

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ**

На правах рукописи

УДК 577.218; 576.89

**Галактионов
Николай Кириллович**

**Транспозон *hemar1*: организация в геноме
и роль в формировании генетического разнообразия партенит и церкарий
трематоды
Himasthla elongata (Trematoda, Echinostomatidae).**

03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук
О.И. Подгорная

**Санкт-Петербург
2015**

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список используемых сокращений	4
Определения принятые в диссертации	5
Введение	6
Цели и задачи исследования	9
Основные положения, выносимые на защиту	11
Научная новизна работы	11
Теоретическое и практическое значение работы	12
Апробация работы	12
Вклад автора.....	13
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
Мобильные элементы генома	14
Класс I – ретроэлементы	16
Класс II – ДНК- транспозоны.....	19
Транспозон <i>mariner</i>	23
Модельный объект исследования — <i>Himasthla elongata</i> (Trematoda, Echinostomatidae).....	33
Методы определения генетического полиморфизма	37
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
Сбор и первичная обработка материала	40
Выделение геномной ДНК	40
Выделение РНК.	42
Полимеразная Цепная Реакция (ПЦР).	42
ПЦР совмещенная с обратной транскрипцией	44
Клонирование и секвенирование.	44
Введение меченых нуклеотидов в последовательности ДНК	45
Гибридизация по Саузерну, дот-блот гибридизация.	45

Получение препаратов ядер и определение размера генома <i>H. elongata</i>	46
Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH)	46
Электрофорез	47
AFLP и TID.....	48
Компьютерные методы исследований	49
Статистическая обработка результатов AFLP.....	49
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	50
Выявление представителя семейства транспозонов <i>mariner</i> в геноме <i>Himasthla elongata</i>	50
<i>HemarI</i> -подобные транспозоны в геномах эукариот	61
Вариабельность геномов партенит и церкарий <i>H. elongata</i> и использование транспозона <i>HemarI</i> для ее выявления.....	64
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ	72
Субсемейство элемента <i>hemarI</i>	72
Горизонтальный перенос на основе <i>mariner</i>	74
Векторы на основе транспозонов	77
Транспозоны внутри генома и связь с типом размножения.....	79
Клональная изменчивость партенит	82
ВЫВОДЫ.....	85
Цитированная литература	86
Благодарности	100
Приложение 1	101
Приложение 2	103
Приложение 3	104

Список используемых сокращений

п.н. – пар нуклеотидов;

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ЭДТА - этилендиамин тетраацетат натрия;

аа - amino acid residues, аминокислотные остатки

DAPI (4,6-diamidinophenylindole) – 4,6-диамидофенилиндол;

FISH (fluorescence *in situ* hybridization) – флуоресцентная гибридизация *in situ*;

SDS (sodium dodecylsulfate) – додецилсульфат натрия.

ORF (open reading frame) – открытая рамка считывания

МЭ – мобильные элементы;

MLE – *mariner* like elements;

TLE – Tc1 like elements;

LTR – long terminal repeats;

NLS - nuclear localization signal;

EDTA - этилендиамин тетраацетат;

TE – буфер трис-EDTA;

TAE – буфер трис-ацетат.

LINE – Long Interspread Nucleotide Elements

SINE – Short Interspread Nucleotide Elements

ORF – Open Reading Frame

NGS – New Generation Sequencing

ITR – Inverted terminal repeats

RAPD – Random Amplifying Polymorphic DNA

RFPL – Restriction Fragments Length Polymorphism

S-SAP – Sequence- Specific Amplification Polymorphism

AFLP – Amplification Fragments Length Polymorphism

TID – Transposon Insertion Display

CTAB – hexadecyltrimethylammonium bromide

Определения принятые в диссертации

Мономирацидийное заражение — заражение хозяина одной особью мирацидия.

Клон — совокупность партенит (редий) и церкарий – отпрысков одного мирацидия, паразитирующих в одном моллюске-хозяине.

Клональная изменчивость — изменчивость отдельных особей партенит (редий) и церкарий одного клона, выражающаяся в различном успехе заражения второго промежуточного хозяина, различных поведенческих реакциях (в случае церкарий) и генетическом полиморфизме.

Внутриредийная изменчивость — изменчивость отдельных особей церкарий внутри одной редии.

Введение

Развитие методов секвенирования ДНК и расшифровка множества геномов позволило оценить разнообразие последовательностей генома. Первыми из эукариот реализованы проекты по секвенированию генома человека (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; 2004) и мыши (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2003), и до сих пор они остаются самыми полными. Секвенирование нового поколения (NGS – new generation sequencing), благодаря высокой производительности и относительной дешевизне, позволило массово секвенировать геномы любых размеров. Сегодня секвенировано более 6800 геномов эукариот (WCMB-2013), а изучение состава и организации последовательностей генома стало одной из центральных задач биологии.

Подавляющее большинство геномов эукариот содержит 1 – 5% белок-кодирующих последовательностей (генов), до ~15%, включая их интроны и регуляторные элементы; остальной массив ядерной ДНК представлен повторенными последовательностями, присутствующими как в эухроматиновых, так и в гетерохроматиновых районах хромосом (Maher, 2012).

Повторенные последовательности разделяют по структуре и организации в геноме на тандемные и диспергированные. Диспергированные повторы или мобильные элементы (TE, transposable elements) – расположенные по всему геному последовательности, способные к самостоятельному перемещению. Основываясь на возможном способе перемещения TE разделяют на два типа (Kazazian, 2011). Первый тип – ретроэлементы, перемещающиеся через обратную транскрипцию РНК интермедиата. Среди них как LTR (long terminal repeat), чье происхождение можно проследить от ретровирусов (Stocking, Kozak, 2008), так и наиболее многочисленные, не содержащие LTR – SINE и LINE. Второй класс — ДНК-транспозоны — происходят от вставных последовательностей (IS – inserted sequences) прокариот, перемещаясь в геноме они используют механизм вырезать–вставить (cut and paste) (Kazazian, 2011).

ДНК-транспозоны находят в геномах практически всех изученных эукариот. Их последовательности часто переменны, но общими чертами служит

наличие (1) домена кодирующего транспозазу – фермента, участвующего в перемещении элемента, и (2) инвертированных концевых повторов (ITR – inverted terminal repeats), обеспечивающих интеграцию элемента в матричную ДНК при транспозиции. Количество транспозонов в геномах разнится в широких пределах и в среднем составляет 3–15% (Feschotte, Pritham, 2007).

Однозначного представления о значении ДНК-транспозонов для генома до сих пор не сформировано. Известно, что подавляющее большинство последовательностей ДНК-транспозонов в геномах повреждено и они не способны к перемещению (Watanabe, Maekawa, 2013). Редкие активные копии ДНК-транспозонов могут служить мутаторами, внося своим перемещением и встраиванием модификации в экспрессию близлежащих генов (Jacobson et al., 1986; Watanabe, Maekawa, 2013), вызывать перестройки участков хроматина (Helitron), выступая, таким образом, факторами нестабильности генома (Bonchev, Parisod, 2013). Сами последовательности ДНК-транспозонов могут выступать как регуляторы экспрессии гена, представляя собой “подвижные мишени” для микро РНК, что приводит к гетерохроматинизации участков хроматина и/или модуляции экспрессии кодирующих последовательностей (Abrusan, Krambeck, 2006).

Само присутствие дисперсно распределенных высоко-гомологичных последовательностей служит фактором дестабилизации генома. Так сайт-специфическая рекомбинация IS элементов прокариот обеспечивает им генетическое разнообразие при делении (Martin et al., 1992; Brueckner et al., 2004). Конструкция высокоэффективного вектора *Sleeping Beauty* на основе генетически-модифицированного гомолога транспозона *mariner* доказывает возможность рекомбинации между копиями транспозонов эукариот (Ivitz, 2001).

Транспозон *mariner*, входящий в состав суперсемейства ДНК транспозонов *Tc1/mariner/IS630*, находят у представителей всех групп эукариот. Он является самым универсальным и максимально изученным представителем класса ДНК-транспозонов. Последовательности *mariner* разделяют на 11 подсемейств, представители которых названы *mariner*-подобными элементами (MLE, *mariner*-

like elements). Размеры MLE могут варьировать от 0.9 до 2.5 т.п.н. Транспозон включает в себя открытую рамку считывания, кодирующую транспозазу и ограниченную 5'- и 3'-нетранслируемыми последовательностями (UTR — untranslated region), несущими по концам ITR, фланкированные прямыми повторами, представленными динуклеотидом TA (Рис. 12). Количество копий *mariner* в геномах варьирует от десятков до сотен тысяч, занимая 0.003—9% генома (Robertson, Lampe, 1995b).

Некоторые MLE, принадлежащие геномам филогенетически удаленных животных, имеют необычно высокую (>97%) степень сходства. Это стало основанием для выдвижения гипотезы о горизонтальном переносе транспозона *mariner* (Yoshiyama et al., 1995). Кажется, что возможность для горизонтального переноса повышается, когда организмы донора и реципиента находятся в непосредственном контакте друг с другом, как в случае паразитизма (Yoshiyama et al., 2001).

Подавляющее большинство копий *mariner* утратили способность к перемещению, однако известны активные копии, среди которых *Mos1*, перемещение которого в геноме *Drosophila mauritiana* имеет фенотипические проявления (Robertson et al., 1997). Предполагается также, что копии *mariner* стали факторами вариабельности геномов коловраток подкласса Bdelloidea, размножающихся исключительно путем апомиктического партеногенеза (Arkhipova, Meselson, 2001). Нельзя исключить, что именно гомология копий *mariner* провоцирует успешную рекомбинацию между ними.

Для выявления внутривидового генетического разнообразия разработан ряд подходов, основанных на анализе фрагментов геномной ДНК. Метод AFLP (amplified fragment length polymorphism) успешно используют для анализа генетического разнообразия гибридов высших растений (Vos et al., 1995). На основании метода AFLP разработана серия методов, в которых учитывают известные последовательности транспозонов. Один из подходов — TID (transposon insertion display) позволяет изучить вариабельность распределения практически

любого TE в геноме и кажется наиболее перспективным для изучения генетической вариабельности (van Luenen, Plasterk, 1996).

Модельная система, представленная паразитом и кругом его хозяев, кажется перспективной для исследования вклада транспозонов семейства *mariner* в формирование вариабельности генома в случае, когда паразит размножается бесполым или партеногенетическим путем. Эта модель также перспективна для проверки возможности горизонтального переноса между геномами эукариот, принадлежащих филогенетически удаленным таксонам.

Подходящей группой организмов для выполнения такого исследования могут служить паразитические плоские черви – трематоды, имеющие в своем сложном жизненном цикле обязательные стадии, размножающиеся исключительно путем партеногенеза.

В качестве модели использовали вид *Himasthla elongata* (Trematoda, Echinostomatidae), жизненный цикл которого реализуется в прибрежных экосистемах северных морей и проходит со сменой животных-хозяев и чередованием гермафродитного и партеногенетического размножения на разных стадиях (см. Рис. 5, 6). Показано, что, несмотря на партеногенетическое размножение, отпрыски партенит (редий) – церкарии обладают существенной вариабельностью, выражающейся как в реакциях проникновения в следующего промежуточного хозяина, так и успешности ухода от систем защиты хозяина (Levakin et al., 2013). Модель позволяет изучить как внутригеномную роль *mariner*, так и возможность его горизонтального переноса в кругу хозяев трематоды.

Цели и задачи исследования

Цель настоящего исследования заключалась в определении последовательности транспозона *mariner* в геноме *Himasthla elongata* (Trematoda; Echinostomatidae) и определении его роли в формировании генетической вариабельности партеногенетического потомства (редий и

церкарий). Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **задачи**:

1. Выявить и охарактеризовать транспозон *mariner* в геноме *H. elongata*;
2. Установить наличие или отсутствие генетической природы variability клонов партенит и церкарий *H. elongata* методом AFLP;
3. Проверить возможность использования элемента *mariner* как маркера генетической изменчивости (в случае ее обнаружения) клонов редий и церкарий исследуемого вида трематод;
4. Оценить роль транспозона *mariner* в формировании нестабильности генома клонов редий и церкарий *H. elongata*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В геноме *H. elongata* впервые выявлен и изучен транспозон *hemarI*, принадлежащий к классу ДНК транспозонов *mariner*, подклассу *capitata*. *HemarI* насчитывает приблизительно сто копий, дисперсно распределенных в геноме. Определены последовательности трех копий *hemarI*.
2. Геномы окончательного и промежуточных хозяев *H. elongata* не содержат сходных с *hemarI* последовательностей *mariner*.
3. Метод AFLP позволил выявить генетическую природу клональной изменчивости партенит и церкарий *H. elongata*. Так среди церкарий, изолированных из одного клона, наблюдается полиморфизм зон разделения продуктов AFLP.
4. Использование праймера, специфического *hemarI* для постановки реакции TID, позволяет различать полиморфизм генотипов партенит и церкарий внутри одного клона. Повышенная гетерогенность зон амплификатов по сравнению с AFLP дает основание предположить, что транспозон *hemarI* вносит вклад в формирование генетической основы клональной изменчивости партенит и церкарий *H. elongata*.

Научная новизна работы

1. Впервые клонирован полноразмерный транспозон *mariner* трематоды *H. elongata* и выполнен его комплексный анализ, включающий характеристику распределения в геноме, определение сходных последовательностей в геномах хозяев, компьютерное сравнение со сходными последовательностями из баз данных.
2. Впервые определены концевые последовательности представителя подсемейства *capitata* семейства транспозонов *mariner*.
3. Впервые двумя методами (AFLP и TID) установлена клональная

генетическая изменчивость партенит и церкарий *H. elongata*.

Теоретическое и практическое значение работы

Многие виды трематод служат причиной тяжелых заболеваний человека и животных. Вызываемый представителями рода *Schistosoma* шистосоматоз классифицируется как одно из наиболее серьезных паразитарных заболеваний, от которого в мире страдает более 200 миллионов человек (Day, Botros, 2001). Использование ДНК-маркеров позволило установить существование индивидуальной изменчивости клонов партенит шистосом и ряда других видов трематод. Генетическая вариабельность паразитов увеличивает шанс на успешную инвазию хозяина и затрудняет разработку медикаментозных препаратов (William et al., 2006) против патогенных видов трематод, что делает определение механизма их генетической изменчивости весьма актуальным. В настоящей работе клонированный MLE послужил основой для выявления клональной изменчивости. Дальнейшее определение конкретных последовательностей ДНК, служащих полиморфными маркерами, и определение роли ТЕ в формировании клональной изменчивости при партеногенезе может стать основой для разработки новых методов лечения паразитарных заболеваний.

Материалы диссертации используются в курсах лекций для бакалавров и магистров Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета и могут быть использованы в общих и специальных курсах лекций биологических факультетов других университетов.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 5 статей в российских и международных рецензируемых журналах. Основные положения представлены и обсуждены на VII, VIII, IX, X, XI и XII Научных сессиях Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета (2006—2011); IV Всероссийском съезде Паразитологического общества при РАН

«Паразитология в XXI веке — проблемы, методы, решения» (2008); Международной конференции Морской биологической станции Зоологического института РАН (2007); на II Съезде Общества клеточной биологии и Юбилейной конференции, посвященной 50-летию ИНЦ РАН (2007); Международном молодежном научном форуме "Ломоносов" (2008); XII и XVI международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых «Биология — наука XXI века» (2008, 2012); Третьем Симпозиуме Скандинавско-Балтийского Паразитологического общества (2009); X Европейском мультиколлоквиуме по паразитологии (2008); II конференции Американского общества микробиологов «Мобильная ДНК» (2010).

Вклад автора

Результаты, включенные в работу, получены лично автором. Материалы, вошедшие в диссертацию, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Мобильные элементы генома

Геномы позвоночных насчитывают около 30000 генов, предсказанных как белок-кодирующие последовательности (гены), что составляет от 1–5% от всего массива ДНК в геноме и до ~15% включая интроны I-ого типа — не транскрибируемые, либо не транслируемые регуляторные элементы (Maher, 2012; Frazer, 2012) (Табл. 1). Остальной же массив ядерной ДНК представлен повторенными последовательностями, присутствующими как в эухроматиновых так и в гетерохроматиновых районах хромосом (Lander et al. 2001).

Таблица 1. Основные типы последовательностей генома (по Галактионов, Подгорная 2009)

Последовательности генома (Genome sequences)		
Тип последовательности (Sequence type)	Класс последовательности (Sequence class)	% от генома (% of the genome)
Гены (Genes)	Гены + интроны и регуляторные последовательности (Genes + introns & regulatory sequences)	±5%
	Тандемные (Tandem)	Сателлитная ДНК (Satellite DNA) ~30%
Повторы (Repeats)		Теломеры (Telomeres)
		ДНК транспозоны (DNA transposons) ~3% - 5%.
	Диспергированные (Dispersed)	Ретротранспозоны (Retrotransposons) ~40%

Повторенные последовательности генома, а также псевдогены, долгое время относили к «мусорной» ДНК («junk» DNA) (Doolittle, Sapiensa, 1980; Manuelidis, 1990; Doolittle, 2013), считая ее массивом ДНК, накопленной геномом вследствие мутационного процесса и не имеющей какой-либо функции в геноме (Graur D, 2015). Обнаружение транскриптов повторенных последовательностей

(Enukashvily et al., 2007, 2009; Bleykasten-Grosshans, Neuvéglise, 2011), выявление в их составе регуляторных участков (Furano, 2000; Enukashvily, Ponomartsev, 2013) и ORF (Griffiths et al., 2000) позволило предположить, что повторенные последовательности служат важными регуляторными элементами генома (de Souza et al., 2013).

На основании особенностей организации в геноме повторенные последовательности разделяют на тандемно организованные высокоповторяющиеся последовательности — сателлитные ДНК и рассеянные по геному диспергированные повторы (Wicker et al., 2005; Elgar, Vavouri, 2008; López-Flores, Garrido-Ramos, 2012).

Молекулярная и геномная организация МЭ

В 1950 г. американский генетик Барбара МакКлинток (McClintock, 1950) открыла существование локуса, который вызывал увеличение частоты хромосомных перестроек у кукурузы, а у потомков от скрещивания, в котором оба родителя несли такие перестройки, появились нестабильные мутации с очень высокой частотой. Дальнейшие исследования показали, что причиной возникновения таких мутаций служат «контролирующие элементы», способные перемещаться в геноме. Встраивание подобного элемента в какой-либо участок в геноме влияет на активацию близлежащих генов, утрата же элемента, способна стабилизировать прежде мутантный локус (McClintock, 1956).

Такие последовательности, получившие название мобильные элементы, в дальнейшем обнаружены во всех группах прокариотических и эукариотических организмов (Federoff, 1994; Feschotte, Pritham 2007).

Мобильные элементы (МЭ) или транспозоны — это фрагменты ДНК, способные перемещаться в геноме эукариот, используя различные механизмы транспозиции (перемещения) (McClintock, 1950). Последовательности транспозонов мультикопийны, а их копии диспергированы в геноме и присутствуют как в эухроматиновых так и в гетерохроматиновых районах хромосом (Jurka et al., 2007). Все диспергированные повторы объединяют в

интроны II-ого типа (Micel et al., 1989; Belfort et al., 1995), различные представители которых могут составлять до 50% последовательностей генома эукариот (López-Flores, Garrido-Ramos, 2012; Janicki et al., 2011; Wickstead et al., 2003). Структурная организация и механизмы перемещения МЭ весьма разнообразны, однако общность происхождения позволяет разделить их последовательности на два класса: Класс I – ретроэлементы и Класс II – ДНК-транспозоны (Жимулев, 2007).

Класс I – ретроэлементы

Основываясь на молекулярной организации, *ретроэлементы* разделяют на ретротранспозоны и ретропозоны. По своей структуре *ретротранспозоны* сходны с провирусами ретровирусов (Рис. 1) (Capu et al., 1998; Lander et al., 2001). Как и ретровирусы, ретротранспозоны состоят из кодирующей части, имеющей в разных случаях от одной до трех (иногда более) ORF, соответствующих белкам gag, pol и env (Feng et al., 1996; Moran et al., 1996). Последовательности ретротранспозонов фланкированы по концам длинными, до нескольких сотен нуклеотидов, концевыми повторами — LTR (long terminal repeats – длинными концевыми повторами), необходимыми для перемещения элемента в геноме. Эти повторы, обычно, не содержат длинных ORF, но обладают промотором и различными регуляторными последовательностями, которые влияют на уровень транскрипции (Furano et al., 1988; Swergold, 1990; DeBerardinis, Kazazian, 1999).

Элементы семейства LINE (long interspersed nuclear elements), служащие типичными представителями ретропозонов, не имеют концевых повторов (Рис. 1). В геноме человека насчитывается более 500 000 копий ретропозона LINE (Lander et al., 2001; Waterston et al., 2002; Gibbs et al., 2004). Внутренние районы LINE1 ретропозона крысы обычно кодируют два белка: p120 служит обратной транскриптазой (Feng et al., 1996; Moran et al., 1996). Второй белок – p40 (Martin et al., 2003), ускоряет ассоциацию РНК-интермедиата транспозиции и ДНК-мишени при интеграции (Dawson et al. 1997; Mathias et al., 1991; Feng et al., 1996; Moran et

al., 1996; Kulpa, Moran, 2006; Федоров, 2008). Длина ретротранспозонов одного и того же семейства варьирует в широких пределах, поскольку 5' конец часто бывает усечен. Известно около 20 семейств элементов этой группы: *F*, *G*, *Dos*, *jockey*, *Helena*, *BS*, *Het-A*, *TART* и *R2* у дрозофилы; *L1* у млекопитающих; *ingi* у трипаносомы и *sin4* у кукурузы и многие другие (Coffin JM et al., 1997, стр.: 162–231). И ретротранспозоны, и ретропозоны перемещаются в геноме с помощью механизма обратной транскрипции посредством РНК-интермедиата, по принципу “копировать–вставить” (Brown, 2002). Такое «самокопирование» позволяет ретроэлементам мультиплицироваться в геноме при перемещении. Неконтролируемое перемещение элементов LINE1 может приводить к дестабилизации генома (Bourc’his, Bestor, 2004) и малигнизации клеток (Yoder et al, 1997; Havecker et al., 2004; Robart, Zimmerly, 2005; Eickbush, Jamburuthugoda, 2008).

