. borealis* East population. Эта форма может быть результатом гибридизации самца *D. flavomontana* с самкой *D. borealis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Псевдогены митохондриального происхождения, маркированные инсерцией ретротранспозона *Tv1*, выявлены у *D. virilis*, *D. montana* и *D. laticola*. Все эти митохондриальные псевдогены менее сходны между собой, чем с предковой митохондриальной последовательностью гена своего вида. Согласно современным данным систематики (Morales-Hojas et al., 2011), формирование вида *D. virilis* и общего предка *D. montana* и *D. laticola* от других видов группы происходило в миоцене: *D. virilis* – 4.1 млн. лет, *D. montana* и *D. laticola* – 4.9 млн лет. Следовательно, возраст выявленных псевдогенов митохондриального происхождения не может быть больше этих цифр. Есть основания предполагать что он им равен, так как массовые перемещения ретротранспозонов обычно маркируют события видообразования (Sverdlov 2000; Evgen'ev et al., 2000). Если принять эти допущения, скорость накопления нуклеотидных замещений в митохондриальных псевдогенах равна 1.5% за миллион лет, что больше чем для соответствующих митохондриальных генов. Сравнительный анализ данных представленных на **рисунке 8** также приводит к выводу о большей скорости накопления нуклеотидных замен в псевдогенах митохондриального происхождения в сравнении с соответствующим митохондриальным геном. В геноме *D. virilis* помимо древних форм псевдогенов митохондриального происхождения, некоторые представители которых маркированы инсерциями *Tv1*, существует ещё одна группа митохондриальных псевдогенов более недавнего происхождения, но уже без ассоциированных инсерций *Tv1*. Можно заключить, что фиксация инсерций *Tv1* происходит редко. Наличие свободных сайтов интеграции для ретротранспозона *Tv1* не лимитирует транспозиций *Tv1*. Стабильность генома мух резко контрастирует с геномом клеток пересеваемой культуры, в котором обнаруживается множество новых событий образования митохондриальных псевдогенов и массовая транспозиция *Tv1* в возникшие сайты интеграции. Интересно, что несмотря на наличие подходящих сайтов интеграции у старых копий псевдогенов митохондриального происхождения, инсерции *Tv1* проходят почти исключительно в новые сайты. Нам удалось детектировать только два случая инсерции *Tv1* в сайт вблизи старой копии *cox3* псевдогена митохондриального происхождения. Причины такой избирательности в настоящее время неизвестны. Для дальнейших исследований перспективным представляется изучение связи между образованием митохондриальных псевдогенов и трансформацией первичной культуры в пересеваемую. Сами по себе стрессовые условия в культуре клеток, вероятно, не приводят к возникновению новых псевдогенов митохондриального

происхождения. В наших экспериментах длительное, до года, существование первичной культуры с сохранением признаков дифференцировки у клеток, не приводит к возникновению новых митохондриальных псевдогенов, маркированных инсерциями *Tv1*.

С целью доказать потерю Y-хромосомы в трансформированной клеточной линии, мы выбрали и тестировали ген *kl-2 1-beta dynein heavy chain* в клеточной культуре и в геномах 12 видов дрозофил, образующих группу *virilis*. Помимо успешного решения поставленной задачи, выяснилось, что данный ген идеально подходит для реконструкции филогений у дрозофил. Универсальность одних и тех же праймеров для разных видов, чистота полученного ПЦР продукта, позволяющая секвенирование без клонирования и даже без очистки фрагмента ДНК, и удобный размер нуклеотидной изменчивости между видами дрозофил, делает этот ген перспективным дополнением Barcode видовой диагностики дрозофил.