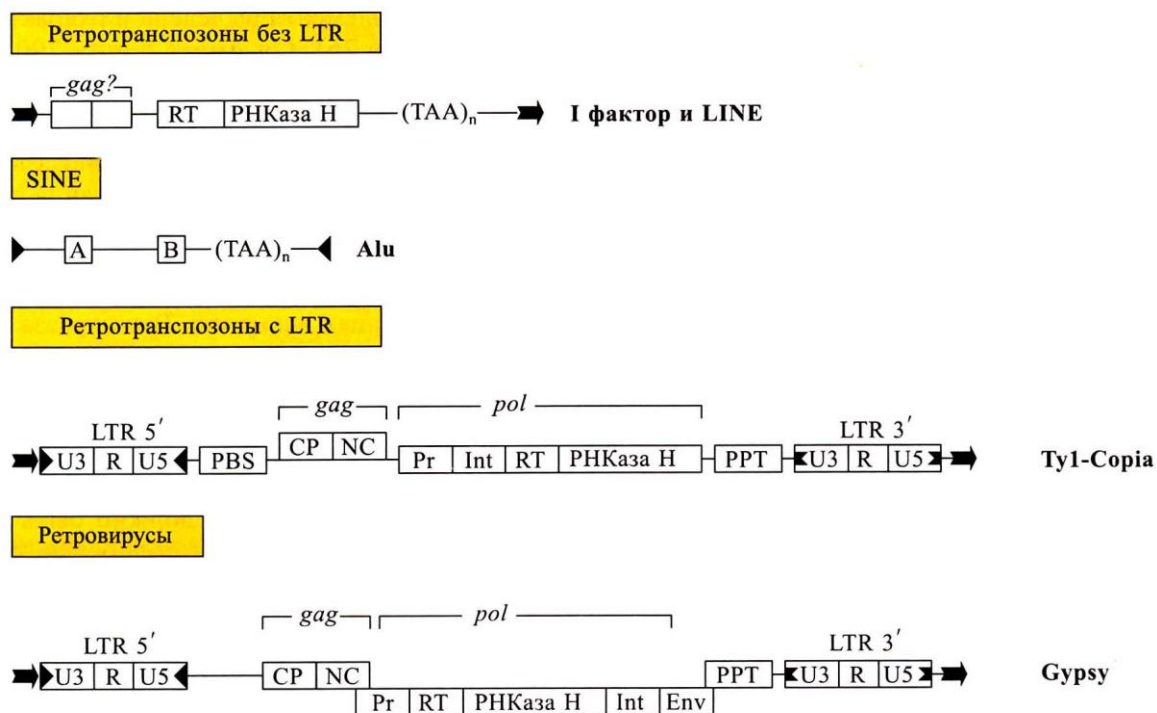


Рисунок 1. Молекулярная организация ретроэлементов (с изменениями по Fedoroff, 2001).

Gag – capsid-related retrotranspon-related proteins; **CP** – cysteine protease; **NC** – нуклеокапсид; **pol** – DNA polymerase catalytic subunit; **Pr** – protease; **Int** – интеграз; **RT** – обратная транскриптаза; **РНКаза H** – Ribonuclease H recognises and cleaves the RNA strand of RNA-DNA heteroduplexes; **PBS** – primer binding site; **PPT** - protein phosphatase; **Env** – основной белок капсида; **U3, U5** – 5' и 3' уникальные последовательности

Среди ретроэлементов, встречаются как автономные, способные к самостоятельной ретротранспозиции, так и не автономные элементы, способные к перемещению только будучи рекрутированными активным ретроэлементом, либо репликативно (Havemaker et al., 2004). Ярким примером последовательной активации и инактивации ретроэлементов служат ретропозоны LINE (автономный) и Alu (не автономный) (Dewannieux et al., 2003), чьи последовательности составляют ~ 30% генома *H. sapiens*. X-хромосомы же оказались на ~ 90% обогащены последовательностями этих ретроэлементов. Полиморфизм распределения этих последовательностей на 1-й и 2-й X-хромосоме позволил установить, что ген *Xist* на инактивированной хромосоме фланкирован полем LINE как с 5', так и 3' концов, в то время как на активной хромосоме такого поля не наблюдали. Обогащенность интронов гена *Xist* последовательностями Alu

варьирует у представителей *H. sapiens* и не наследуется в чреде поколений (Lyon, 1995; Kay, 1998; Wutz, Gribnau, 2007; Watanabe, Maekawa, 2013).

Класс II – ДНК- транспозоны

ДНК-транспозоны представляют собой мобильные элементы, перемещающиеся в геноме без участия РНК-интермедиата. Основываясь на молекулярной организации и механизме перемещения, ДНК-транспозоны разделяют на три подкласса: (i) элементы, перемещающиеся используя механизм «вырезать–вставить» и транспонирующиеся в виде двуцепочечной ДНК (Craig et al., 2005); (ii) элементы типа Helitron, реплицирующиеся по типу «катящегося кольца» (Kapitonov, Jurka, 2001); (iii) элементы типа *Maverick* кодируют ДНК-полимеразу и, по всей видимости, способны реплицировать свои копии, однако механизм их перемещения пока не изучен (Pritham et al., 2007) (рис. 2). Ряд исследователей (Hellen, Brookfield, 2013; Ray et al., 2007) выделяют ii и iii подклассы транспозонов в два отдельных класса, однако общность происхождения от последовательностей прокариот (Hickey, 1992; Werren, 2011; Alzohairy et al., 2013) и перемещение без участия РНК-интермедиата дают основание объединить ДНК-транспозоны в один класс (Fedoroff, 2001).

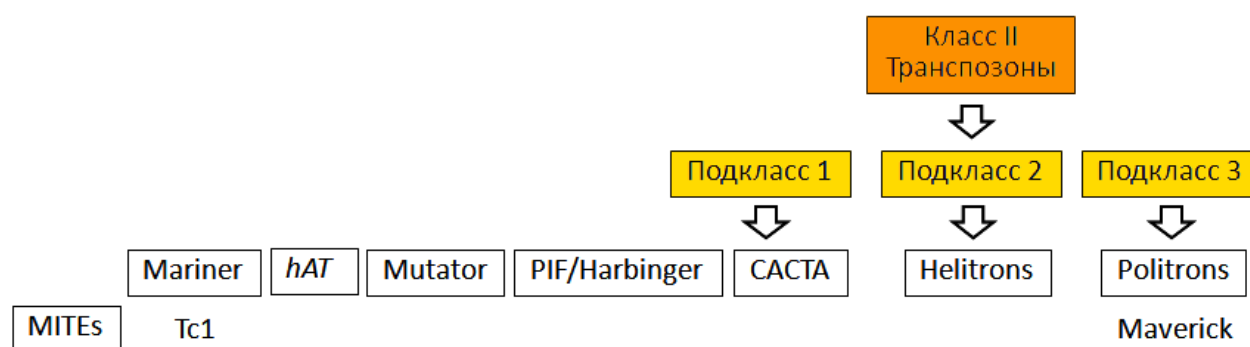


Рисунок 2. Классификация ДНК–транспозонов. С изменениями по Fedoroff, 2001

ДНК-транспозоны долгое время оставались вне поля зрения функциональной геномики (Deininger et al., 2003). Связано это с их меньшим,

относительно ретроэлементов, количеством в геноме (~ 0.05 —10%) и с тем, что большинство ДНК-транспозонов инактивированы под действием мутационного процесса (Robertson, Zuppano, 1997; Hartl et al., 1997; Lampe et al., 1998) и не способны к перемещению. В геномах эукариот обнаружены и активные копии элементов – представителей разных подклассов, способные (Medhora et al., 1991; Frøkjær-Jensen et al., 2014; Kapitanov, Jurka, 2001; Pritham, Feschotte, 2007; Pritham et al., 2007) или потенциально способные (Muñoz-López et al., 2008) к перемещению в геноме (рис. 3).

ДНК-транспозоны выявлены в геномах практически всех про- и эукариот (Pritham, Feschotte, 2007). Известны организмы, геномы которых не несут ретротранспозонов, но содержат ДНК-транспозоны (Arkhipova, Messelson, 2005). При этом многие транспозоны кодируют все необходимое для собственного перемещения. Исследования ДНК транспозонов выявили спорадичность их распределения среди таксонов эукариот, причем у близких видов могут доминировать разные типы транспозонов (Kapitonov, Jurka 2008).

Как и в случае ретроэлементов, среди ДНК-транспозонов выявлены автономные и не автономные последовательности (рис. 3) (Maksakova et al., 2009; Lazarow et al., 2013) и, несмотря на разницу в организации и способах транспозиции, перемещение не автономных копий транспозонов происходит так же как у ретроэлементов с рекрутированием неавтономной копии автономным элементом (Fujino, Sekiguchi, 2011). Автономные транспозоны (Рис. 4) характеризуются наличием фланкирующих элемент коротких инвертированных повторов – ITR (Inverted Terminal Repeats) и присутствием одной открытой рамки считывания, кодирующей транспозазу, – фермент, осуществляющий их перемещение. Неавтономные транспозоны, напротив, не кодируют собственного каталитического фермента. Несмотря на то, что большинство самых распространенных классов транспозонов автономны, подавляющее количество их копий инактивировано под действием мутационного процесса. Примером перемещения не активных элементов служит система транспозонов Ac/Ds, чье

перемещение и взаимодействие индуцирует полиморфизм окраски семян кукурузы (Jones, 2005).

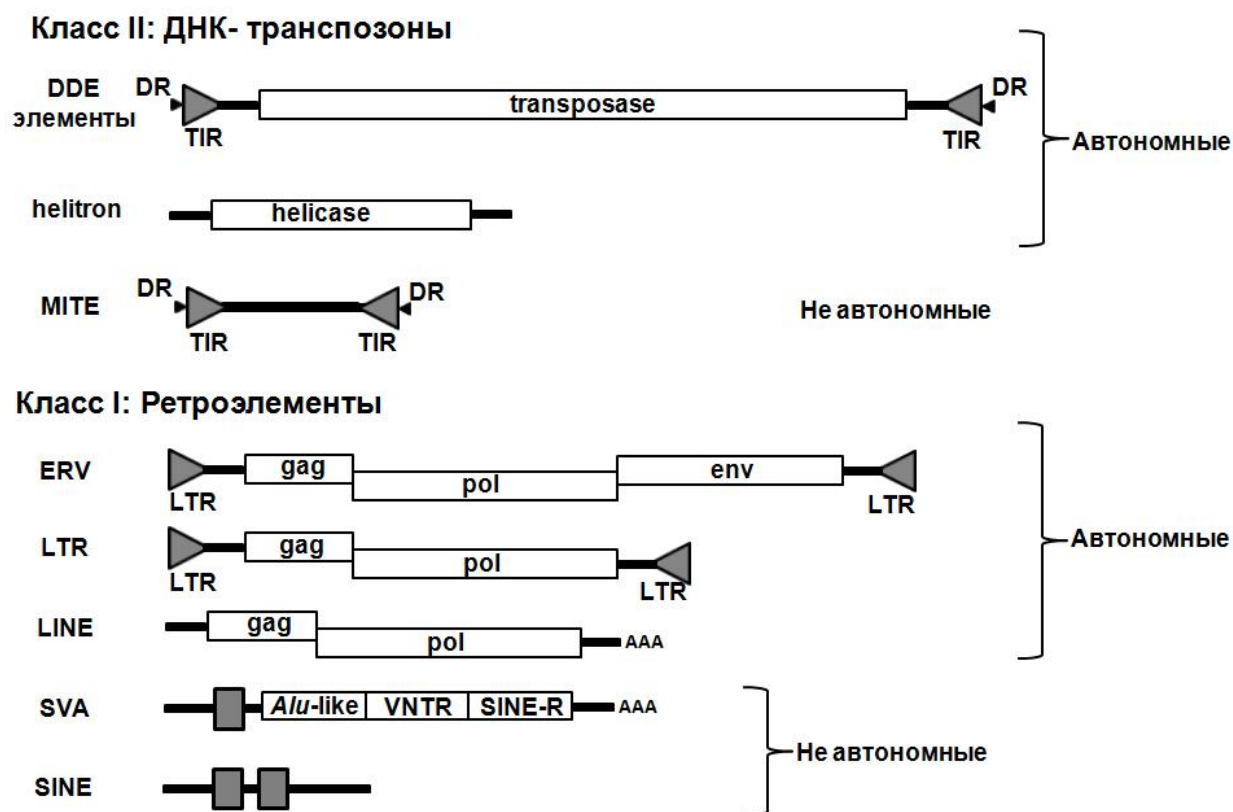


Рисунок 3. Автономные и неавтономные МЭ (с изменениями по Jurka, 2003)

Сайтом узнавания у большинства ДНК-транспозонов служит динуклеотид ТА, что позволяет им распознавать матричную ДНК и перемещаться практически в любой участок хроматина. Встраивание транспозона может модифицировать экспрессию близлежащих генов, что служит фактором нестабильности генома. Перемещение МЭ имеет и эпигенетические последствия: так ITR транспозонов служат сайтами узнавания для рiRNA, участвующих в нанесении на хроматин меток эпигенетической модификации. Множество копий ДНК-транспозонов в геноме создает большее количество сайтов посадки для рiRNA. Можно предполагать, что следствием перемещения (автономного или рекомбинативного) транспозонов в геноме станет модификация экспрессии близлежащих генов и перераспределение эпигенетических меток (Abrusan, Krambeck, 2006).

Само присутствие в геноме дисперсно распределенных копий транспозонов дает основу для рекомбинации этих элементов. Так копии вставных последовательностей (IS – inserted sequences) прокариот, дисперсно распределенные в геноме, рекомбинируя, служат основой генетического разнообразия прокариот (Karlsson, Melhus, 2006).

Транспозоны эукариот также могут служить факторами, приводящими к возникновению геномного разнообразия, не сцепленного с половым процессом. При этом кажется, что роль именно ДНК-транспозонов в этом процессе может быть определяющей. В пользу этого предположения говорит то, что геномы представителей подкласса *Bdelloidea* (Rotifera), размножающихся партеногенетически, демонстрируют высокое разнообразие ДНК-транспозонов при полном отсутствии ретроэлементов. Среди ДНК-транспозонов, только транспозон *mariner* содержится в геномах всех изученных видов партеногенетических коловраток (Arkhipova, Meselson, 2000).

Разные типы ДНК-транспозонов с разным успехом заселили геномы эукариот. Пожалуй, самой успешной группой ДНК-транспозонов стало семейство элементов *mariner*, принадлежащее суперсемейству транспозонов *Tc1/mariner*, представители которого встречены в геномах, за малым исключением, всех изученных эукариот.

Транспозон *mariner*

Молекулярная характеристика транспозона *mariner*

Мобильный элемент *mariner* впервые был выявлен около 30 лет назад у *Drosophila mauritiana* (Jacobson et al, 1986) при изучении мутации w^{pch} , которая фенотипически сопровождалась образованием желто-оранжевого окрашивания глаз. В дальнейшем выяснилось, что мутация w^{pch} нестабильна и встречается, в среднем, в соотношении 1:1000 мух F1, родители которых содержали эту мутацию (Haymer, Marsh, 1986). Свойственные нестабильной аллели w^{pch} генетические характеристики ассоциированы со встраиванием мобильных элементов.

Клонирование и секвенирование последовательности, встроенной в ген, ответственный за окрашивание глаз дрозофилы, позволило идентифицировать первый мобильный элемент *mariner* и определить его структурные характеристики (Jacobson et al, 1986). Якобсон назвал выявленный им с соавторами мобильный элемент в честь своей дочери, Marin (Hartl, 2001) – *mariner*.

Элементы *mariner* перемещаются в геноме с помощью многошагового механизма «вырезать–вставить» (cut and paste) (Craig et al, 2002). Они характеризуются наличием фланкирующих коротких инвертированных повторов и присутствием одной открытой рамки считывания, кодирующей транспозазу, — ключевой фермент процесса транспозиции по механизму вырезания-встраивания.

Транспозон *mariner* входит в состав суперсемейства мобильных элементов ДНК *Tc1/mariner/IS630*. Представители семейства обнаруживаются в геномах подавляющего числа исследованных эукариот (Doak et al. 1994; Radice et al. 1994; Robertson 1995; Robertson, Asplund, 1996). Элемент *IS630* населяет геномы представителей различных филл бактерий (Capy et al. 1996; Doak et al. 1994)

С помощью ПЦР-анализа мобильные элементы, подобные транспозонам *mariner*, были выявлены в геномах многих видов, включая: насекомых и других артропод (Robertson, 1993; Robertson, MacLeod, 1993), нематод (*Cenorabdis*

elegans), плоских червей (*Dugesia tigrina*) (Garcia-Fernandez et al.1993) и человека (Robertson, Martos, 1997). Транспозоны, подобные *mariner*, принято называть *mariners* или «сходные с *mariner* элементы» (MLE – *mariner*-like elements).

Несмотря на то, что многие из транспозонов утрачивают возможность к перемещению под давлением мутационного процесса, некоторые остаются функциональными и могут приводить к различного рода мутациям, в том числе, имеющим фенотипические проявления (Hartl et al. 1991). Работы, проводимые на *D. melanogaster*, показали наличие в ее геноме последовательности, способной к транспозиции и названной *Mosaic1* или *Mos1* (Hartel, 1989, Medhora et al., 1991, Garza et al., 1991). Эта последовательность имела высокую степень гомологии с последовательностью, которая вызывает мутацию w^{pch} , и была отнесена к элементам *mariner*.

Элементы *mariner*, выявленные у разных видов, имеют сходную структуру, которая подробно изучена на примере транспозона *Mos1* (рис.4).

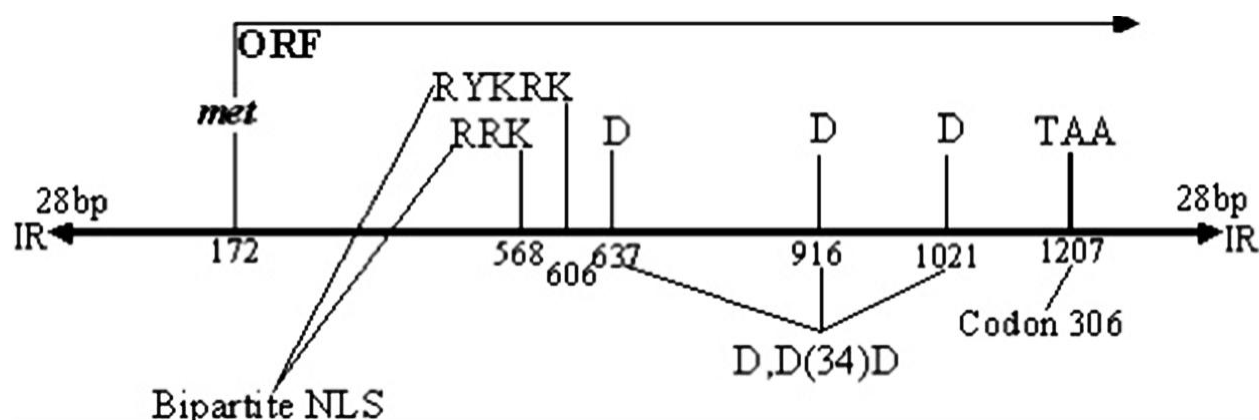


Рисунок 4. Молекулярная организация транспозона *Mos1 mariner* (по Robertson et al., 1999)

Его длина составляет 1286 п.н., он фланкирован короткими (28 п.н.) инвертированными повторами и несет одну непрерывную открытую рамку считывания (ORF), кодирующая белок, — транспозазу, длина которого составляет 345 аминокислот (Maruyama et al., 1991; Medhora et al., 1988). В N-концевой части транспозазы содержится ДНК-связывающий домен, за которым следует двойной

сигнал ядерной локализации (NLS — nuclear localization signal) (Robertson, 1995), который необходим для перемещения синтезированного белка из цитоплазмы в ядро, где и происходит процесс транспозиции. В С-концевой части транспозазы располагается консервативный каталитический домен, имеющий вид D,D(34)D, в котором два остатка аспаргиновой кислоты располагаются на расстоянии более 90 аминокислот друг от друга, а третий остаток аспаргиновой кислоты — на расстоянии 34 аминокислот от второго (Hartl et al., 1997; Doak et al., 1994). Мутации этого мотива приводят к полной инактивации транспозазы (Lohe et. al 1996). На основе сходства структуры каталитического домена транспозазы элементы *Tc1* и *mariner* относят к семейству *Tc1/mariner*. Мотив D,D(34)D служит ключевым звеном в механизме реакции транспозиции (Robertson, 1996; Gomulski et al., 2001), поскольку часть активного сайта связывает бивалентные катионы (Mg^{2+} или Mn^{2+}), которые необходимы для катализа реакций вырезания и встраивания элемента *mariner* (Kulkosky, 1992).

Первым этапом перемещения элементов *mariner* служит их транскрипция и синтез функционального белка — транспозазы. Затем транспозаза входит в ядро, где специфически узнает концевые инвертированные повторы транспозона. Перемещение элемента инициируется связыванием транспозазы на каждом конце элемента и далее, эти концы собираются вместе и формируют комплекс (схема 1).

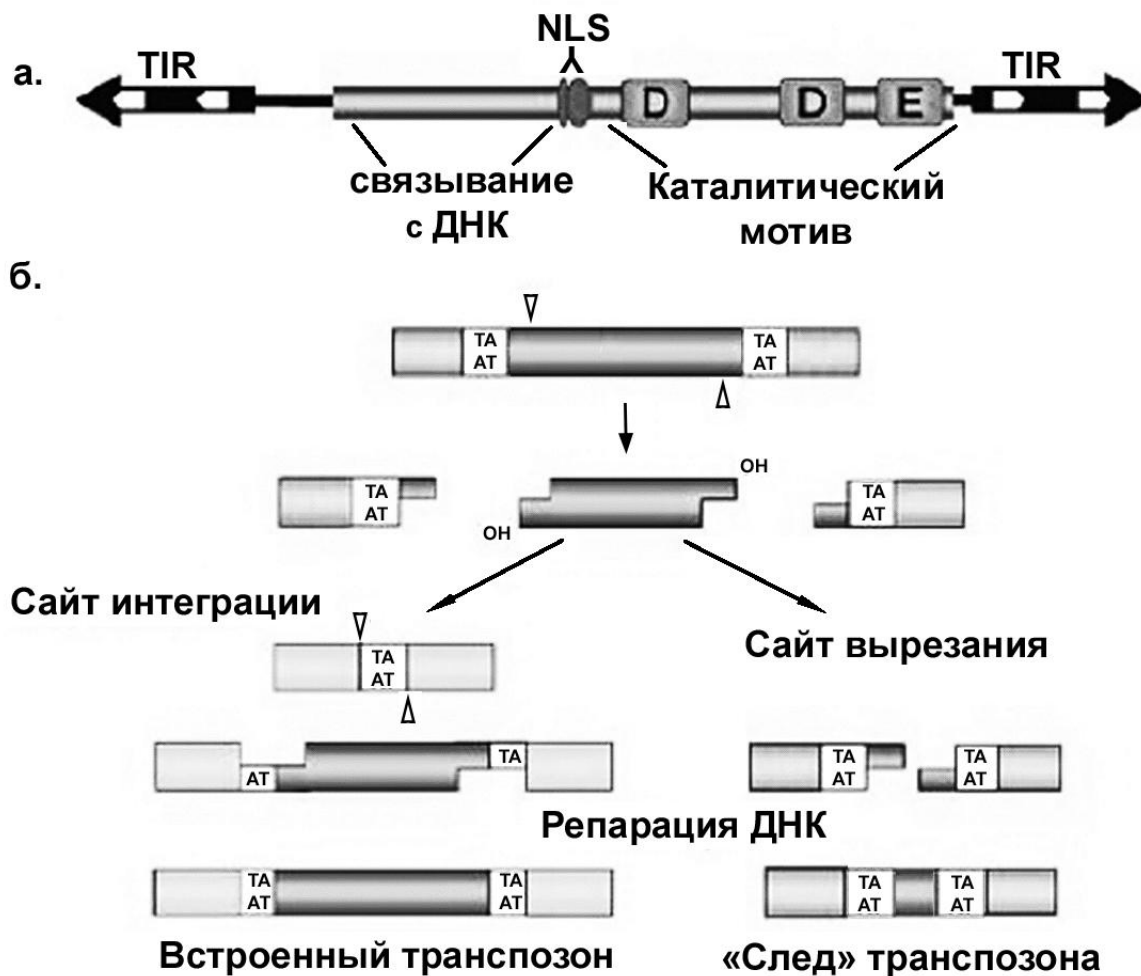


Схема 1. Транспозиция «вырезать-вставить» транспозона *mariner* (с изменениями по Kulkosky, 1992)

Реакция начинается с последовательного вырезания элемента *mariner* из донорной молекулы ДНК. Затем вырезанный транспозон может встроиться в новый локус, причем сайтом предпочтительной интеграции служит динуклеотид ТА (Craig, 1995). На заключительном этапе перемещения одностранные бреши в сайте интеграции и двунитевой разрыв в локусе вырезания репарируются с помощью клеточной репарационной системы. В результате такого перемещения в локусе вырезания остается небольшой фрагмент, так называемый «следом» транспозона.

Представленность и разнообразие элементов *mariner* в геномах

После выявления мобильного элемента *mariner* у дрозофилы, подобные элементам *mariner* транспозоны были обнаружены во всех группах эукариот, начиная с протистов и заканчивая человеком. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей выявленных элементов *mariner* показал, что, несмотря на в целом невысокую (в некоторых случаях около 50%) гомологию различных представителей *mariner*, в составе этих элементов можно выделить консервативные на аминокислотном уровне последовательности, соответствующие функциональным доменам транспозазы. Это наблюдение позволило разработать простой и эффективный подход для выявления элементов *mariner* в различных геномах. Анализ нуклеотидных и искусственно транслированных аминокислотных последовательностей MLE показал высокую гетерогенность элементов *mariner*. Это обстоятельство позволило выделить ряд подсемейств *mariner*. В настоящее время четко идентифицированы семь из них: *cecropia*, *mauritiana*, *melifera*, *capitata*, *lineata*, *irritianas* и *mori* (Robertson et al., 1997b).

Все входящие в состав подсемейств элементы изначально получены на основе анализа последовательности транспозазы *mariner*, выделенной из геномов различных представителей насекомых. Однако большинство последовательностей *mariner*, выделенных из геномов других организмов, после их анализа, также были отнесены к одному из вышеперечисленных подсемейств. Степень гомологии элементов *mariner* принадлежащих разным подсемействам составляет 30–50%, в тоже время внутри одного подсемейства элементы *mariner* проявляют достаточно высокую (65–80%) степень гомологии.

Таблица 2. Представленность MLE в геномах некоторых эукариот с изменениями по Arkhipova, Messelson 2001).

Тип	Организм	<i>ma riner</i>
Porifera	<i>Halichondria bowerbanki</i>	+
	<i>Spongilla sp.</i>	+
	<i>Cinachira allocladia</i>	-
Cnidaria	<i>Hydra littoralis</i>	+
	<i>Hydra vulgaris</i>	+
	<i>Aurelia aurita</i>	+
	<i>Renilla milleri</i>	-
	<i>Leptogorgia vigulata</i>	-
Ctenophora	<i>Condylactus sp.</i>	-
	<i>Mnemiopsis macrydi</i>	-
Platyhelminthes	<i>Dugesia tigrina</i>	+
	<i>Stylochus zebra</i>	+
	<i>Bdelloura candida</i>	+
	<i>Himasthla elongata</i>	+
Rotifera	<i>Moniliformis moniliformis</i>	-
	<i>Brachionus plicatilis</i>	-
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	-
	<i>Monostyla sp.</i>	+
	<i>Sinantharina socialis</i>	+
	<i>Philodina roseola</i>	+
	<i>Philodina rapida</i>	+
	<i>Habrotricha constricta</i>	+
	<i>Adineta vaga</i>	+
	<i>Macrotrachela quadricornifera</i>	+
Gastrotricha	<i>Lepidodermella sp.</i>	+
Mollusca	<i>Chione cancellata</i>	+
	<i>Corbicula fluminea</i>	-
	<i>Pynanassa obsoleta</i>	-
Bryozoa	<i>Amathia convoluta</i>	+
Arthropoda	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	+
	<i>Drosophila melanogaster</i>	-
	<i>Drosophila virilis</i>	+
	<i>Aphis milifera</i>	+
	<i>Bombix mory</i>	+
	<i>Artemia solina</i>	-
	<i>Procamberus clarkii</i>	-
Echinodermata	<i>Heliocidaris erythrogramma</i>	-
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	+
Chordat	<i>Danio rerio</i>	-
	<i>Xenopus laevis</i>	+
	<i>Mus musculus</i>	-
	<i>Bos taurus</i>	-
	<i>Homo sapiens</i>	+

С помощью ПЦР с вырожденными праймерами к консервативным участкам транспозазы Робертсон с коллегами (Robertson, 1993; Robertson, MacLeod, 1993) обнаружил последовательности, гомологичные элементам *mariner* у многих насекомых. Методом дот-блот гибридизации было обнаружено, что количество копий *mariner* в геноме может сильно варьировать. Так, геном мух-жигалок *Haematobia irritans* содержит 17000 копий, в то время как геном *Drosophila ananassae* лишь три копии (Robertson, 1995).

Исследования геномов плоских червей позволило обнаружить в них представителей семейства *mariner*. Так геном турбеллярии *Bdelloura candida*, паразитирующей на покровах морских ракообразных, показал наличие элементов *mariner*, имеющих низкую степень гомологии (25–27%) с представителями известных подсемейств *mariner*, и, таким образом, представляющих новое подсемейство этих элементов. В геноме свободноживущей морской турбеллярии *Stylocheus zebra* выявлено четыре последовательности *mariner*. Один клон, *Stylocheus.zebra.4*, принадлежит к подсемейству *cecropia*, другой, *Stylocheus.zebra.2*, не кластеризовался ни с одним известным подсемейством *mariner*. Два же последних клона, *Stylocheus.zebra.5* и *Stylocheus.zebra.6*, принадлежат к подсемейству *lineate*.

Исследование генома пресноводной турбеллярии *Giardia tigrina* [syn. *Dugesia tigrina*] показало более широкое представительство подсемейств элементов *mariner*. Клонирование и секвенирование позволило выявить у этих червей транспозоны *mariner*, относящиеся к подсемействам *cecropia*, *mauritiana*, *melifera*, *capitata* и *lineata*. Гаплоидный геном *Dugesia tigrina* содержит около 8000 копий элементов *mariner*. Анализ последовательностей этих транспозонов показал, что некоторые из копий *mariner* несут немутированную открытую рамку считывания и могут быть потенциально активными (Garcia-Fernandez, 1995). Эти данные, а также выявление элементов *mariner* у *C. elegans* (Garcia-Fernandez et al. 1993; Robertson 1995; Sedensky et al. 1994), позволяют предположить широкое распространение транспозонов *mariner* среди беспозвоночных, не относящихся к

членистоногим, что подчеркивает актуальность поиска и исследования *mariner* у других таксонов беспозвоночных.

Мозаичность заселения элементами *mariner* геномов различных видов планарий (транспозоны выявлены в геноме *D. tigrina* и отсутствуют в геноме *Schmidtea mediterranea* [syn. *Dugesia mediterranea*]) заставляет предположить либо горизонтальный перенос *mariner* в геном *D. tigrina*, либо исключение этих элементов из генома *D. mediteranea*. Первая гипотеза предполагает существование горизонтального переноса *mariner* между животными, таксоновически удаленными друг от друга; вторая гипотеза предполагает появление элемента *mariner* у предковой формы плоских червей до начала их радиации (Riutort et al., 1992).

В результате анализа элементов *mariner* из геномов животных различных таксономических групп была установлена удивительная особенность этих транспозонов — в одном геноме могут находиться элементы *mariner*, относящиеся к различным подсемействам. В частности, такими примерами являются геном человека, в котором выявлены элементы *Hsmar1* и *Hsmar2*, относящиеся к подсемействам *secropia* и *irritians*, соответственно (Robertson, Martos 1997; Robertson, Zumpano 1997), а также геном *C. elegans*, в котором идентифицированы элементы *mariner*, относящиеся к трем различным подсемействам.

Присутствие в составе одного генома разных подсемейств транспозонов *mariner* предполагает, что представители этих подсемейств не взаимодействуют друг с другом. Эксперименты с использованием системы для изучения транспозиции *in vitro* показали, что только высоко гомологичные элементы (гомология около 84%) способны к перекрестному перемещению (Lampe et al, 2001).

Гипотеза об участии элементов *mariner* в горизонтальном переносе генетической информации

Горизонтальный перенос генов — это перенос генов или участков генов между филогенетически разобщенными видами.

На протяжении долгого времени вертикальный переноса генов считался единственным способом передачи генетической информации. Тем не менее, открытие процесса трансдукции и плазмидного переноса генов (трансформации) у бактерий заставили признать существование горизонтального переноса, определив его как перенос фрагментов ДНК любой величины между филогенетически отдаленными организмами. У прокариот горизонтальный перенос считается одним из важнейших механизмов достижения генетической вариабельности (Gogarten et.al. 2002). Так, посредством трансформации передается устойчивость бактерий к антибиотикам, приводящая к появлению устойчивых штаммов и таким образом способствующая выживанию вида.

Несмотря на большой объем данных о горизонтальном переносе между прокариотами, свидетельства о наличии такого процесса у эукариот единичны. Фактически единственным на сегодняшний день достоверным случаем горизонтального переноса с участием эукариот остается приобретение асцидиями способности синтезировать целлюлозу. Так, геном асцидии *Ciona intestinalis* несет ген *Ci-CesA*, не имеющий гомологов среди эукариот, и приобретенный, по всей видимости, от целлюлозо-разлагающих бактерий посредством горизонтального переноса. При всей очевидности переноса в этом случае, его механизмы остаются неизвестными (Nakashima et al., 2004). Имеются также свидетельства о переносе фрагментов ДНК прокариотных ядерных паразитов в геном инфузорий, о механизмах которого также известно мало (Feschotte, Pritham, 2007). Эти случаи являются примерами горизонтального переноса ДНК между про- и эукариотами, перенос же генов между эукариотами, за исключением переноса фрагментов ДНК вирусными носителями (Andrake, Skalka 1996), остается лишь гипотезой. В рамках гипотезы прямого, не вирусного, горизонтального переноса между эукариотами основными кандидатами на роль переносчиков служат транспозоны.

Их способность перемещаться в геноме, породившая гипотезу о «паразитической» или «эгоистической» ДНК (Doolittle, Sapiensa, 1980), послужила основанием для предположения об их возможном межгеномном перемещении и, таким образом, участии в горизонтальном переносе. Зафиксированные на сегодняшний день случаи горизонтального переноса между про- и эукариотами говорят о том, что особи, между которыми происходит горизонтальный перенос, должны находиться в тесном контакте друг с другом. Поэтому перспективной выглядит система паразит–хозяин, в рамках которой как раз имеет место тесный контакт между филогенетически удаленными организмами.

Идея о горизонтальном переносе элементов MLE была впервые высказана после обнаружения необычно высокой гомологии (97%) элементов *mariner* из геномов *Zaprionus* и *Drosophila* (Maruyama, Hartl 1991; Lawrence, Hartl, 1993). Вслед за этим появилась серия работ других авторов (Robertson, 1993; Robertson, MacLeod, 1993), описывающих случаи вероятного горизонтального переноса элементов *mariner*. На основании данных о широком, но не однородном распределении элементов *mariner* у разных видов, было высказано предположение о возможности горизонтального переноса этих транспозонов (Maruyama, Hartl 1991; Robertson, 1993; Robertson, MacLeod, 1993). На существование горизонтального переноса указывают: присутствие в одном геноме разных подсемейств *mariner*, высокая степень гомологии ряда MLE идентифицированных в геномах филогенетически отдаленных друг от друга элементов, а также выпадение элементов *mariner* у отдельных видов животных. В настоящее время, несмотря на распространение гипотезы горизонтального переноса элементов *mariner* (Hartl et al., 1997), механизмы этого процесса остаются неизвестными.

Действительно, вероятность горизонтального переноса повышается среди между паразитом и хозяином (Sintupachee et al., 2006). Известны данные о примерах подобных систем, в которых гомология элементов *mariner* из геномов паразита и хозяина составляет более 90% (Robertson et al., 1995; Lohe et al., 1995;

Lampe et al., 2003). Одним из примеров горизонтального переноса между паразитом и хозяином может служить паразито-хозяинная система, состоящая из наездника (*Ascogaster reticulatus*) и мотылька (*Adoxophyes honma*), в которого наездник откладывает яйца. Затем *A. honma* служит кормом для вылупившихся и развивающихся личинок паразита. В этой системе показана крайне высокая (98%) гомология нуклеотидных последовательностей *mariner* из геномов паразита и хозяина (Yoshiyama et al., 2001).

Несмотря на большой объем накопленных данных, до сих пор не ясны особенности организации и функционирования в геноме элементов *mariner*. Остаются открытыми вопросы о возможной роли транспозонов *mariner* в генетической вариабельности организмов; не доказано участие элементов *mariner* в горизонтальном переносе. Важнейшим условием изучения элементов *mariner* является подбор адекватных и “говорящих” модельных систем.

Модельный объект исследования — *Himasthla elongata* (Trematoda, Echinostomatidae)

Для того, чтобы изучить вклад транспозонов семейства *mariner* в формирование вариабельности генома, а также возможность его горизонтального переноса между геномами эукариот необходима модельная система, представленная паразитом и его хозяином, в которой паразит должен иметь широкий круг хозяев, стадию бесполого или партеногенетического размножения и нести в геноме транспозон *mariner*. Таким объектом стал паразитический плоский червь *Himasthla elongata*.

Жизненный цикл *Himasthla elongata*

Класс Trematoda представляет один из наиболее успешных и широко распространенных таксонов паразитических плоских червей. Трематоды имеют сложный жизненный цикл, который протекает со сменой животных-хозяев и чередованием партеногенетических и гермафродитного поколений. Особый

интерес к трематодам обусловлен тем, что многие их виды служат 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 миллионов человек (Botros et al, 2006).

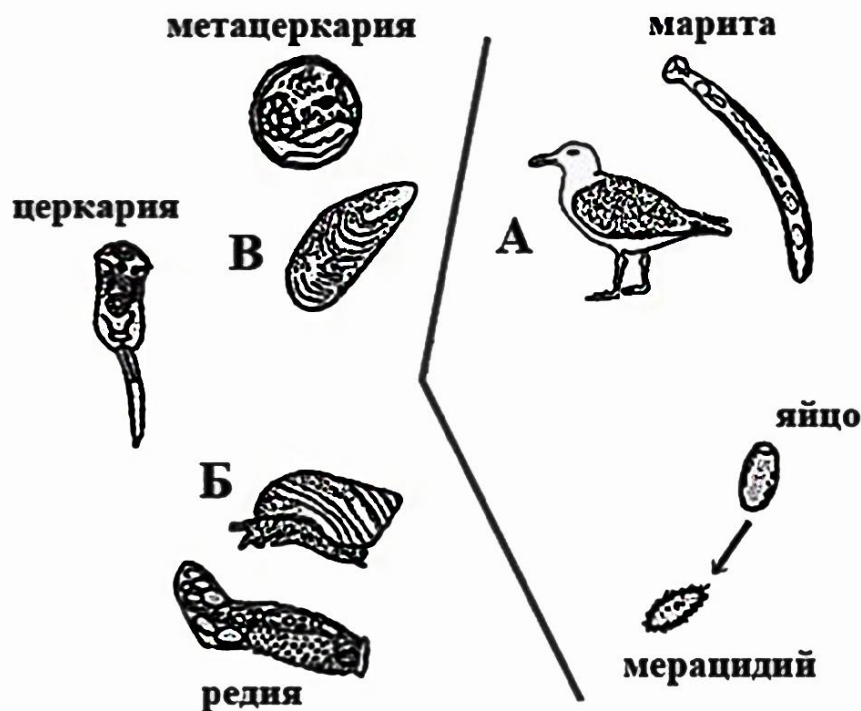


Рисунок 5. Жизненный цикл трематоды *Himasthla elongata* (с изменениями по Werding, 1969). А: *Larus argentatus*; Б: *Littorina littorea*; В: *Mytilus edulis*

Жизненный цикл *H. elongata* типичен для трематод (Рис. 5). Половозрелая особь гермафродитного поколения — марита, паразитирующая в кишечнике чайки, откладывает яйца, из которых при попадании в воду выходит подвижная свободноживущая личинка — мирацидий. За свою недолгую жизнь он должен попасть в первого промежуточного хозяина, которым могут служить моллюски *Littorina littorea*, *L. saxatilis* или *L. obtusata* (Mollusca; Gastropoda). В моллюсках мирацидий претерпевает метаморфоз, в результате которого превращаются в половозрелую партеногенетическую стадию — материнскую спороцисту. Материнская спороциста размножается партеногенетически и дает начало редиям.

Все редии в группировке, произошедшей от одного мирацидия, представляют собой генетические клоны. Как и материнские спороцисты редии размножаются партеногенетически. Они производят личинок гермафродитного поколения – церкарий, которые выходят из моллюска и ведут свободный образ жизни в поисках следующего промежуточного хозяина, роль которого играет мидия *Mytilus edulis*. Клоны церкарий, партеногенетических потомков одного мирацидия, инфицировавшего первого промежуточного хозяина – моллюска, имеют как отличные поведенческие реакции (Прокофьев, Галактионов, 2010), так и различный успех при инфицировании следующего (второго) промежуточного хозяина (Левакин и др., 2013; Levakin et al., 2013). Генетический источник такого разнообразия не известен. Попадая в мидию, церкарии превращаются в следующую личинку гермафродитного поколения – метцеркарию. Снаружи метцеркарии покрывается особой оболочкой – цистой, которая предохраняет их от защитных реакций хозяина. Мидия служит объектом питания окончательного хозяина – чаек *Larus argentatus*, попадая в которого метцеркария превращается во взрослую особь гермафродитного поколения – мариту. (Галактионов, Добровольский, 1993)

Из зародышевых клеток мирацидия в моллюске-хозяине формируется группировка редий, размножающихся путем апомиктического партеногенеза и производящих церкарий. При заражении моллюска одним мирацидием все редии и продуцируемые ими церкарии, как указывалось выше, обладают одним генотипом (генотип мирацидия-материнской спороцисты) и представляют собой клон (рис. 6).

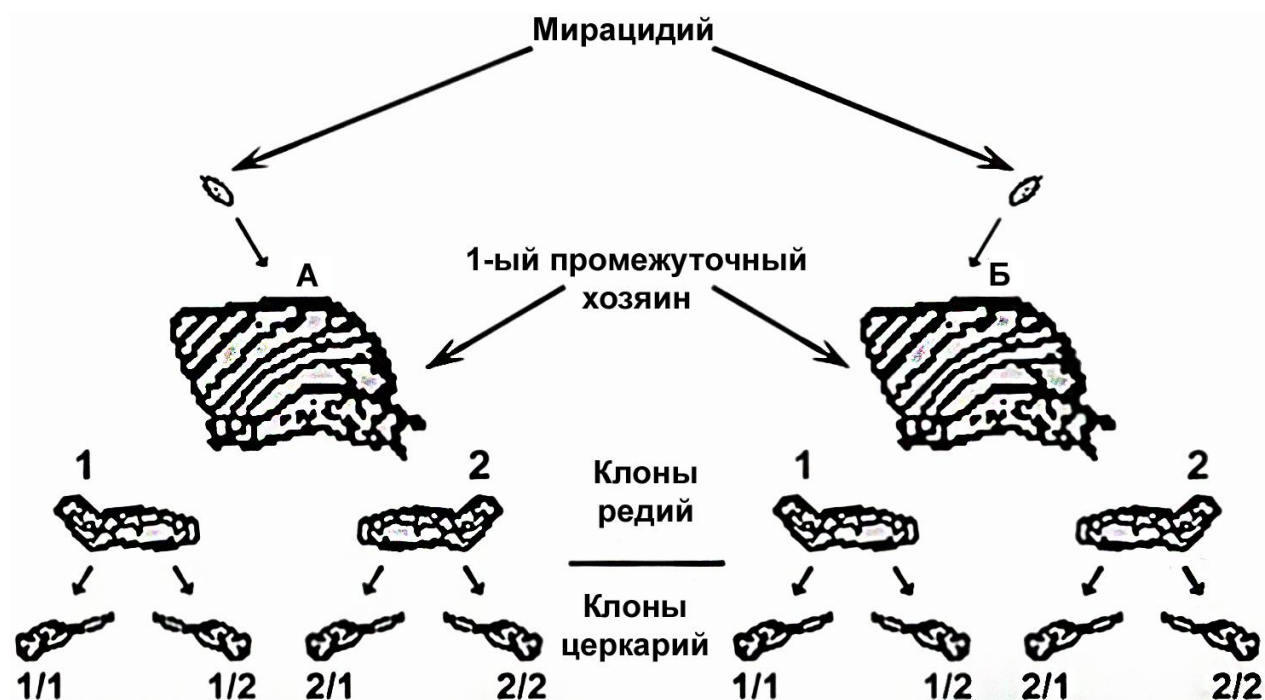


Рисунок 6. Формирование клональной инфрапопуляции партенит *H. elongata* в *L. littoreai* (по Galaktionov et al., 2014)

Установлено, что церкарии разных клонов и, в меньшей степени, разные особи внутри одного клона различаются характером поведенческих реакций и инвазионной способностью (Прокофьев и др., 2011; Левакин и др., 2013; Levakin et al., 2013).

Генетическая вариабельность партенит трематод

Долгое время считалось, что особи партеногенетического поколения трематод – редии или дочерние спороцисты, происходящие от одной материнской особи (материнской спороцисты) и обитающие в первом промежуточном хозяине (моллюске), равно как и производимые ими расселительные личинки – церкарии, представляют собой генетически идентичные клоны. Однако появились данные (Grevelding, 1999, Халтурин и др. 2000, Семенова и др., 2005), полученные с использованием ДНК-маркеров, которые указывают на существование индивидуальной изменчивости клонов партенит и их производных — церкарий. Это увеличивает генетическую вариабельность паразитов и, соответственно, шанс на успешное заражение хозяина. С другой стороны, высокая генетическая

вариабельность затрудняет разработку медикаментозных препаратов против патогенных видов трематод, что делает изучение механизма их генетической изменчивости весьма актуальным.

Исследования сателлитного повтора в геномах партеногенетических поколений *Schistosoma mansoni* выявили неоднородность его распределения в особях дочерних партенит. При этом использовали праймеры на основе сателлитной ДНК — элемента W1 (Grevelding, 1999). Клональная изменчивость метацеркарий рода *Microphallus* (Халтурин и др., 2000) и церкарий шистосоматид рода *Trichobilharzia* (Семенова и др., 2005) исследована с помощью метода RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), широко применяемого при изучении внутривидовой изменчивости. В основе метода лежит ПЦР с использованием универсальных коротких праймеров, которые случайно отжигаются на ДНК и обеспечивают амплификацию набора фрагментов разной длины.