ВЫВОДЫ

1. В геноме мух *D. virilis* обнаружен *atp6* псевдоген митохондриального происхождения локализованный в Y-хромосоме, идентичный у всех изученных линий мух *D. virilis* из природных популяций. Псевдогены митохондриального происхождения, маркированные инсерцией ретротранспозона *Tv1*, выявлены у *D. virilis*, *D. montana* и *D. lacicola*.
2. В пересеваемой клеточной культуре *D. virilis* возникли новые копии псевдогенов митохондриального происхождения, гомологичные генам *atp6* и *cox3*, в ассоциации с ретротранспозоном *Tv1* в прямой и обратной ориентациях. Вследствие утраты Y-хромосомы клеточной культурой в ходе культивирования, *atp6* псевдоген митохондриального происхождения, характерный для генома мух, в культуре клеток отсутствует.
3. Новые инсерции ретротранспозона *Tv1* в пересеваемой клеточной культуре маркируют не только недавно возникшие *atp6* и *cox3* псевдогены митохондриального происхождения, но и аналогичные более старые псевдогены митохондриального происхождения, общие у мух и у клеток пересеваемой культуры. В геноме мух эти псевдогены митохондриального происхождения не ассоциированы с ретротранспозоном *Tv1*.
4. Филогенетический анализ инсерций ретротранспозона *Tv1* в псевдогены митохондриального происхождения выявил два функционально активных подсемейства ретротранспозонов *Tv1*.
5. Последовательность гена *kl-2 1-beta dynein heavy chain* Y-хромосомы является удобным маркером для филогенетических реконструкций. Построенная на его основе филогения дрозофил группы *virilis* позволила уточнить порядок филиации в группе. *D. kanekoi* и *D. ezoana* образуют один кластер, *D. littoralis* имеет более древнее происхождение. Последовательности гена *kl-2* двух линий *D. littoralis* из южно-кавказской

популяции и из североевропейской популяции отличаются, что подтверждает предположение о том, что южная популяция *D. littoralis* представляет собой подвид *D. littoralis* – *D.littoralis imeretensis*.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1* . Романов, Д. А. Митохондриальные последовательности в ядерном геноме животных / Д. А. Романов, Б. В. Андрианов // Успехи современной биологии. – 2013. – Т. 133. – № 3. – С. 254–268.

(Romanov, D. A. Studies of Mitochondrial Sequences in the Nuclear Genome of Animals / D. A. Romanov, B. V. Andrianov // Biology Bulletin Reviews. – 2013. – Vol. 3. – No. 6. – P. 439–450.)

2* . Андрианов, Б. В. Перенос митохондриальной ДНК в ядерный геном клеток пересеваемой клеточной линии *Drosophila virilis* / Б. В. Андрианов, Д. А. Романов, Т. В. Горелова, С. Ю. Сорокина, И. А. Захаров-Гезехус // Генетика. – 2013. – Т. 49. – № 6. – С. 788–792.

(Andrianov, B. V. Transfer of Mitochondrial DNA to Nuclear Genome of Cells of Passaged Cell Line of *Drosophila virilis* / B. V. Andrianov, D. A. Romanov, T. V. Gorelova, S. Yu. Sorokina, I. A. Zakharov-Gezekhus // Russian Journal of Genetics. – 2013. – Vol. 49. – No. 6. – P. 685–689.)

3. Sorokina, S. Y. Transfer of mitochondrial DNA fragments into the nuclear genome in flies and cell line of *D.virilis* / S. Y. Sorokina, D. A. Romanov, B. V. Andrianov, I. A. Zakharov // 54th Annual *Drosophila* Research Conference Washington, DC. – April 3-7. – 2013. – P.168. – 525C.

4. Романов, Д. А. Изучение полиморфизма фрагментов митохондриальной ДНК в ядерном геноме *Drosophila virilis* / Д. А. Романов, Т. В. Горелова, С. Ю. Сорокина, Б. В. Андрианов // Актуальные проблемы биологической и химической экологии. – сб. М.: Изда-во МГОУ. – 2012. – С.57-59.

5. Sorokina, S. Y. Intraspecific structure of *D. littoralis* Meigen (Diptera: Drosophilidae) / S. Y. Sorokina, B. V. Andrianov, D. A. Romanov, P. A. Proshakov, V. G. Mitrofanov // 53rd Annual *Drosophila* Research Conference. – Chicago, IL. – March 7 – March 11. – 2012. – P. 270. – 518B.

Публикации, отмеченные (*) опубликованы в журналах, соответствующих перечню ВАК.