Методы определения генетического полиморфизма

Метод RAPD, использованный при генотипировании клонов партенит шистозом, служит распространенным подходом для определения внутривидовой генетической вариабельности. RAPD, основанный на ПЦР со «случайными» праймерами имеет несомненное достоинство — малое количество ДНК, необходимое для проведения реакции. Однако он не обеспечивает необходимой воспроизводимости результата что делает его использование затруднительным.

Подходы, основанные на рестрикционном анализе генома, такие как RFLP — позволяют добиться высокой воспроизводимости результата, но требует десятки микрограмм ДНК, и не подходит для исследования изменчивости мелких организмов, таких как церкарии и редии *H. elongata*.

Компромиссом между RAPD и RFLP служит метод AFLP, предложенный в 1995 г. Возом с коллегами (Vos et al, 1995). Суть подхода заключается в последовательной рестрикции и амплификации геномной ДНК. Сайтами же посадки праймеров служат адаптерные последовательности, легированные к

рестриктам и фланкирующие их с 5' и 3'-концов (рис. 9 а). Такой подход позволяет добиться воспроизводимости результатов генотипирования благодаря рестрикции, используя минимальное количество геномной ДНК благодаря ПЦР.

Однако AFLP, как собственно RAPD и RFLP, дает возможность анализа лишь общего «состояния» генома. Проследить вклад какой-либо последовательности, как мобильного элемента, в формирование изучаемой вариабельности требует секвенирования большого количества полиморфных зон – фактически всего генома.

Для исследования вклада мобильных элементов в генетическую вариабельность используют подходы, так же как AFLP основанные на рестрикции геномной ДНК, однако вторым праймером в реакции служит олигонуклеотид с сайтом посадки внутри последовательности транспозона. Так становится возможным оценить распределения конкретного мобильного элемента в геноме.

Одним из подходов к анализу этого распределения стал метод TID (transposon insertion display) и S-SAP (Sequence specific amplification polymorphism) (рис. 9б) (Waugh et al., 1997). Оба подхода основаны на последовательной рестрикции и амплификации геномной ДНК транспозон-специфичными праймерами. В случае TID, выбирается сайт рестрикции, находящийся внутри последовательности транспозона, в случае S-SAP сайт рестрикции находится вне последовательности МЭ. Метод относительно прост и позволяет генерировать большое количество фланкированных транспозонами полиморфных маркеров (Behura, 2006). S-SAP позволил обнаруживать внутри- и межпопуляционный полиморфизм (Behura et al., 2001).

Большинство основанных на ПЦР методов для выявления полиморфизма основаны 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. Использованные варианты AFLP и TID приведены в разделе Материалы и методы.

В настоящей работе попытались определить возможность горизонтального переноса транспозонов семейства *mariner* между геномами эукариот и вклад транспозонов в формирование вариабельности генома на модельной системе паразит-хозяин, в которой паразит размножается партеногенетическим путем. Первой задачей стало клонирование и характеристика транспозона *mariner* паразита — трематоды.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор и первичная обработка материала

Сбор и первичную обработку материала проводили на Беломорской биологической станции Зоологического института РАН (ББС ЗИН РАН) «Картеш» в июле–августе 2007–2011 гг. Моллюски *Littorina littorea* и *L. saxatilis* (Gastropoda) собраны на литорали и верхней сублиторали, мидии *Mytilus edulis* (Bivalvia) сняты с субстратов марикультуры, птенцы чайки *Larus argentatus* (Aves; Laridae) пойманы на близлежащих островах. Источником церкарий и редий *H. elongata* служили зараженные этим паразитом литорины *L. littorea*. Эмиссию церкарий проводили в 100 мл прозрачной посуде с морской водой при экспонировании на свету при 15–20°C в течении 1 ч. Емкости просматривали под биноклем МБС-10, и по факту выделения церкарий выявляли моллюсков, зараженных искомым видом. Неинфицированных моллюсков использовали как источник ДНК, инфицированных же помещали в садки для длительного содержания. Зараженных моллюсков в последующем неоднократно использовали для получения необходимых для экспериментальной работы церкарий *H. elongata* способом, аналогичным вышеописанному. Для выделения больших количеств ДНК *H. elongata* брали пул церкарий (церкарии, выделенные несколькими особями литорин). Для проверки гипотезы о клональной изменчивости партенит и церкарий *H. elongata*, ДНК выделяли из отдельных особей церкарий и редий, изолированных из одного моллюска-хозяина. Для этого редий извлекали из моллюска и помещали в 1.5X среду L15 (Leibovitz, Sigma). Для проверки гипотезы о внутривидовой клональной изменчивости, церкарий извлекали непосредственно из редий, после чего из них выделяли ДНК.

Выделение геномной ДНК

Выделение геномной ДНК из крови чайки и человека проводили по стандартной методике. После осаждения и отбора плазмы, клетки лизировали в

растворе (10 мМ Трис-НCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA, 0.5 % SDS). К лизату добавляли протеиназу К (Sigma) до конечной концентрации 200 мкг/мл и инкубировали 1 час при 50°C, затем к раствору добавляли NaCl до конечной концентрации 0.5 М. ДНК последовательно экстрагировали фенолом, смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт = 25:24:1, смесью хлороформ:изоамиловый спирт = 24:1. ДНК осаждали, добавляя к водной фазе 2,5 объема 96%-ного этанола, и растворяли в деионизованной воде (Super Q). Для удаления следов РНК препарат ДНК дополнительно обрабатывали 100 мкг/мл РНКазой А (Sigma), после чего проводили обработку протеиназой К в концентрации 100 мкг/мл. ДНК экстрагировали фенол:хлороформом, переосаждали 70%-ным этанолом и растворяли в деионизованной воде.

Морские беспозвоночные известны высоким содержанием мукополисахаридов (Sokolov, 2000) существенно снижающими эффективность enzymатических реакций поэтому ДНК *H. elongata*, а также ее окончательного и промежуточных хозяев выделяли используя детергент СТАВ (Worden Lab Protocol). Для этого животных целиком (*H. elongata*), ногу (*Littorina littorea* и *L. saxatilis*) или гонады (*Mytilus edulis*) гомогенизировали в буферном растворе для СТАВ, содержащем 100 mM Tris-HCl [pH=8]; 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl; 0.2% β -mercaptoethanol и 0.1 mg/mL proteinase K. К полученному гомогенату добавляли 1 объем подогретого до 60°C буфер для СТАВ, содержащий 2% СТАВ и инкубировали до 1 часа при 60°C. К полученному лизату добавляли 1 объем смеси хлороформ:изоамиловый спирт = 24:1, тщательно перемешивали в течении 30 секунд и центрифугировали 15 – 30 минут при 12000 g. ДНК осаждали, добавляя к водной фазе 2,5 объема 96%-ного этанола, и растворяли в деионизованной воде (Super Q). ДНК полученная таким способом практически свободна от РНК, поэтому обработку РНКазой не проводили. При необходимости остатки РНК удаляли способом описанным выше для фенол- хлороформной экстракции.

Выделение РНК.

Для выделения тотальной фракции РНК использован реагент Trizol (Sigma) согласно рекомендациям изготовителя. Чистоту выделения и сохранность РНК оценили по четкости полос 18S и 28S рибосомных РНК в УФ свете. Количество РНК измеряли спектрофотометрически по поглощению УФ света с длиной волны 260 нм (Sambrook et al., 1989). Для очистки РНК от примеси тотальной ДНК использовали препарат ДНКазы, свободной от РНКаз (RNase free DNase; Roche).

Полимеразная Цепная Реакция (ПЦР).

Для амплификации консервативной последовательности транспозона *mariner* использовали вырожденные праймеры Mar-124F, Mar-276R (Таблица 2). 20 µl реакционной смеси содержали 2 µl буфера для Taq-полимеразы, 1.5 mM MgCl₂, 1.6 mM dNTP (эквимоллярная смесь нуклеотидов dATP, dTTP, dCTP, dGTP), по 20 pM каждого из праймеров, 200 ng геномной ДНК и 1U Taq-полимеразы (Силекс). Амплификацию проводили: 30 циклов (95°C (1') → 55°C (1') → 72°C (1')). Отрицательным контролем служила реакционная смесь без добавления матрицы. Фланкирующую Hem1 5' последовательность, выявляли частично неспецифической ПЦР (Karlyshev et al., 2000) используя обратный праймер HmOuR, сайт узнавания, которого лежит на 30 п.н. ниже Mar124F. 25 циклов реакции включали: 95°C (1') → 57°C (20") → 72°C (40"). Фланкирующую Hem1 3' последовательность выявлена методом обратной ПЦР. Для этого 0,5 µg геномной ДНК обработали 5 U *Eco*R1. С легированных «на себя» рестриктов провели ПЦР с праймерами HmOuF/ HmOuR. 25 циклов реакции включали: 95°C (30") → 58°C (20") → 72°C (40"). Как обратный, так и частично неспецифический ПЦР выявил несколько зон при разделении на 1% агарозном геле. Зоны соответствующие молекулярной массе более 1000 п.н. вырезаны из геля, клонированы и секвенированы.

AFLP (amplified fragment length polymorphism) и TID (transposon insertion display). Реакции AFLP и TID сходны и различаются тем, что при TID сайтом

связывания селективного праймера служит последовательность транспозона. AFLP (Схема 2_А) провели в соответствии с протоколом (Vos et al., 1995) (Схема 2_А). Для проведения реакции TID (Схема 2_Б) 50 ng геномной ДНК *H. elongata* обрабатывали рестриктазой *Hind*III (5 U), образующей «липкие концы».

Таблица 3. Праймеры и адаптеры. Амплификация геномных копий - Mar124F, Mar276R; инвертированная ПЦР и частично неспецифическая ПЦР - HmOuR и HmOuF. Селективные нуклеотиды и последовательности сайтов узнавания *Eco*R1, *Mse*I и *Hind*III выделены жирным шрифтом.

Название	Источник	Последовательность 5' → 3'	Длина, п.н.	назначение
Адаптерные последовательности				
<u>AdEcoRI</u>	Vas et al. 1995	5' -СТCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGG TAA -5'		AFLP
<u>AdMseI</u>		5' -GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTC AT -5'		
<u>HindIII</u>	Собственная разработка	5' - AGCT CTCAGGACTCAT GAGTCCTGAGTAGCAG-3'		TID
Праймеры				
Mar124F	<u>Robertson, 1993</u>	TGGGTNCCNCAYGARYT	17	Hem1
Mar276R		GGNGCNARRTCNGGNSWRTA	20	
<u>HmOuR</u>	Собственная разработка	CAATGGAAGCGGCAAATCCTT	25	5', 3' UTR и ITR
<u>HmOuF</u>		CTGTCAAGATGGCACTCCAAGAGCT	21	
<u>prEcoRI+c</u>	Vas et al. 1995	GACTGCGTACC AATTCc	17	AFLP
<u>prEcoRI+cag</u>		GACTGCGTACC AATTCcag	19	
<u>prMseI+c</u>		GATGAGTCCTGAG TAAc	17	
<u>prMseI+cag</u>		GATGAGTCCTGAG TAAcag	19	
<u>Hind+c</u>	Собственная разработка	GACGATGAGTCCTGAGAGCTT c	21	TID
<u>Hind+cag</u>		GACGATGAGTCCTGAGAGCTT cag	21	

Отожженные на себя адаптеры лигировали к рестриктам в течение ночи при +16°C. Для обеспечения транспозон - специфической реакции, в первом раунде TID, рестрикты амплифицировали праймером к адаптерной последовательности - Hind+c (10 pM) и к последовательности Hem1 - Mar276R (20 pM) (см. таблицу). Ведение селективного цитозина, обеспечило редукцию сигнала неспецифической амплификации. 24 цикла реакции включали: 95°C (30'') → 57°C (30'') → 72°C (30''). Селективная амплификация, матрицей для которой служил разведенный

1:10 в стерильной деионизованной воде продукт первой реакции, состояли из: 5 pM адаптер - специфичного праймера Hind+cag и 5 pM и меченного $\gamma^{32}\text{P}$ dATP праймера Mar276R. 35 циклов реакции в режиме «touch-down» включали: 95°C (30'') $\rightarrow$ 57°C (30'') $\rightarrow$ 72°C (30''). Температура посадки праймеров (T_a) в первом цикле составила 65°C и снижена до 57°C в течении 12 циклов с шагом 0,7°C.

ПЦР совмещенная с обратной транскрипцией

Для анализа транскрипционной активности геномных копий NemaгI использован одношаговый ПЦР в сочетании с обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ). Для постановки реакции использовали набор iQTMSYBR1 Green Supermix (Bio-Rad, Moscow, Russia), где детектируемым красителем служит флуорохром SYBR1 GreenI. Реакция поставлена в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию проводили прямым праймером HeC1_F и обратным MAR276R. Контролем реакции служила амплификация гена актина праймерами ActinF (5'- AAGAGCAGTGTTCCTTCCA-3') и ActinR (5'- CGTACATGGCTGGTGTGTT-3').

Клонирование и секвенирование.

Последовательности клонированы в плазмидные векторы, pTZ57R и pTZ57R/T (Fermentas), представляющие собой коммерческие варианты на основе pUC19. Плазмида pTZ57R/T линейаризована производителем и фланкирована поли А «липкими концам». Перед легированием в такую плазмиду, к 5' и 3' концам вставки приращивали поли-Т трек (poly-T overhang). Для этого вставку инкубировали при 72°C в течении 30 минут в присутствии реакционной смеси для ПЦР (см. 2.4), но вместо смеси dNTP вводили dTTP. В случае pTZ57R клонировали по «тупым концам». Лигирование в вектор и трансформацию проводили в соответствии с рекомендацией производителя (Fermentas). Плазмиды выделяли методом щелочного лизиса и дополнительно очищали в равновесном градиенте плотности CsCl (Sambrook et al, 1989). Вставки

секвенированы в фирме Силекс (Москва). Плаزمид, несущая консервативный участок транспозазы *mariner* названа pHem1, а сама последовательность (вставка) Hem1.

Введение меченых нуклеотидов в последовательности ДНК

Фрагменты транспозонов *mariner* человека и *H. elongata* метили метили biotin-11-dUTP (Силекс) или [α - 32 P]dATP (Amersham) методом ПЦР. Матрицами в таких реакциях служили плазмиды pHsmC4 и pHemC1. Меченые фрагменты очищали от невключившихся нуклеотидов при помощи электрофореза в 0.5%-ном агарозном геле. Участки геля, содержащие меченый фрагмент, вырезали. ДНК элюировали центрифугированием фрагментов геля на подложке из спрессованной стекловаты.

Гибридизация по Саузерну, дот-блот гибридизация.

Для гибридизации по Саузерну геномную ДНК *H. elongata* переваривали одной из рестриктаз – *Hind*III, *Eco*R1, *Bam*HI, *Msp*I (Сибэнзим) и фракционировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Гель после электрофореза инкубировали 15 мин в 0.25 М HCl, затем споласкивали водой и инкубировали 1 час в растворе (1.5 М NaCl, 0.5 М NaOH). Перенос ДНК на нейлоновую мембрану Hybond N+ (Amersham) осуществляли капиллярным методом в растворе 0.5 М NaOH (Sambrook et al, 1989). Для дот-блот гибридизации соответствующие количества геномной ДНК исследуемых видов животных и плазмид pHsmC4 и pHemC1, денатурировали кипячением 10 мин в 0.4 М NaOH и переносили в буфере (0.2 М NaOH, 10xSSC) вакуумным методом на нейлоновую мембрану Hybond N+ (Amersham). ДНК фиксировали на мембране, облучая последнюю ультрафиолетом (254 нм., 1.5 Дж/см²).

Гибридизацию проводили по стандартному протоколу (Wahl, 1979). Для блокирования мест неспецифического связывания мембрану инкубировали в предгибризационном буфере (5xSSC с 1% БСА, 0.1% Tween-20, 0.02% SDS) в

течении 2 часов при 65°C. Затем к этому раствору добавляли денатурированный в 50%-ном формамиде радиоактивно-меченый ДНК-зонд до конечной концентрации 100 нг/мл и вели гибридизацию 10 часов при 64°C; в инкубационной смеси присутствовал 100-кратный избыток денатурированной неспецифичной конкурентной ДНК. В качестве неспецифичного конкурента в экспериментах по гибридизации использовали очищенную, разрушенную ультразвуком до средней длины 500 п.н. геномную ДНК *E.coli*. После гибридизации проводили отмывку мембраны: 3 раза по 15 мин в буфере (4xSSC с 0.1% SDS) при 66°C и 2 раза по 15 мин в буфере (2xSSC с 0.05% SDS) при 37°C. Для детекции участков гибридизации мембрану высушивали и экспонировали на рентгеновскую пленку XAR-5 Kodak.

Получение препаратов ядер и определение размера генома *H. elongata*

Препараты ядер *H. elongata* получали из эмбрионов церкарий, препаративно выделенных из редии. Далее их фиксировали в модифицированном растворе Карнуа (метанол: ледяная уксусная в соотношении 3:1) и наносили на стекло. Препараты инкубировали 15 мин в буфере PBS, содержащем 0.05% Triton X-100, и после серии отмывок обезвоживали и высушивали на воздухе.

Размер генома определяли методом проточной цитометрии. Препараты ядер окрашивали йодистым пропидием (PI – propidium iodide) в соответствии с протоколом предложенным Hare и Johnston (2011). Проточную цитометрию окрашенных PI ядер проводили в голубом спектре, при длине волны 488 нм. Количество ДНК в ядрах *H. elongata* определяли по сравнению с количеством ДНК в спленоцитах *Mus musculus*.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

Для гибридизации *in situ* вставку pHemC1 метили флуоресцентным Cy5-dUTP с помощью ПЦР. Гибридизацию проводили по стандартному протоколу

Rouche™ (Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual), ядра и хромосомы контрастировали DAPI и анализировали с помощью эпифлюоресцентного микроскопа DMI3000B Leica Microsystems GmbH в ЦКП «Хромас». Для компьютерной обработки изображений использовали пакет программ Adobe Photoshop™ CS 5.

Электрофорез

Амплификаты TID и AFLP разделяли в 5% секвенирующем ПААГ (bis- AA – 19:1; 0,5x TBE; 6М мочевины). Пробы денатурировали в буфере SeqStop (98% формамид, 10mM ЭДТА, бромфеноловый синий, ксиленцианол). Агарозный ЭФ проводили в геле с различным процентным содержанием агарозы (от 0,7% - 1,5%) в зависимости от конкретной задачи.

AFLP и TID

Реакции AFLP и TID сходны и различаются тем, что при TID сайтом связывания селективного праймера служит последовательность транспозона. AFLP провели в соответствии с протоколом (Vos et al., 1995) (схема 2, А). Для проведения реакции TID (схема. 2, Б) 50 нг геномной ДНК *H. elongata* обрабатывали рестриктазой HindIII (5 Ед), образующей «липкие концы».

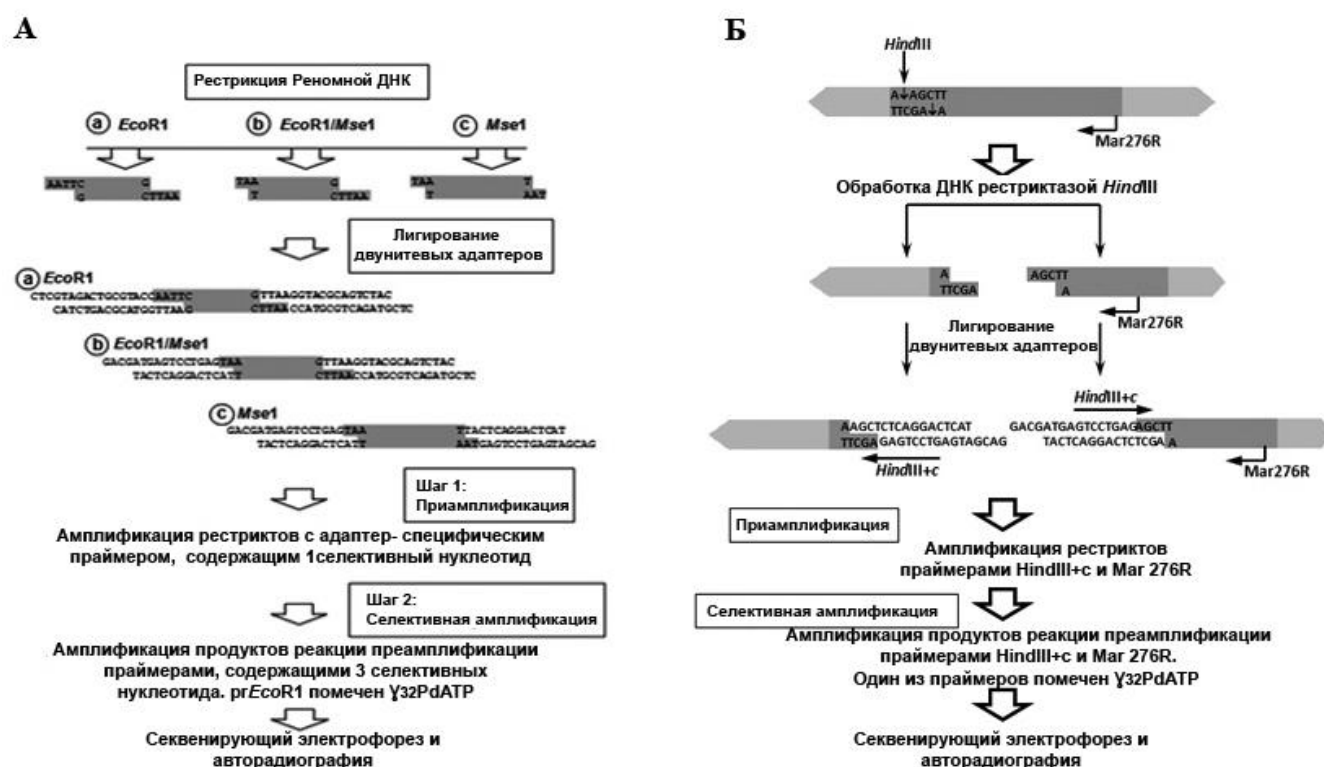


Схема 2. Проведение реакций AFLP (А) и TID (Б)

Отожженные на себя адаптеры лигировали к рестриктам в течение ночи при +16° С. Для обеспечения транспозон-специфической реакции в первом раунде TID рестрикты амплифицировали праймерами к адаптерной последовательности Hind+c (10 пМол) и последовательности Hem1 Mar276R (20 пМол) (см. таблицу). Ведение селективного цитозина обеспечило редукцию сигнала неспецифической амплификации. 24 цикла реакции включали: 95° С (30'') → 57° С (30'') → 72° С (30''). Селективная амплификация, матрицей для которой служил разведенный 1:10 в стерильной деионизованной воде продукт первой реакции, состояла из: 5

пМол адаптер-специфичного праймера Hind+cag меченного $\gamma^{32}\text{P}$ dATP и 5 пМол праймера Mar276R. 35 циклов реакции в режиме «touch-down» включали: 95° C (30'') $\rightarrow$ 57° C (30'') $\rightarrow$ 72° C (30''). Температура посадки праймеров (T_a) в первом цикле составила 65 °C и снижена до 57 °C в течение 12 циклов с шагом 0,7 °C.

Компьютерные методы исследований

Для поиска гомологов *hemar1* использовали ресурс NCBI (www.ncbi.nih.gov). Поиск осуществляли, используя алгоритм wuBLAST (Washington university Basic Local Alignment Search Tool) по всем открытым базам данных первичных последовательностей нуклеиновых и аминокислот. Для выравнивания первичных последовательностей нуклеотидов, использовали алгоритмы ClustalW2 и MUSCLE, аминокислот – COBALT. Филогенетическое расстояние между последовательностями MLE (*mariner*– like elements) установлено по критерию p-distance, рассчитанному в программе MEGA-5.0. Для поиска ORF использовали ORF Finder. Для выявления консервативных мотивов в ставе последовательностей использовали Motif Scan, Motif Finder и Helix-Turn-Helix Motif Prediction.

Статистическая обработка результатов AFLP

Аmplифицированные фрагменты ДНК разной длины учитывали как различающиеся аллели, которые при составлении бинарной матрицы исходных данных кодировали цифрами 1 или 0, что обозначало наличие или отсутствие каждого аллеля у данного локуса. На основе исходной матрицы данных строили матрицу коэффициентов подобия генотипов Жаккара, которую использовали для кластеризации методом главных компонент (PCoA – Principal coordinates analysis). Построение бинарной матрицы выполнено в программе GeleQuest, кластеризация результатов в программе ClusterVis (SequentiX - Digital DNA Processing).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявление представителя семейства транспозонов *mariner* в геноме *Himasthla elongata*

Выбор праймеров

Для выявления транспозонов *mariner* в геноме *H. elongata* применяли успешно использованный на насекомых (Robertson et al. 1993; Auge-Gouillon et al. 1995; Yoshiyama et al. 2001), гидре (*Hydra littoralis*) и турбелляриях (*Dugesia tigrina*) (Robertson 1997) подход ПЦР-анализа с вырожденными праймерами к консервативным на аминокислотном уровне мотивам гена транспозазы. При наличии элементов *mariner* в исследуемом геноме, в результате ПЦР с вырожденными праймерами Mar-124F и Mar-276R (Таблица 3) должен амплифицироваться фрагмент ДНК длиной около 500 п.н. (Рис. 8, А). В качестве контролей для ПЦР-анализа использовали ДНК видов, для которых известно наличие и отсутствие транспозонов *mariner* в геноме, — ДНК человека и *E. coli*, соответственно (Arkhipova, Meselson, 2000). Эксперимент показал, что в результате ПЦР с праймерами Mar-124F и Mar-276R на геномной ДНК человека и *H. elongata* амплифицируются фрагменты длиной около 500 п.н., в то же время при использовании в качестве матрицы ДНК *E. coli* ПЦР-продукт отсутствует (Рис. 8, А). Таким образом, проведенный ПЦР-анализ говорит, что транспозоны семейства *mariner* присутствуют в геноме *H. elongata*.

В связи с вырожденностью используемых праймеров необходимо было провести предварительную проверку того, что выявляемый в подобранных условиях ПЦР-продукт, амплифицированный с геномной ДНК человека, является фрагментом элемента *mariner*. Для этого мы провели его рестрикционный анализ. В геноме человека известны два негомологичных консенсуса транспозонов *mariner* – *Hsmar1* и *Hsmar2*, принадлежащих подсемействам *secripia* и *irritans*, соответственно (Robertson, 1997). Компьютерными методами было установлено,

что одной из рестриктаз пригодной для анализа выявленного ПЦР-продукта является рестриктаза *HinfI*. В составе фрагментов транспозонов *Hsmar1* и *Hsmar2*, ограниченных праймерами Mar-124F и Mar-276R, содержится по одному сайту для *HinfI*, так что фрагмент *Hsmar1* расщепляется на участки длиной 218 п.н. и 271 п.н., а фрагмент *Hsmar2* - на участки длиной 116 п.н. и 384 п.н. (Рис. 7).

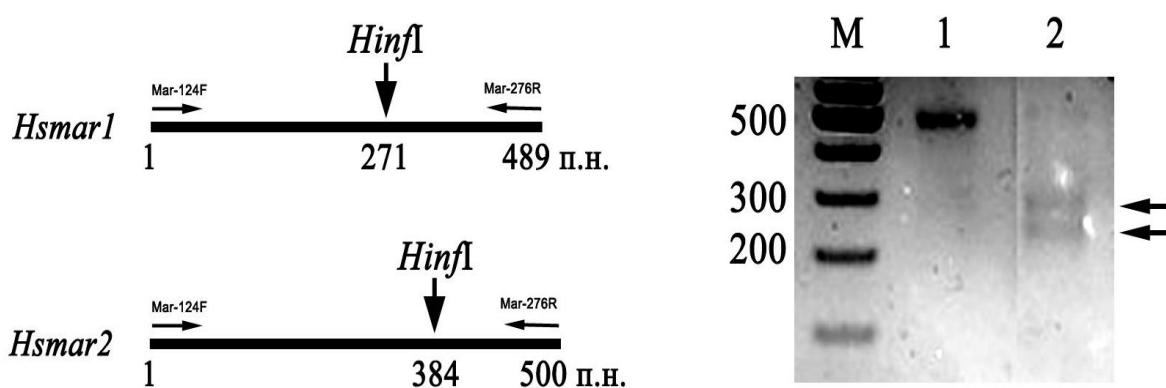


Рисунок 7. Рестрикционный анализ 500 пн ПЦР продукта амплифицированного праймерами Mar-124F и Mar-276 из геномной ДНК *H. elongata*.

В результате обработки рестриктазой *HinfI* исследуемого фрагмента образуются продукты длиной около 220 п.н. и 270 п.н. (Рис. 7, Б, дорожка 2). Таким образом, данные рестрикционного анализа свидетельствуют в пользу того, что, во-первых, ПЦР-продукт длиной около 500 п.н., амплифицированный с геномной ДНК человека с использованием праймеров Mar-124F и Mar-276R является фрагментом элемента *mariner*, и, во-вторых, амплифицированный продукт представлен фрагментами транспозонов *Hsmar1*, но не *Hsmar2*. Преимущественную амплификацию фрагмента элемента *Hsmar1*, но не *Hsmar2* можно объяснить тем, что 5 нуклеотидов из 3'-области сайта отжига праймера Mar-124F в составе последовательности элемента *Hsmar2*, но не *Hsmar1*, не комплиментарны последовательности праймера Mar-124F. Анализ продуктов рестрикции показывает также присутствие минорных количеств продукта длиной около 500 п.н., который соответствует фрагментам, не содержащим сайт для рестриктазы *HinfI* (Рис. 8, Б, дорожка 2).

Из этого эксперимента следует, что выбранные условия амплификации могут быть использованы для выявления транспозона *mariner* в образцах геномной ДНК исследуемого организма – *Himasthla elongata*.

Определение последовательности *hem1* и полноразмерного элемента *hemarI*

Для выявления транспозонов семейства *mariner* в геноме *H. elongata* применяли успешно используемый подход: ПЦР-анализ с вырожденными праймерами к консервативным на аминокислотном уровне мотивам ORF транспозазы. Результатом такого ПЦР стал продукт длиной 500 н.п. (Рис. 8, А). Секвенирование продукта определило его как участок гена, кодирующего транспозазу гомологичную (>80%) транспозазе *mariner* из генома турбеллярии *Girardia tigrina*. Амплифицированный участок назван Hem1 (Галактионов и др., 2009). Для определения полноразмерной последовательности использовали методы частично неспецифического ПЦР (5' конец) и обратного ПЦР (3' конец) (Рис. 8, Б). Молекулярный состав полноразмерной копии *hemarI* характерен для представителей семейства *mariner*. Длина последовательности составляет 1237 н.п. и включает в себя одну ORF, потенциально кодирующую продукт длиной 339 а.к., а также 5' UTR и 3' UTR 156 п.н. и 45 п.н. соответственно. 5' UTR содержит предсказанный TATA box, в то время как 3' несет предсказанный сигнал полиаденилирования. ORF *hemarI* несет множество замен негативного знака, в связи с чем полностью утратила способность к перемещению (рис. 9). Для того чтобы транслировать ORF *in silico*, в последовательности ограниченные праймерами Mar-124F и Mar-276R введен ряд сдвигов рамки считывания (Рис. 9, 10). Базы данных содержат только аминокислотные последовательности *mariner* между конвенционными праймерами и сдвиги рамки считывания в *hemarI* введены в этом участке для адекватного сравнения (Рис. 11). В транслированной последовательности выявлены: транспозазный мотив, характерный для транспозонов *mariner*; helix-turn-helix мотив (25% сходства с известными базами данных мотивами этого класса); консервативный каталитический мотив

D,D(34)D, служащий маркерным признаком транспозонов *mariner* (Рис. 4, 9) (Galaktionov et al., 2011).

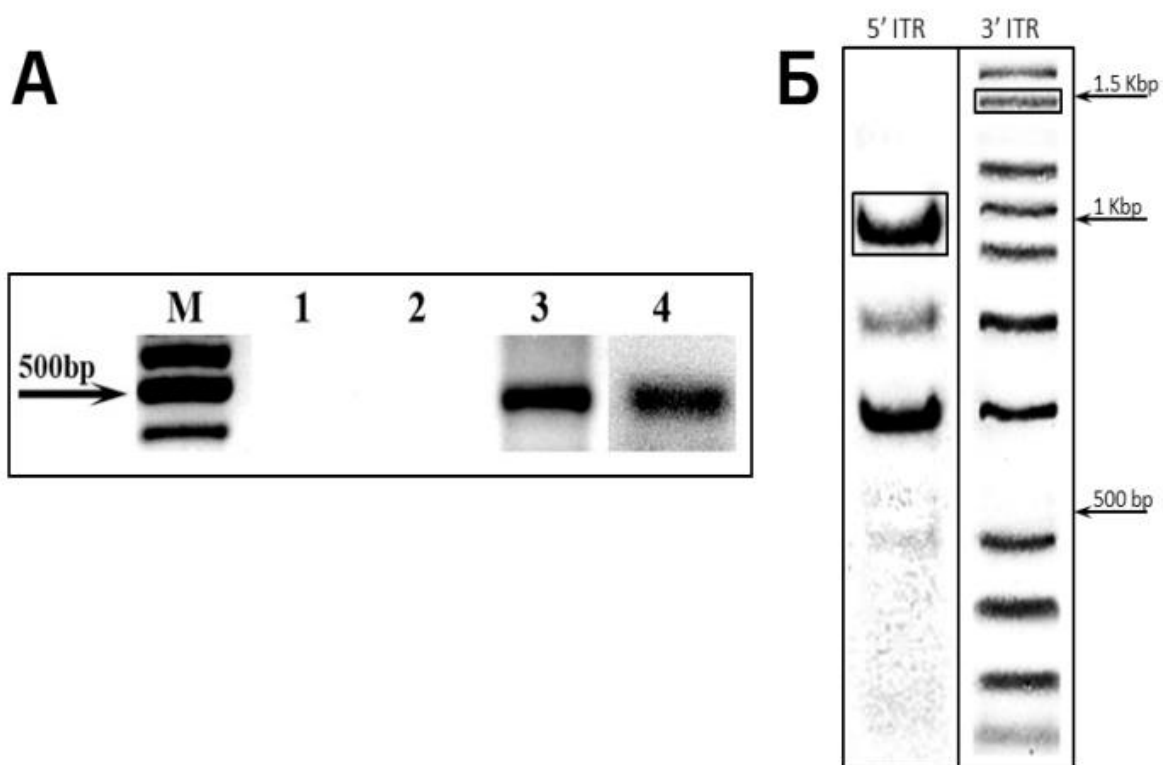


Рис. 8. Выявление полноразмерной последовательности *hemarI* в геноме *H. elongata*.

А: Амплификация последовательности *HemI* с использованием вырожденных праймеров Mar-124F и Mar-276R: М- маркер; 1- контроль без ДНК; 2- ДНК *E.coli*; 3- ДНК человека; 4- ДНК *H. elongata*. В: амплификация 5' и 3' UTR и ITR *hemarI*: 5' ITR - частично неспецифический ПЦР; 3' ITR – инвертированный ПЦР. Зоны, содержащие последовательности 5' и 3' UTR и ITR *hemarI* в рамке.

1	TTTGTGTGTTCTACaAgaTTTtCCGATGTGGCAAGTGTTATATACTATTAGAAAGCCCGTGTCTATGCTCCCAATATTA	83
84	AAGCAATCATTTTGGCTATATTATTTGTGCTGTGAAGCACCGTAGAA ATG ATT GTC AAG TCG ACA AAA AAA	157
1		8
158	TTG CTT TTA CGA TAC CTC CTT CTT TTT GCT TTT AAT CGA GGT AAA AAA GCG AGT GAA GCC AGC	220
9	L L L R Y L L L F A F N R G K K A S E A T	29
221	AGA GAT ATT TGT GCC GTG TAT GGA GAG GAC GCT ATA GCT GAG AGA ACT GAT CGG GAT TGG TTT	283
30	R D I C A V Y G E D A I A E R T D R D W F	50
284	GCC AGG TTC CAA TAC GAT AAT TTT GAC TTC AAC GAC GCT CCT TGT TCT AAA AGA CCA GTT GAG	346
51	A R F Q Y D N F D F N D A P C S K R P V E	71
347	ATG GAC GAG GAC CAA CTC AGT GAT CTT TTG AAG GAA AGT GGC CGC CAG ACA TGC AGA GAA TTG	409
72	M D E D Q L S D L L K E S G R Q T C R E L	92
410	GGT GAA AAA ATG AAT TGT GAT TTT GTG ACA AGT TCA CGC CAC CTT CAG TCG ATG GGT ATC ACT	472
93	G E K M N C D F V T S S R H L Q S M G I T	113
473	CGA <u>AGG CTT</u> GGA GCT <u>TGG GTT</u> <u>CCG CAT</u> <u>GAG CTC</u> ATC CAA AAG CAG <u>AGG GAT</u> <u>TTG CCG</u> <u>CT TCC</u>	534
114	R K L G A W V P H E L I Q K Q K D L P # S	133
535	ATT GCT GCT TCA AAT CTC GCT CGA CAC CAA GGA ACC CAT GGA CAC AGG CAA CGT TTC TTA TAC	597
134	I A A S N L A R H Q G T H G H R Q R F L Y	154
598	AGA ATC GTT ACT GGA <u>GAC</u> GAG AAA TGG TGT CTC TAT GTG AAT AT TAG GCA AAG GAA TGA GTG GG	661
155	R I V T G <u>D</u> E K W C L Y V N #Y * A K E * V# G	174
662	TTT OCT GGA GAG AAG OCT GAG OCT GGG ATC AAG AAA CAC CTG CAC TTG ACG AAG ACA ATG ATT	724
175	F P G E K P E P G I K K H L H L T K T M I	195
725	TGC GTA TGG TGG GAT TGG GAA GGT CTA ATC CAC TGG GAA ATG CTT GGA AAG AAC ATG ACA GTA	787
196	C V W W D W E G L I H W E M L G K N M T V	216
788	GAG AAG AAT CTC TAT AAA GCC CAA TTG CAT CAA GTC A AIT CAA CAA AAA AGA <u>CCG GAT</u> CGA CAA	851
117	E K N L Y K A Q L H Q V # I Q Q K R P D R Q	237
852	GGC CAG GTG ATC CTC CTC CAT <u>GAC</u> AAT GCT CGG CCC AC ACC TCA AAA ACT GTC AAG ATG GCA	913
238	G Q V I L L H <u>D</u> N A R P# H T S K T V K M A	258
914	CTC CAA GAG CTC <u>CGG</u> TGG GAG GTC CTT CAA CAT OCT CCC <u>TAC ACC</u> <u>CCG GAC</u> <u>TGG CCC</u> CAT ACT	976
259	L Q E L R W E V L Q H P P Y t P D s P H T	279
977	<u>GAC</u> TAT CCG ATC TTG TGC GCA ATA ACT AAT CAG ATG AGT GGT GTA ACG TTT GAT GGC GAG GAG	1039
280	<u>D</u> Y P I L C A I T N Q M S G V T F D G E E	300
1040	GAA TTA AAG AAC TGG GTA AAG AAC TTT TTC GAC ACG AGA CCC AGA AAT TTC TGG AGT AAY GAY	1102
301	E L K N W V K N F F D T R P R N F W S N D	321
1103	AIT AAT AAA TTT GTA GAA GAG TAT ATG ATA GAG TAA TAAACATTCAGAATTAACTAAGACTGGTGGTCAC	1173
322	I N K F V E E Y M I E Z	332
1174	TATCTTGGTCTGTGCTACCCATTATAATAGTAAACATCGCTAAAagTTcGTAGAACAACAAaAA	1237

Рис. 9. Полноразмерная последовательность транспозона *hemarI*

Инвертированные концевые повторы выделены жирным курсивом, ТАТА-бокс и сигнал полиаденилирования обозначены верхним подчеркиванием, мотив “helix-turn-helix” дважды подчеркнут, транспозазный домен выделен жирным подчеркиванием, аминокислотные остатки “D,D34D”, составляющие каталитический мотив транспозазы обведены, сайты посадки праймеров подчеркнуты. Сдвиги рамки считывания обозначены #, терминальный стоп-кодон обозначен Z, остальные стоп-кодны обозначены *. Сдвиги рамки считывания искусственно введены в последовательность таким образом, чтобы получать максимальное сходство при выравнивании с близкими последовательностями *mariner*. В базе данных NCBI - последовательность под № JQ412055

Копии *hemarI* в геноме

Использование вырожденных праймеров к консервативному району транспозазы *mariner* и дальнейшее клонирование и анализ полученных клонов позволил выявить 2 гомологичные *hemarI* последовательности в геноме *H. elongata*, названные Hem2 и Hem3. Выравнивание последовательностей Hem1, Hem2 и Hem3 показало, что последовательности Hem2 и Hem3 представляют собой геномные копии *hemarI* (рис. 10). При этом Hem3 несет большее количество нуклеотидных замен (p-dist = 0.068), по сравнению с *hemarI*, чем Hem2 (p-dist = 0.007) (рис. 10, 11). Как и *hemarI*, последовательности транспозаз Hem2 и Hem3 несут замены, приводящие к инактивации этих элементов. Наличие негомологичных замен говорит о независимости мутационного процесса в геномных копиях *hemarI* (Galaktionov et al., 2014).

Hem1	1	ATCCAAAAGCAGAAGGATTGCGGCTT-CCATTGCTGCTTCAAATCTCGCTCGACACCAAGGAACCCATGGACACAGGCA	79
Hem2	1	T.....A.....	80
Hem3	1	...C...---.CGA.G.....TACCAAT.....A..C.....	76
Hem1	80	ACGTTTCTTATACAGAATCGTTACTGGAGACGAGAAATGGTGTCTCTATGTGAATATTAGGCAAAGGAATGAGTGGGTTT	159
Hem2	81	G.....	160
Hem3	77	G.....	156
Hem1	160	CCTGGAGAGAAGCCTGAGCCTGGGATCAAGAAACACCTGCACTTGACGAAGACAATGATTGCGTATGGTGGGATTGGGA	239
Hem2	161		240
Hem3	157		236
Hem1	240	AGGTCTAATCCACTGGGAAATGCTTGGAAGAACATGACAGTAGAGAAGAATCTCTATAAAGCCCAATT-GCATCAAGTC	318
Hem2	241		319
Hem3	237	T.....	316
Hem1	319	AATTCAACAAAAAGACCGGATCGACAAGGCCAGGTGATCCTCCTCCATGACAATGCTCGGCC-CACACCTCAAAAACTG	397
Hem2	320	A.....-...	398
Hem3	317	A.....-...	395
Hem1	398	TCAAGATGGCACTCCAAGAGCTCCGGTGGGAGGTCCTTCAACATCCTCCC	447
Hem2	399		448
Hem3	396		445

Рисунок 10. Сравнение клонированных геномных копий Hemar. Выравнивание нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов (Hem1, Hem2, Hem3). 5' и 3' праймеры на концах удалены. Стрелки указывают на сайты рестрикции MspI. Подчеркнуты сверху тринуклеотиды, которые соответствуют каждому из оснований D,D34D каталитическому домену (рис. 4)

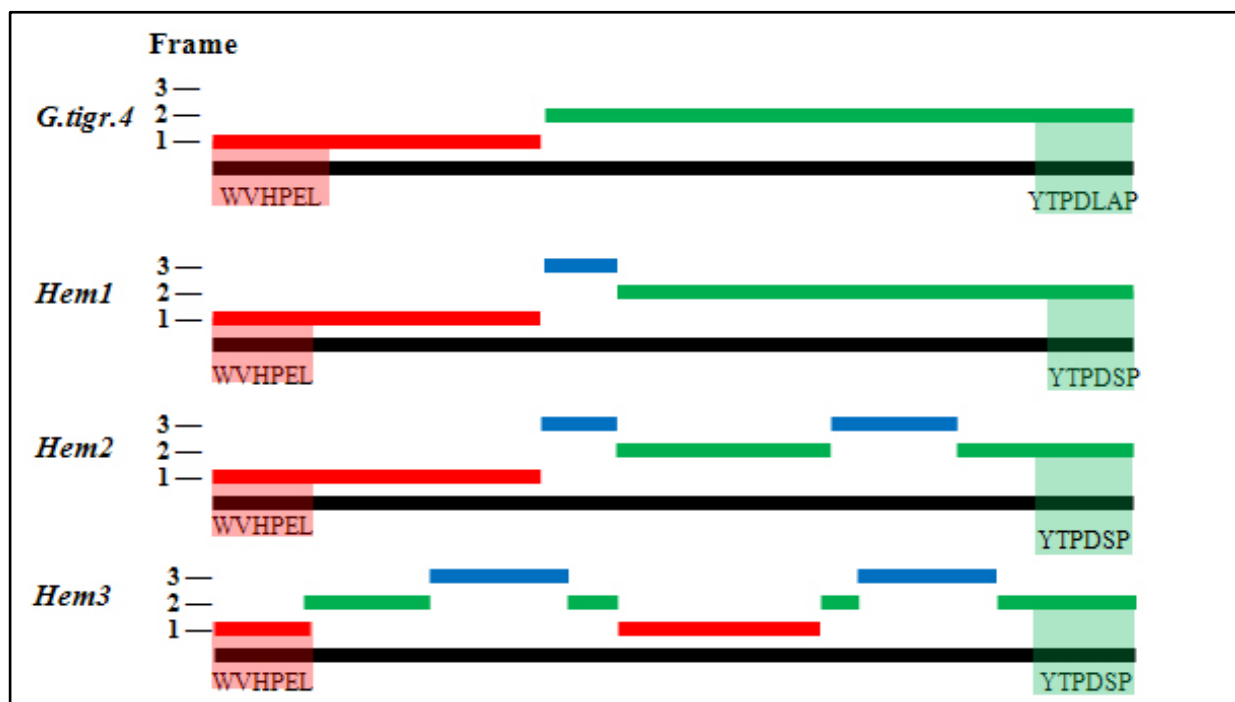


Рисунок 11. Сдвиг рамки считывания в аминокислотных последовательностях клонированных фрагментов. Фиксированные олиго пептиды выделены цветом. Каждая из возможных рамок считывания выделена цветом: 1я – красным, 2я – зеленым, 3я – синим. Введены сдвиги между разными рамками считывания, чтобы получить максимальное совпадение без стоп кодонов.

Организация транспозона *hemarI* в геноме

Методом проточной цитофлуориметрии интерфазных ядер *H. elongata* определили размер гаплоидного генома в 0.25 п.г. ДНК, что соответствует $\sim 1.22 \times 10^9$ п.н. (Galaktionov et al., 2014). Данные совпадают с размером генома других трематод (табл. 4).

Таблица 4. Размены геномов ближайших к *H. elongate* трематод. Данные плучены из сервиса <http://www.genomesize.com/results.php?page=1> (Gregory, T.R.,2013). FIA - Feulgen Image Analysis Densitometry, FCM – Flow Cytometry.

Species	C-value	Method	Standard species	Reference
<i>Trichobilharzia ocellata</i> (Trematoda, Digenea, Schistosomatidae)	1.14	FIA	<i>Gallus domesticus</i>	T.R. Gregory.
<i>Trichobilharzia regenti</i> (Trematoda, Digenea, Schistosomatidae)	1.31	FIA	<i>Gallus domesticus</i>	T.R. Gregory. Unpublished Data
<i>Trichobilharzia szidati</i> (Trematoda, Digenea, Schistosomatidae)	1.06	FIA	<i>Gallus domesticus</i>	T.R. Gregory. Unpublished Data
<i>Diplostomum pseudospathaceum</i> (Trematoda, Digenea, Diplostomidae)	0.89	FIA	<i>Gallus domesticus</i>	T.R. Gregory. Unpublished Data
<i>Himasthla elongata</i> (Trematoda, Digenea, Echinostomatidae)	~1.25	FCM	<i>Mus musculus</i> (splenocytes)	Galaktionov et al., 2014

Метод Дот-гибридизации (Рис. 12, I) с последующий денситометрией позволил установить, что выявленная последовательность принадлежит геному *H.elongata* и составляет около 0.01% от размера генома. Саузерн-блот геномной ДНК с зондом *HemI* показал, что в геноме есть одиночные копии и кластеры (Рис. 12, II, B). Геномная ДНК, обработанная рестриктазой *MspI*, дает сигнал гибридизации соответствующий зоне около 90 п.н. Компьютерный анализ последовательности *hemarI* показал два сайта для рестриктазы *MspI* (Рис. 7). Размер выявленного фрагмента соответствует расстоянию между ними (Рис. 12, II B). Гибридизация ДНК, обработанной рестриктазами *MspI* и *HpaII* (Рис. 12, I B дорожки 4, 5) показывает, что ДНК не подвержена существенному метилированию, что согласуется с данными об отсутствии метилированного цитозина у плоских червей (Musto et al, 1994, Galaktionov et al., 2010).

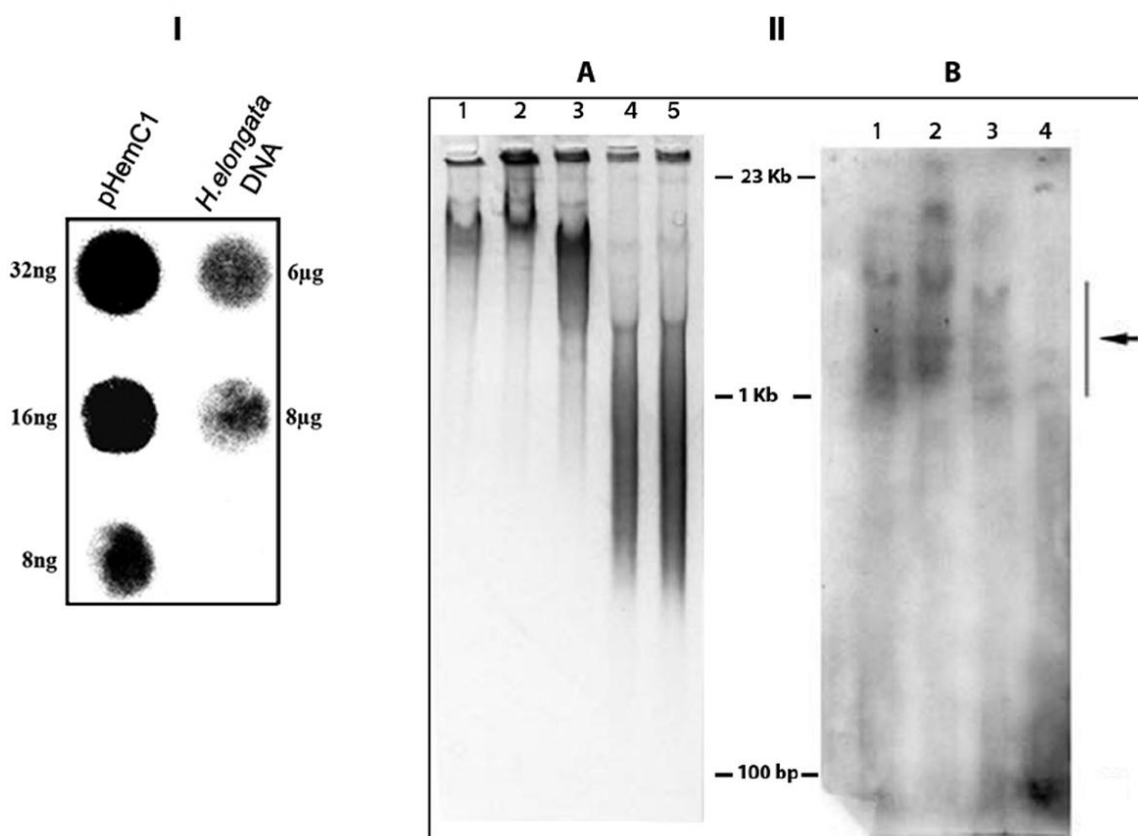


Рис. 12. Определение относительного количества транспозона *hemar1* (I) и его распределения в геноме *H. elongata* методом гибридизации по- Саузерну (II).

I: Дот- блот гибридизация радиоактивно меченного Hem1 с плазмидой несущей Hem1 (pHem1) и геномной ДНК *H. elongata*. Концентрация нанесенной ДНК обозначена. II: (A) рестрикция геномной ДНК *H. elongata*: 1 – HindIII; 2 – EcoRI; 3 – BamHI; 4 – MspI; 5 – HpaII; (B) Гибридизации с фрагментом Hem1: Номера рестриктаз наверху соответствуют номерам на панели A. Положение маркерных фрагментов отмечено между панелями A и B. Стрелкой отмечено положение сигнала 90 н.п. Линией отмечено положение одиночных копий и их кластеров.

Для определения локализации транспозонов *mariner* в интерфазных ядрах клеток *H. elongata* использовали метод флюоресцентной гибридизации in situ (FISH) с зондом Hem1. Ядра *H. elongata* относительно небольшие, диаметром около 8 μm . FISH позволил выявить множественные сигналы гибридизации, распределенные по всему ядру (Рис. 13).

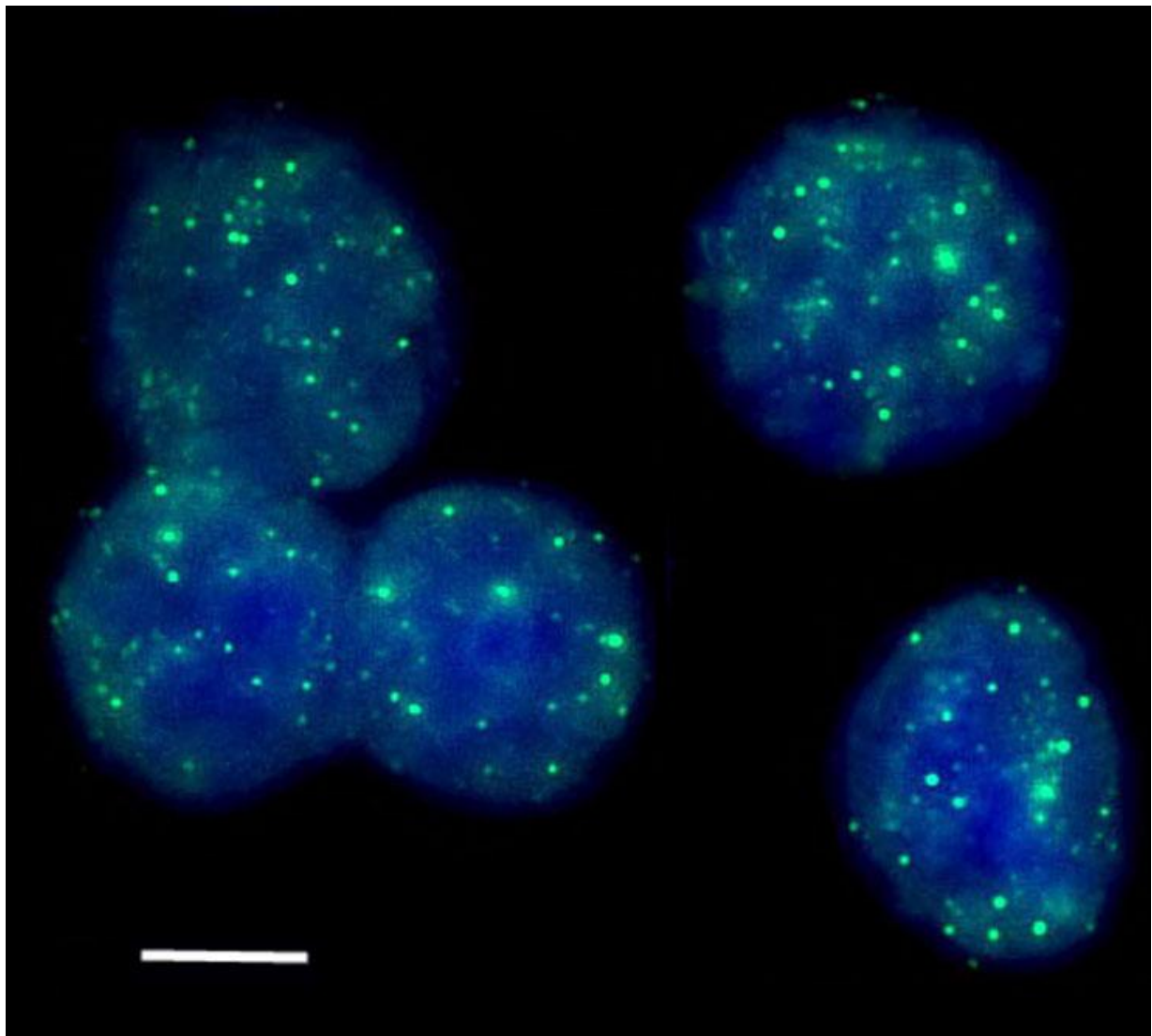


Рис. 13. Флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) ядер редий с плазмидой pHem1. Зонд pHem1 помечен Cy5 dUTP (красный), ядра окрашены DAPI (синий).

Выявлено два типа сигналов: яркие сигналы (~ 15 на ядро) и меньшие по размеру сигналы (~ 30 на ядро). Меньшие по размеру сигналы соответствуют одиночным копиям *hemar1*, в то время как яркие говорят о кластеризации последовательностей *hemar1* в геноме *H. elongata* (Galaktionov et al., 2013). Эти результаты согласуются с результатами гибридизации по Саузерну. Таким образом, *hemarI* действительно диспергированный элемент генома.

***HemarI*-подобные транспозоны в геномах эукариот**

Сравнение *hemarI* с секвенированными представителями семейства Tc1\mariner из геномов эукариот

Для того чтобы выявить последовательности *mariner*, сходные с консервативным участком ORF *hemarI*, выполнен поиск сходных с Hem1 MLE среди всех известных геномных последовательностей в базах данных WGS (whole genome sequences) и базе данных nr (non redundant). Видно, что в одном геноме могут соседствовать MLE, относящиеся к разным подсемействам *mariner* (Рис. 14). Так, геном *Girardia tigrina* (Turbellaria; Dugesiiidae) содержит множество копий MLE - 13, принадлежащих разным подсемействам *mariner* (Robertson, 1997). Только один из них демонстрирует наибольшую степень сходства с Hem1 (p-distance = 0.177) — *G. tigrina*_DTU51176. Следующие по степени гомологии MLE принадлежит геномам *Forficula auricularia* (Arthropoda; Insecta) (p-distance = 0.37) и *Hydra vulgaris* (Cnidaria; Hydrozoa) (p-distance = 0.395) (Рис. 14). Остальные MLE *G. tigrina* формируют линию в интервале p-distance 0.5–0.7, так же как и MLE насекомых. MLE гидры формируют группу с p-distance ~0.4, что свидетельствует об их большем сходстве с *hemarI*, чем у большинства MLE насекомых.

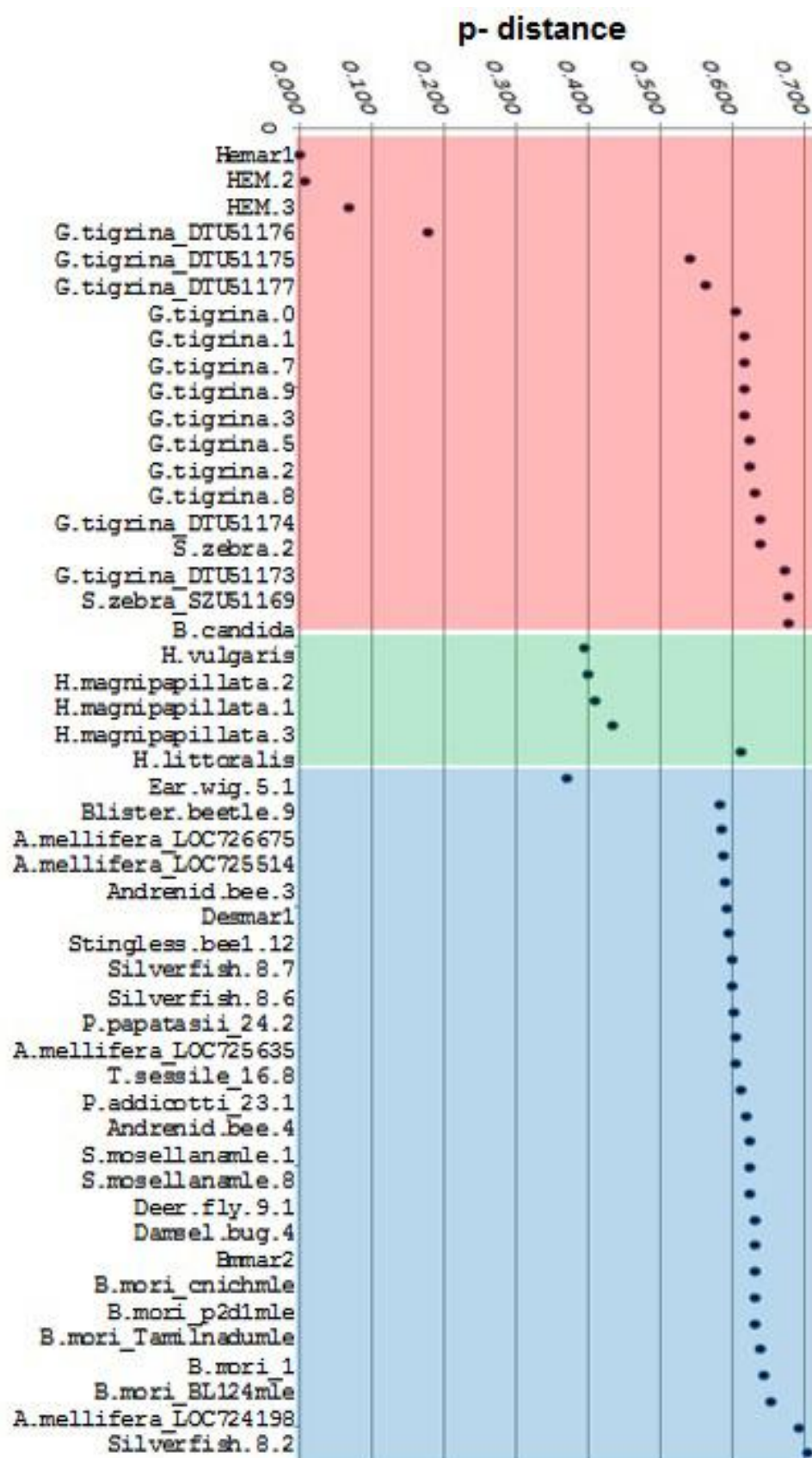


Рис. 14. Степень сходства между Hemar1 и MLE разных видов.

Ось абсцисс – p-distance, Ось ординат – клоны *mariner* из различных животных.

Hemar1* в геномах хозяев *H. elongata

H. elongata паразитирует в широком круге филогенетически удаленных хозяев. Для того чтобы установить содержат ли геномы хозяев последовательности, подобные *hemar1*, его консервативный район Hem1 гибридизован с геномной ДНК первого (*L. littorea*, *L. saxatilis*) и второго (*M. edulis*) промежуточных и окончательного (*L. argentatus*) хозяев *H. elongata* (Рис. 15, А).

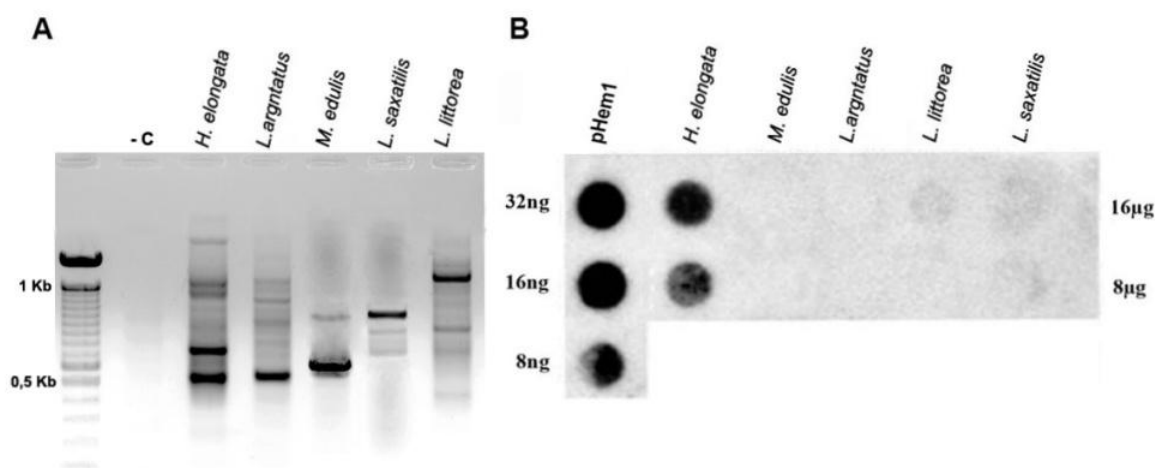


Рис. 15. Выявление последовательностей *mariner* в геномах хозяев *H. elongata* и определение их степени сходства с *hem1*. А – ПЦР с геномной ДНК с праймерами Mar-124F and Mar-276R (см. таблицу). В – Дот гибридизация радиоактивно меченного зонда Hem1 с плазмидой pHem1 и геномной ДНК *H. elongata* и ее хозяев. Виды животных обозначены сверху. Указано количество нанесенной ДНК.

Зонд Hem1 гибридизуется с геномной ДНК *L. littorea* и *L. saxatilis* (рис. 15, Б). Амплификация геномной ДНК литорин праймерами Mar-124F и Mar-276R позволила выявить мажорные зоны 800 н.п. (*L. saxatilis*) и 1000 н.п. (*L. littorea*) и не дала ожидаемой зоны 500 п.н. (рис. 6). Видимо, элементы *mariner* есть в геномах всех хозяев, однако их сходство с *hemar1* невелико. (Galaktionov et al., 2014)

Вариабельность геномов партенит и церкарий *H. elongata* и использование транспозона *HemarI* для ее выявления.

Метод AFLP выявляет внутри- и межклональную изменчивость партенит *H. elongata*

Различия в поведенческих реакциях и успехе инвазирования второго промежуточного хозяина церкариями, представляющими один клон, позволяют предположить генетическую основу изменчивости особей внутри клона *H. elongata* — клональную вариабельность. Для выявления такой вариабельности применен метод AFLP.

В своей работе Вос с коллегами (Vos et al., 1995) установили, что обработка рестриктазами *EcoR1* и *Mse1* и последующая амплификация рестриктов дает наиболее репрезентативную картину разделения амплификатов. Для рестрикции геномной ДНК церкарий использовали как *EcoR1*, так и совместную рестрикцию *EcoR1/Mse1*. Совместная рестрикция, амплификация рестриктов (собственно AFLP), разделение амплификатов в секвенирующем геле и автордиография результатов позволила выявить полиморфный набор фрагментов. Большинство фрагментов имеет размер ниже 500 н.п. (Рис. 16, I (1-3)). Рестрикция *EcoR1* дала набор зон, подавляющее количество которых обладали молекулярной массой более 500 н.п. (Рис. 16, I (4), II).

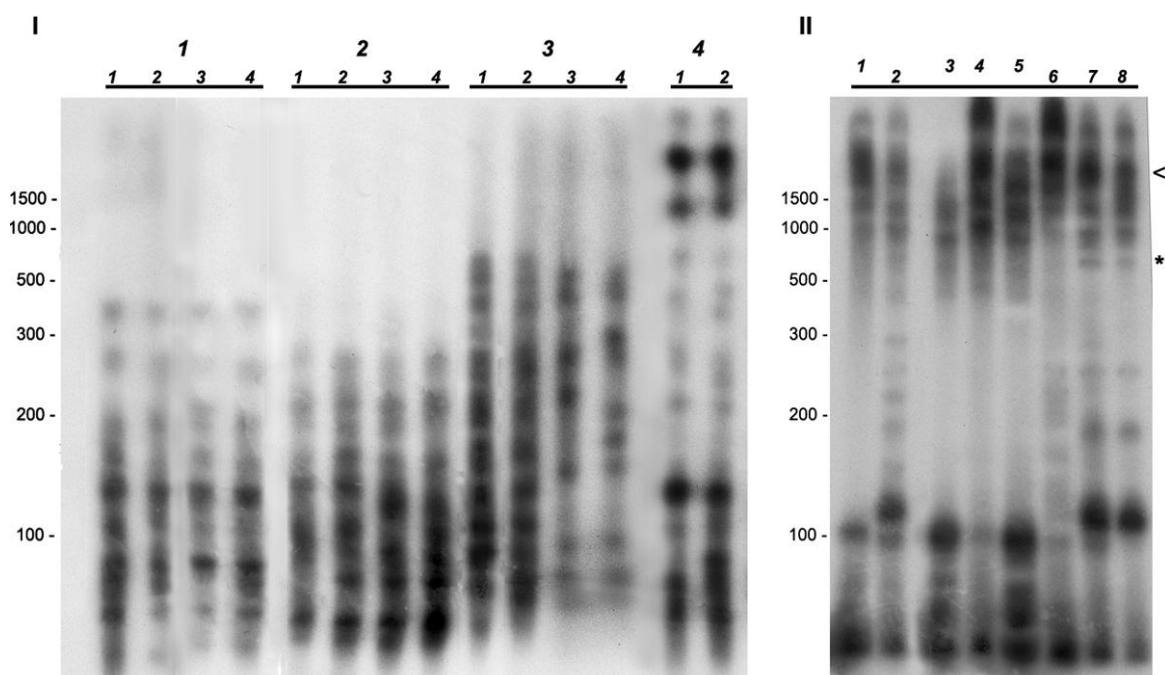


Рис. 16. Авторадиограмма продуктов электрофоретического разделения AFLP фрагментов.

I – большие цифры – номер моллюска; малые цифры – единичные церкарии из каждого моллюска. 1-3 – совместная рестрикция *EcoR1*/*MseI*; 4 – рестрикция только *EcoR1*;

II – рестрикция только *EcoR1*; все церкарии принадлежат одному клону. Области представленные консервативными (<) и вариабильными (*) зонами маркированы справа. Размеры маркерных фрагментов в п.н. показаны слева от каждой панели.

В наборе зон после совместной обработки *EcoR1* и *MseI* есть консервативные зоны, которые выявляются как у церкарий одного клона, так и у принадлежащих разным клонам. Кроме того, обнаружены вариабельные зоны, которые различаются у разных особей церкарий (изолятов), принадлежащих одному клону (Рис.16, I (1-3), 17). Положение консервативных зон неизменно при разделении изолятов одного клона. Анализ же фингерпринтов, полученных из церкарий, принадлежащих разным клонам показал, что позиция консервативных зон на внутриклональном уровне может меняться на 20–50 п.н. (Рис. 16). Вариабельные зоны выявлены в пределах 300–100 п.н. Выделены два типа зон: уникальные зоны, характеризующие отдельную особь внутри клона церкарий, и зоны, чье положение варьирует в пределах 20–50 п.н. у особей церкарий и характеризует клон в целом. Последние могут представлять аллельные варианты

последовательностей, наличие же уникальных зон свидетельствует о появлении новых сайтов рестрикции.

Обработка *EcoR*I выявляет полиморфные и консервативные полосы на уровне отдельных церкарий одного клона *H. elongata* (Рис. 16, I (4), II, 17).

Использование коэффициента подобия генотипов Жаккара и дальнейшей кластеризации результатов методом главных компонент (Рис. 17) позволили установить, что рестрикция *EcoR*I/*Mse*I четко разделяет как церкарий – представителей разных клонов, так и выявляет внутриклональную изменчивость отдельных особей церкарий.

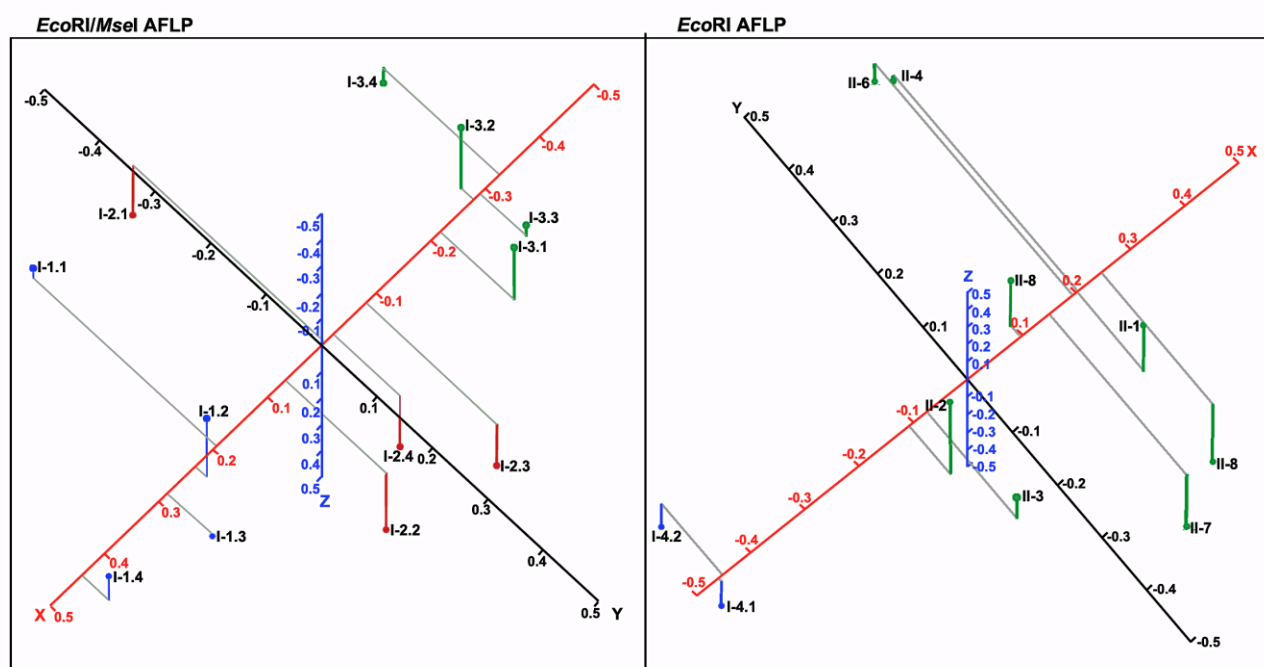


Рис. 17. Анализ генетического сходства отдельных особей церкарий, внутри клона и между клонами основанный на положении полос электрофоретического разделения AFLP (коэффициент Жаккара). Кластеризация результатов осуществлена методом главных компонент на 3-х мерной условной координатной оси. Подписи около точек соответствуют нумерации клонов на рис.16; линии, ведущие к каждой точке, отмечают ее смещение по соответствующей оси (X, Y и Z); цветом по оси Z отмечена группа церкарий, выделенных из одной редии.

Использование *EcoR*I также позволяет выявлять как внутри-, так и межклональную изменчивость, однако высокая гетерогенность зон внутри клона

делает невозможным четко кластеризовать принадлежащих одному клону церкарий.

Коэффициент Жаккара учитывает сходство\различие в распределении всех полос на дорожке и оценивает его в интервале от 0 до 1. Представленная в условных 3-х координатах (X,Y,Z) разница оценивается от -0.5 до +0.5. Таким образом, появляется возможность формализовать сравнение распределений, полученных после разных разделений. Так, оказалось возможно сравнить распределение полос у разных клонов после рестрикции *EcoR1/Mse1* и *EcoR1*. При сравнении распределений для *EcoR1* виден существенно более высокий уровень полиморфизма, чем в случае рестрикции *EcoR1/Mse1* (Рис.17, *EcoR1* AFLP).

При обработке *EcoR1* выявляются полиморфные фрагменты на уровне внутриклональных изолятов церкарий *H. elongata*. При этом уровень межклональной изменчивости значительно выше (Рис. 17). Совместная обработка *EcoR1/Mse1* дает сходную картину, однако, в связи с тем, что низкомолекулярные фрагменты более гетерогенны, разница между внутри- и межклональной вариабельностью менее очевидна. Одинарная рестрикция подходит для определения межклональной изменчивости; двойная рестрикция с очевидностью показала, что особи *H. elongata* вариабельны в пределах клона.

Применение транспозона *HemarI* для специфического TID в геномах церкарий *H. elongata*

Для того чтобы определить, полиморфно ли распределение транспозона *hemarI* внутри и между клонами церкарий (Рис. 18, I) использован метод TID (схема 2). Геномная ДНК рений и церкарий обработана рестриктазой *HindIII*. Она имеет единственный сайт узнавания в последовательности *hemarI* (рис.4) (Galaktionov et al., 2014). Для амплификации рестриктов использовали только праймер, специфичный к адаптерной последовательности, лигированной на 5' липкие концы *HindIII* рестриктов (*Hind*+*cag*) (нечетные дорожки на рис. 18, II), так и совместно с

вырожденным обратным праймером к последовательности *hemarI* (Mar276R) (четные дорожки на рис. 18, II).

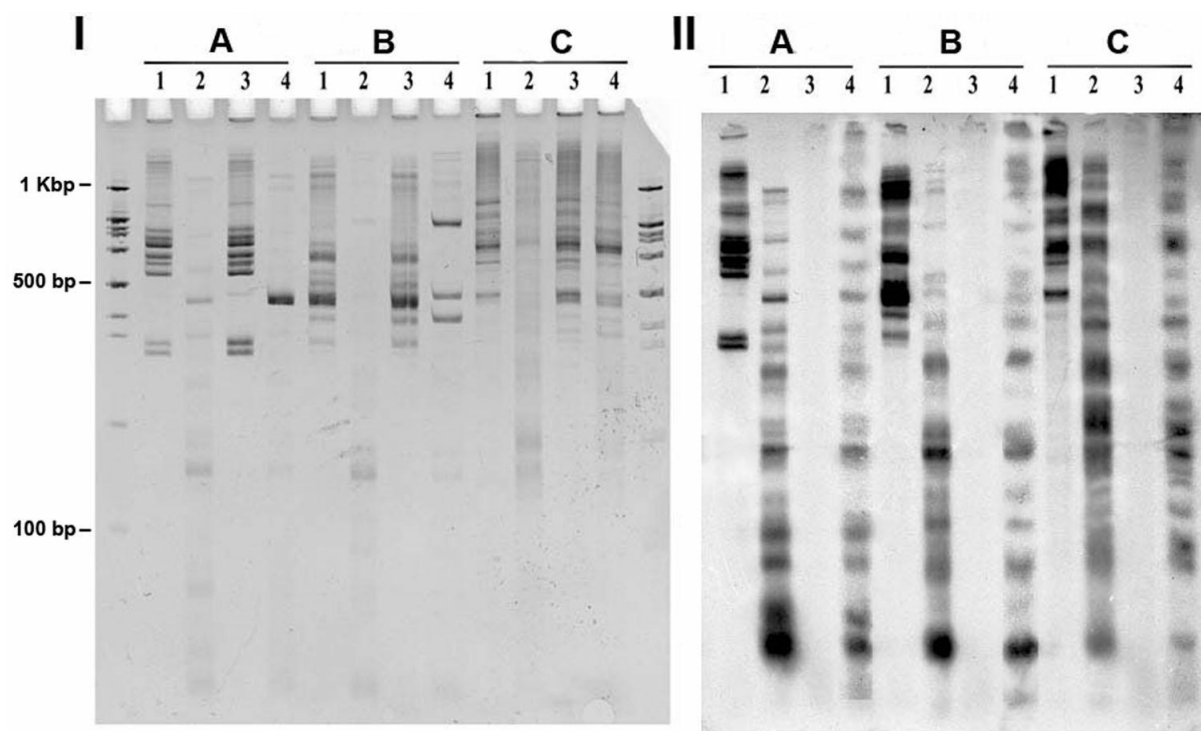


Рисунок 18. Селективная амплификация (2й раунд ПЦР, схема 2) на ДНК из 3х церкарий после электрофореза (I) и автордиографии (II). 6% секвенирующий гель. Использованы следующие праймеры: 1—Hind+cag*; 2—Hind.cag*\Mar-276R, 3—Hind+cag; 4—Hind+cag\Mar-276R*. (*) – праймер радиоактивно помечен. Величина маркерных фрагментов указана слева в парах нуклеотидов.

В случае Hind+cag выявлен полиморфный набор высокомолекулярных (от 500 н.п. и выше) зон как на внутрикланальном, так и на межклональном уровне. Добавление же в реакцию Mar276R существенно меняет картину (Рис. 19, II, III), сильно увеличивая как количество зон, так и их распределение. Наиболее полиморфные паттерны смещаются в область 200–400 н.п., при этом повышается полиморфизм зон как на внутрикланальном, так и на межклональном уровне (Galaktionov et al., 2014).

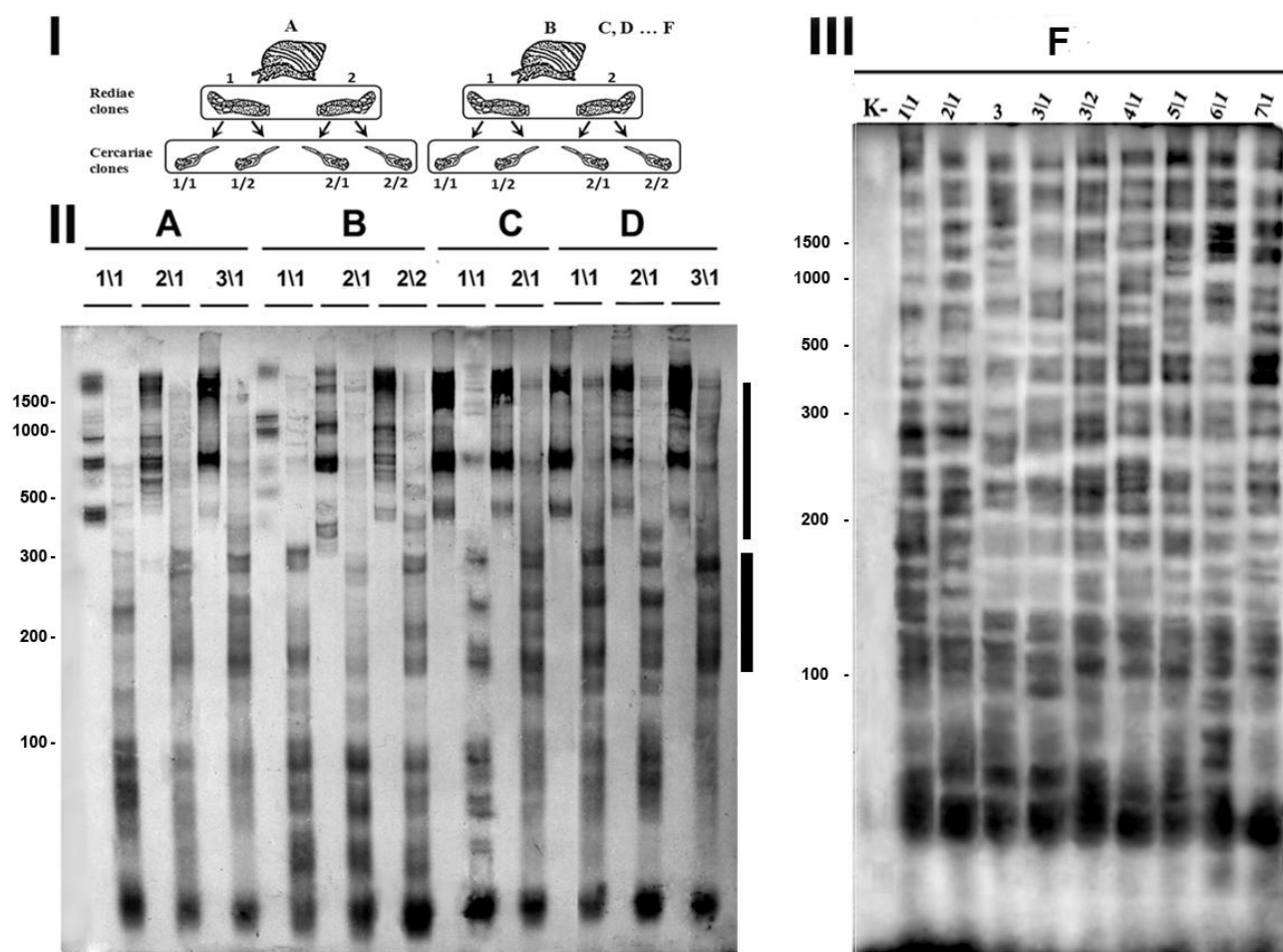


Рисунок 19. Номенклатура клонов, использованных для TID (I) и автордиограмма продуктов TID из одиночных церкарий (II, III).

I – Буквами (A–D) обозначены особи моллюсков-хозяев. Цифры до разделительной черты — редии; цифры после разделительной черты — церкарии из соответствующей редии.

II – с ДНК каждой церкарии поставлены 2 реакции TID с праймерами: Hind+cag* (первая дорожка) и праймеры Hind+cag*\Mar276R (вторая дорожка). Вертикальными линиями слева обозначены: два переменных района — толстая линия (200–400 н.п.) и тонкая линия (500–1000 н.п.). Размеры маркерных фрагментов в п.н. показаны слева от панели. 6% секвенирующий гель.

III – только праймеры Hind\cag* \Mar276R использованы для ПЦР на ДНК церкарий из одной редии (F). На дорожке “3” — результат ПЦР на ДНК пустой редии: именно из этой редии получены церкарии 3\1 и 3\2. Слева линией отмечен переменный район с фрагментами длиной от ~500 до ~1500 н.п. Автограф 6% секвенирующего геля.

Зоны гетерогенны по всей длине автографа. Выделяются и консервативные полосы различной подвижности в геле. Такие зоны встречаются как в области

выше 500 н.п., так и области ниже 200 н.п. Наблюдаемые различия между церкариями – изолятами из разных редий – примерно соотносятся с полиморфизмом зон разделения амплификатов ДНК церкарий, выделенных из одной редии. Наблюдается полиморфизм между самой редией и производными церкариями.

Использование праймеров, основанных на последовательности *hemarI*, выявляет клональный полиморфизм. До определения последовательности фрагментов нельзя утверждать, что *hemarI* является основным источником полиморфизма. Однако, по условиям постановки TID его участие в геномных перестройках вполне возможно.

Активные копии *hemarI* транскриптоме редий

Транскрипционную активность *hemarI* проверили методом RT-PCR с *Hemar1* специфичными праймерами (табл. 1) на матрице полиА-РНК из церкарий. Несмотря на то, что все клонированные копии *Hemar* инактивированы (рис. 10, 11) активная копия транскрибируется в геноме. Следовательно, *Hemar* может быть источником наблюдаемой клональной изменчивости.

Т.о. не все копии *Hemar* несут инактивирующие мутации, приобретенные, возможно, миллионы лет назад, но даже в настоящее время их транскрипция, а следовательно и перенос, оказывается возможным. Но никаких следов недавнего переноса *Hemar* между удаленными видами мы не обнаружили.

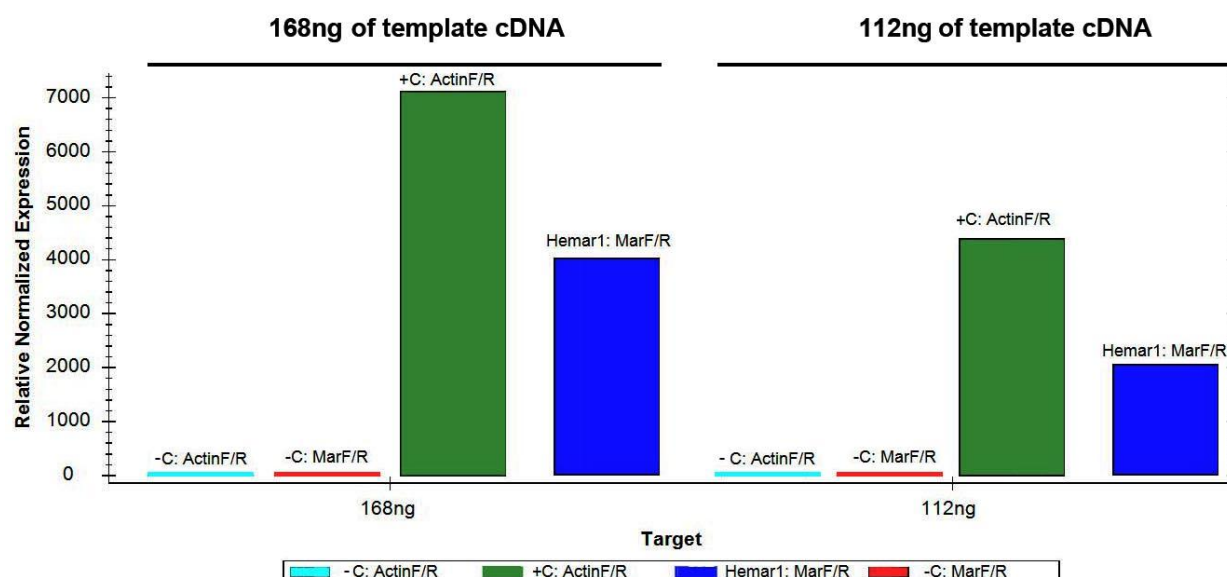


Рисунок 20. Относительное количество транскриптов *Hemar1* в транскриптоме церкарий. Определено после 1го шага SYBR Green real-time RT–PCR. Показаны результаты 2х экспериментов. Смесь церкарий из разных моллюсков использовали для выделения РНК и получения кДНК. –С – нет кДНК; +С – положительный контроль (праймеры к гену актина); *Hemar1* – использованы праймеры прямой - *Hem1* специфичный (HeC1_F, Таблица 3).

Результаты работы показывают, что *hemarI* вряд ли является основой для горизонтального переноса в сложной паразит-хозяинной системе. Но в работе выявили как внутриклональный полиморфизм как между церкариями, так и между особями партенит. Более того, обнаружен внутриредийный полиморфизм церкарий. Установлено что генетически различаются между собой не только церкарии – потомки одной редии, но и все они отличны от исходного материнского генома. До определения последовательности фрагментов нельзя утверждать, что *hemarI* является основным источником полиморфизма. Однако, по условиям постановки TID, участие *hemarI* в геномных перестройках вполне возможно.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Субсемейство элемента *hemar1*

Комплекс методов молекулярной, клеточной и компьютерной биологии, использованный в настоящей работе, позволил выявить и охарактеризовать элемент *hemar1* из генома *Himasthla elongata*. Как и большинство секвенированных на сегодня MLE, элементы *hemar1* несут множественные замены, приводящие к сдвигам ORF и инактивирующие выявленные элементы (рис. 9, 10, 11).

Результаты изучения геномной организации транспозона *hemar1* методами Саузерн блотинга (Рис. 12) и *in situ* гибридизации (рис. 13) показывают, что элемент занимает порядка 0.01% генома и диспергирован. Последовательности, гомологичные *hemar1*, локализованы как единичные копии, так и в виде кластеров из нескольких копий элемента. Образование таких кластеров можно объяснить рекомбинационными процессами, проходящими между гомологичными копиями транспозонов. Выявление же высоко гомологичных копий *hemar1* — *hem2* и *hem3*, подтвердили мультикопийность транспозона *hemar1* (Galaktionov et al., 2014).

Выравнивание консервативных участков аминокислотных последовательностей характерных представителей известных подсемейств *mariner* и элемента *hemar1* с последующим анализом филогенетического расстояния (Рис. 21), позволил установить, что *hemar1* принадлежит к подсемейству *capitata*, так же как и гомологичный ему на 88% транспозон

пресноводной турбеллярии *Giardia tigrina* (клон G.tigrina DTU5117).

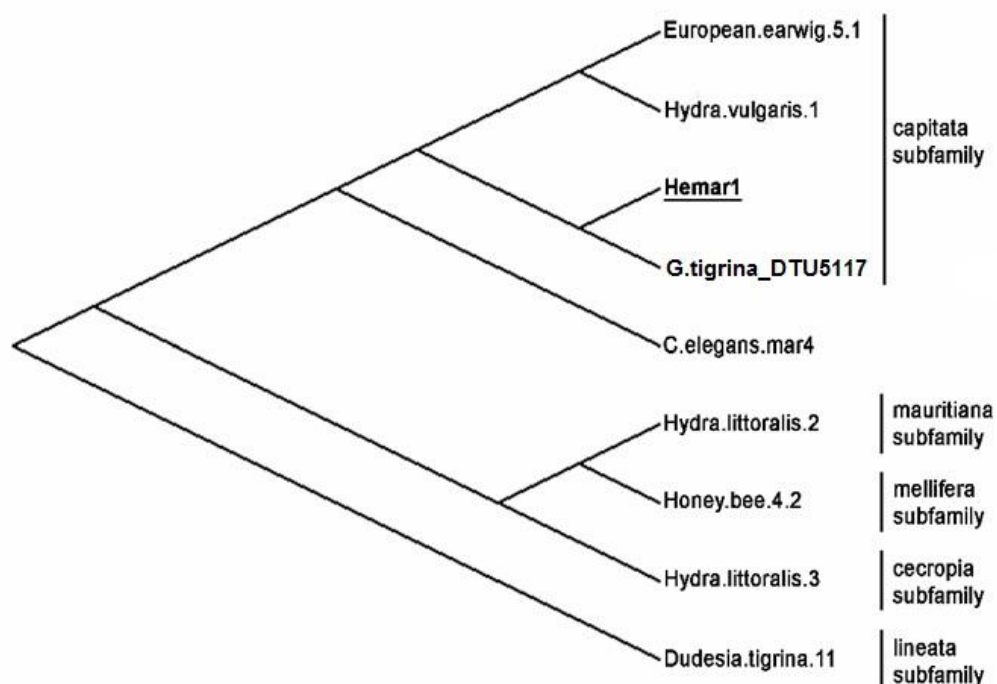


Рис. 21. Филограмма родства элементов *mariner*, основанная на выравнивании аминокислотных последовательностей MLE и *hemarI*. Указано название подсемейств к которым принадлежат использованные для сравнения элементы *mariner*.

Capitata — одно из наименее изученных подсемейств *mariner*. Его представители найдены только у беспозвоночных. При этом у насекомых, демонстрирующих все разнообразие MLE, последовательность, отнесенная к подсемейству capitata, выявлена лишь в геноме муравья *Forficula auricularia* (Insecta; Forficulina).

Изучение последовательности *hemar1* позволило впервые установить последовательности ITR элемента, принадлежащего подсемейству capitata. Выявленные ITR имеют низкий уровень сходства с ITR элементов *mariner*, найденных в базах данных. Интересно и то, что уровень сходства между инвертированными повторами элемента не коррелирует с таковым между транспозазами (рис. 22, приложение 2)

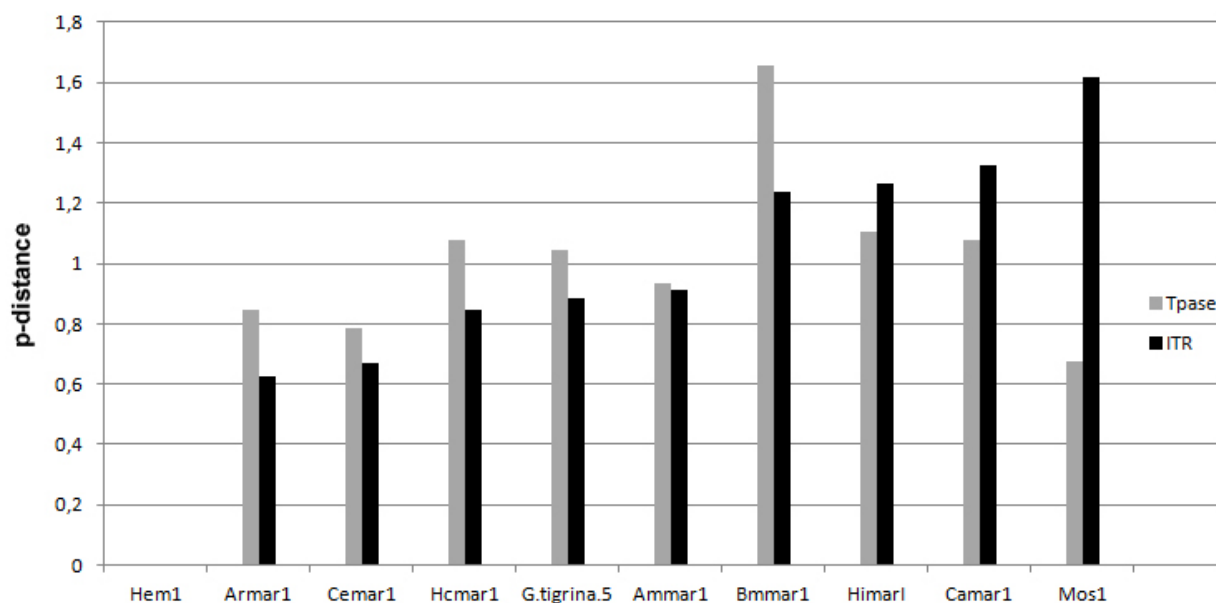


Рисунок 22. Степень сходства между парами последовательностей (p-distance): коровой последовательностью транспозазы (серый) и концевыми последовательностями (ITR, черный). *Hem1* выбран как базовая для сравнения последовательность, а степень сходства с собой принята за «0». .

Элементы *mariner* в геномах плоских червей изучены мало. Известно, что геном *Schistosoma mansoni* (Trematoda; Schistosomatoidea) несет доместифицированный участок транспозазы *mariner*, входящий в состав гена SETMAR. ITR же исходного MLE, необходимые для самостоятельного перемещения, при этом утрачены. В геноме *S. mansoni* до сих пор не найдено ни одной копии полноразмерной последовательности *mariner*, что подтверждает данные об эволюционной давности приобретения гена SETMAR (Shaheen et al., 2010).

Горизонтальный перенос на основе *mariner*

Мозаичность заселения геномов элементами *mariner* и высокая степень гомологии их последовательностей в геномах филогенетически удаленных организмов послужили основой для гипотезы о горизонтальном переносе (ГП). Но как ДНК-транспозон из одного генома мог попасть в другой? Должна

происходить прямая трансмиссия целой последовательности транспозона, которая может иметь успех лишь в случае взаимодействия организма-донора и организма-реципиента. Моделью, удовлетворяющей поставленным критерием представляется система паразит – хозяин. Действительно, в литературе имеются такие примеры. Как уже отмечалось в Обзоре литературы, в системе, состоящей из наездника *Ascogaster reticulates* и мотылька *Adoxophyes honma*, в личинку мотылька паразитоид откладывает яйца. *A. honma* служит кормом для вылупившихся личинок *A. reticulates*. В этой системе показана крайне высокая (98%) гомология нуклеотидных последовательностей *mariner*, выделенных из геномов паразитоида и хозяина (Yoshiyama et al., 2001). Кажется логичным, что в случае паразитизма вероятность ГП возрастает. Однако вывод о возможном ГП основан на сходстве MLE в системе паразит–хозяин, представленной только насекомыми. Нельзя исключить, что такой элемент *mariner* нес их гипотетический общий предок.

Исследования мобильных элементов в геномах насекомых позволили вывести транспозон *mariner* из генома муравья *Crematogaster cerasi* (Insecta: Neoptera), гомологичный *mariner* из генома *Giardia tigrina* (Garcia-Fernandez et al. 1995; Robertson 1997) на 92%. В этом случае предположили горизонтальный перенос *mariner* из генома *C. cerasi* в геном *D. tigrina*. Так объясняют не только высокий процент сходства исследуемых последовательностей, но и отличное от остальных турбеллярий представительство мобильных элементов ДНК *mariner* в геноме *G. tigrina*.

Имеющиеся на сегодняшний день свидетельства горизонтального переноса между эукариотами косвенные, и ни доказать, ни опровергнуть предположение о том, что транспозон *mariner* мог горизонтально перенестись в представленных системах на сегодняшний день невозможно.

В настоящей работе использован паразит с широким кругом хозяев. Проверили, присутствуют ли гомологи *hemar1* в геномах разных категорий хозяев *H. elongata* (рис. 15). Слабый сигнал гибридизации *Hem1* с геномной ДНК

L. saxatilis и *L. littorea* обнаружен, но амплификация консервативного участка транспозазы не выявила характерную для Hem1 зону (500 н.п.) ни в одном из геномов литторин. Наличие же высокомолекулярных мажорных зон (рис. 15, А) говорит о том, что если эти геномы и несут копии *mariner*, то их последовательности отличны от Hem1. Таким образом, *hemar1* не является основным (мажорным) MLE в геномах литорин (брюхоногих моллюсков) и тем более в геномах других хозяев (двустворчатых моллюсков и птиц). Нет оснований предполагать недавний ГП в сложной паразит-хозяинной системе исследованного вида трематод. Сравнение же последовательностей *mariner* беспозвоночных с Hem1 методами биоинформатики выявляет группы, которые скорее свидетельствуют о вертикальном наследовании фрагмента с последующим исчезновением у одних видов и размножением отдельных копий у других (рис. 14).

По результатам дот-гибридизации *hemar* едва выявляется в геномах моллюсков, однако при ПЦР на соответствующих праймерах продукт вполне очевиден, хотя и с отличной от *hemar* молекулярной массой. Мы клонировали, секвенировали и проанализировали продукт 784 н.п. из генома *Littorina littorea* (Litolit_C1). Продукт получен на праймерах Mar124F и Mar286R, специфичных для *mariner* (табл. 3) и содержит их по концам. Выравнивание Litolit_C1 программой BLAST против базы данных геномов беспозвоночных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>) показало сходство с геном SETMAR *Aplysia californica* (Gastropoda; Heterobranchia). Выравнивание программой ClustalW2 не выявило значимого сходства между Litolit_C1 и Hem 1, 2, 3, не говоря уже о полноразмерном *hemar*. Litolit_C1 не принадлежит семейству *capitate*. Большинство клонированных MLE моллюсков domestифицированы и слиты с геном SET. По имеющимся в нашем распоряжении данным, мы классифицируем Litolit_C1 как фрагмент SETMAR псевдогена.

Из MLE хозяев *H. elongata* пока что клонирована только последовательность Litolit_C1 *L. littorea*. Возможно клонирование и анализ всех

ПЦР зон всех хозяев *H. elongata*. Однако, данные дот-блота говорят о том, что даже исчерпывающее клонирование не изменит основного вывода: *Hemar1* паразита не является основным MLE в геномах хозяев. Возможно, данные для сравнения всех MLE животных появятся в результате стремительно прогрессирующего секвенирования геномов. Пока же недавнее появление ГП *mariner* в животных-хозяевах, вовлеченных в жизненный цикл трематоды *H. elongata* представляется событием маловероятным.

Векторы на основе транспозонов

Возможен ли в принципе ГП с помощью векторов на основе ДНК-транспозонов? Некоторое представление об этом могут дать генно-инженерные эксперименты *in vitro*. Транспозон, утративший свою транспозиционную активность, не может ни «вырезаться», ни успешно транспонироваться и «вставиться» в матричную ДНК. Как мы уже отмечали выше, подавляющее большинство мобильных элементов, как транспозонов, так ретротранспозонов в геноме инактивированы из-за наличия у них нуклеотидных замен, приводящих к потере функции (рис. 10, 11). Внесение же замен положительного знака, восстанавливающих ORF, может восстановить утраченную способность транспозона к перемещению. Так, *in vitro* реактивированный транспозон семейства *Tc1/mariner* из генома *Drosophila mauritiana* эффективно и стабильно, без потерь при пролиферации, трансформирует культуру клеток крысы (Harris et al., 2002). Реактивированный *TcI* транспозон из геномов рыб стал эффективным вектором для культур клеток человека (Ivics et al., 1997). Этот вектор получил название Спящая Красавица – *Sleeping Beauty* (SB). Вектор, основанный на реактивированном транспозоне семейства *Tc1/mariner* из генома лягушки, эффективен для *in vitro* переноса генов в межвидовой системе, включающей клеточную культуру рыб, амфибий и млекопитающих и стал новым инструментом клеточной инженерии (Miskey et al., 2005). Уже доказано, что SB вектор может стабильно встраивать гены, при этом, встроенные гены

наследуются через гаметы. Так получены трансгенные мыши, несущие ген GFP (Green Fluorescent Protein – зеленый флуоресцентный белок), впервые выделенный из медузы *Aequorea victoria* (Keng et al., 2005).

Внесение мутаций в копию транспозона и запрет на дальнейшую транспозицию являются частью механизма контроля копийности, позволяющего геному избежать бесконтрольной мультипликации мобильных элементов, сохраняя тем самым свою стабильность (Lerat et al., 2000). Однако, учитывая, что накопление мутаций стохастично, вероятно и появление мутаций положительного знака, приводящих к реактивации транспозона. Способность же ДНК-транспозонов не только встраиваться в «чужой» геном, но и сохраняться в нем в процессе пролиферации, передаваясь дочерним особям при размножении, служит важным, но косвенным, доказательством того, что активная копия транспозона может быть горизонтально перенесена и сохранена затем в геноме в чреде поколений. Динамический же характер генома предполагает существование в системе обратных связей, то есть инактивации и реактивации. Таким образом, формальный процент сходства последовательностей транспозонов мало говорит об их происхождении, поскольку учитывает лишь настоящее состояние элемента, который мог сильно видоизмениться с течением времени.

Гипотеза ГП, учитывающая только степень сходства отдельных MLE двух организмов, кажется несостоятельной. Спорадическое распределение MLE, и в частности *mariner*, по эволюционному дереву может объясняться общепринятыми механизмами вертикальной эволюции (раздел 3.2, рис. 14) и предположение о ГП, даже при наличии высокого сходства отдельных MLE, кажется избыточным.

Для достоверного сравнения необходимы не отдельные представители MLE, а сравнение всех наборов MLE двух организмов. Очень скоро, с увеличением количества прочитанных геномов, такие данные станут доступны научному сообществу и будут исследованы методами биоинформатики.

Транспозоны внутри генома и связь с типом размножения

Существует мнение, что количество и разнообразие ДНК-транспозонов и ретротранспозонов может коррелировать с типом размножения. Основанием для этого вывода служат исследования коловраток подкласса *Bdelloidea*, демонстрирующих высокое разнообразие ДНК-транспозонов при полном отсутствии ретропозонов. *Bdelloidea* размножаются партеногенетически, причем мейоз у них может полностью отсутствовать, о чем свидетельствуют и данные молекулярно-генетического анализа (Hickey, 1982). Анализ основных типов ДНК-транспозонов, ретропозонов и ретротранспозонов у представителей 24 типов животных показал повсеместное распространение ретропозонов в животном царстве за исключением размножающихся бесполым путем коловраток. Это позволило предположить, что ретропозоны — это ядерные паразиты, передающиеся половым путем, коловратки же, избежали заражения за счет приобретенного бесполого размножения (Arkhipova, Meselson, 2000). Именно эти соображения заставили нас обратить внимание на ДНК-транспозоны партенит.

Нет, однако, геномов без ДНК транспозонов. Транспозоны активно участвуют в разделении генома на хромосомные домены с определенными эпигенетическими метками (модификациями ДНК и гистонов) и транскрипционной активностью. Эпигенетические метки наследуемы и обычно стабильны, но именно они могут подвергаться динамическим изменениям в ответ на изменения среды и генетический стресс, такой как межвидовая гибридизация или полиплоидизация. Это может способствовать перемещению и амплификации транспозонов, приводя к структурным и эпигенетическим перестройкам генома, обеспечивая материал для образования новых хромосомных доменов и новых регуляторных цепей в процессе естественной селекции (Feschotte, Pritham, 2007).

Благодаря своей структуре, транспозоны выступают как регуляторы генной экспрессии, представляя собой “подвижные мишени” интерферирующих РНК, коротких (20–50 п.н.) двунитевых РНК, подавляющих экспрессию гена-мишени, либо модулирующих его транскрипцию. Повторенность транспозонов в геноме

обеспечивает множество мест посадки интерферирующих РНК в разных локусах, что приводит к модуляции экспрессии кодирующих последовательностей (Abrusan, Krambeck, 2006).

В геноме можно проследить следы перемещения транспозонов. Кажется, что не только транспозаза ДНК-транспозонов, но и их «следы» становятся полезны для генома. Так была выдвинута гипотеза (Lerat et al., 2000), что способность транспозазы распознавать и воздействовать (*act in trans*) на множество последовательностей в разных участках генома, стало основной причиной, позволившей транспозонам сохраниться в геноме эукариот. Действительно, используя транспозазу конкретного ДНК-транспозона как собственный фермент, у генома появляется возможность избирательно задействовать часть уже готовой сети сайтов связывания в геноме – «следов» транспозонов. Возникли и гены, в состав которых входят транспозазные домены мобильных элементов (табл. 5).

Так ген *SETMAR*, участвующий в каскаде репарации двойных разрывов ДНК, произошел от транспозазы *mariner* (Liu et.al., 2007). Ярким примером доместификации транспозонов служит V(D)J рекомбинация, в процессе которой образуется почти бесконечное разнообразие антител, и рассматриваемая как решающий момент в эволюции адаптивной иммунной системы челюстных позвоночных. При этом домен Rag1 высоко гомологичен транспозазе семейства ДНК-транспозонов *transib*, который идентифицирован в геномах беспозвоночных, но не был найден у позвоночных (Cooper, Alder, 2006).

Таблица 5. Мобильные элементы и произошедшие от них гены

Родственные транспозоны	Название гена	Функция гена	Вид/ распростране ние	Домены, произошед шие от транспозаз ы
Tc1/mariner/ pogo	CENP-B	Связывает центромерный хроматин, связывает CENP-B бокс в районе альфа сателлита	Млекопитаю щие	DBD (CENPB) + core
	SETMAR	Специфично связывает ДНК, метилирует гистоны H3 в позиции K 36	Человекообра зные (обезьяны)	DBD (HTH) + core
hAT	Daysleeper	Необходим для развития растений, специфично связывается выше гена Ku70, возможно, является транскрипционным фактором	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DBD (BED) + core + hATC
hAT\Charlie1	Buster1 (ZBED5)	Репрессор транскрипции, модулирующий интерферон- опосредованный апоптоз, объединяется с участком белка	Млекопитаю щие	DBD (BED) + core + hATC
Transib	RAG1	Взаимодействует с RAG2, катализируя V(D)J рекомбинацию в Т и В- лимфоцитах	<i>Homo sapiens</i> / Челюстные позвоночные	DBD? + core
P element	CDC-14B	Ингибитор перехода G1/S фаз клеточного цикла, необходимый элемент, стабилизирующий геном	<i>Caenorhabditi s elegans</i>	DBD (THAPx2)

Вырезание и встраивание транспозонов также оказывает серьезное воздействие на геном, приводя к модификации экспрессии генов и геномным перестройкам. Само вырезание транспозона зачастую несовершенно и оставляет за собой «след» — часть последовательности транспозона, влияющей на

фланкирующие районы матричной ДНК. Уровень мутаций индуцируемых таким образом транспозонами может до тысячи раз превышает уровень спонтанных мутаций, характерных для вида (Koga et. al., 2006). Таким образом, транспозоны выступают как активные мутаторы, необходимые для создания генетического разнообразия.

Клональная изменчивость партенит

Источник генетической variability эукариот, обладающих бесполом размножением, и выявление последовательностей, определяющих такое разнообразие, стало актуальной, но пока еще нерешенной задачей биологии генома. Использование AFLP, TID и подобных подходов дает высокую воспроизводимость результатов и позволяет работать с пикограммовыми количествами ДНК. В настоящей работе методом AFLP подтвержден факт генетической variability клональных популяций партенит трематод *Himasthla elongata*, наличие которого предполагали зоологические данные (Левакин и др., 2013; Levakin et al., 2013). Установлено, что уровень межклональной variability превосходит уровень клональной, однако даже внутри клона церкарий выявлена variability зон деления продуктов AFLP. Таким образом, в ходе развития партенит *H. elongata* происходит реорганизация генома, служащая источником клональной variability партенит и производимых ими церкарий. Фенотипическим проявлением этой variability, по-видимому, и является обнаруженное разнообразие поведенческих реакций и инвазионной способности церкарий, принадлежащих одному клону.

Использование праймера к консервативной последовательности *hemar1* при постановке TID позволяет предполагать участие последовательности *hemar1* в индукции генетической variability *H. elongata*. Распределение последовательностей, амплифицируемых с праймера к консервативному участку транспозазы *hemarI* variability как на внутри-, так и на межклональном уровне

(рис.18, 19). Выявлены и высоко консервативные полосы, сохраняющие свое положение в ряду экспериментов на разных особях церкарий как на внутри- так и на межклональном уровне. Использование последовательности транспозона как сайта посадки праймера при TID существенно повысило гетерогенность зон разделения амплификатов по сравнению с AFLP. Таким образом, есть основания полагать, что последовательность транспозона *hemar1* вносит вклад в формирование генетической variability партенит и церкарий. В транскриптоме церкарий с помощью *Hemar1*-специфичных праймеров выявили транскрипцию *mariner* (рис. 20), но клонирование и секвенирование активной копии *mariner* является предметом дальнейшей работы.

Полученные нами материалы не позволяют говорить об исключительном участии ДНК-транспозона *hemar* в формировании клональной изменчивости партенит и церкарий трематод. Доказана только возможность его участия. Другие МЭ также могут вносить вклад в создание клональной изменчивости и их выявление также представляет предмет дальнейшей работы. Не может не наводить на размышления необходимость транспозаз, в частности *mariner*, в репарации двойных разрывов ДНК (Liu et.al., 2007), в V(D)J рекомбинации (Cooper, Alder, 2006). Сейчас это рассматривают как пример доместификации транспозонов. Однако именно такого рода процессы могут обеспечить variability поверхностных антигенов необходимых для успешной инвазии паразита.

Настоящее исследование проводили на представителе группы Trematoda, которая является одной из наиболее успешных и широко распространенных среди паразитических червей. Особый интерес к трематодам обусловлен тем, что многие их виды являются причиной тяжелых заболеваний человека и животных (например, шистосоматоз, описторхоз, метагонимоз, эхиностоматозы), связанных с инвазивным поражением различных органов и вызывающих в ряде случаев тяжелые осложнения. Наличие партеногенетических стадий развития (т.е. отсутствие мейоза) и клональной изменчивости у *H. elongata* делает ее

подходящим модельным объектом для изучения транспозонов, тем более что этот вид не является опасным для человека. Данные, которые получены и будут получены в результате исследования клональной изменчивости *H. elongata*, могут быть экстраполированы на других представителей семейства Echinostomatidae и трематод в целом. Клональная изменчивость 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. Понимание механизма формирования генетической изменчивости этих паразитов будет способствовать созданию антипаразитарных лекарственных средств нового поколения.

ВЫВОДЫ

1. В геноме трематоды *Himasthla elongata* выявлен полноразмерный транспозон *hemarI*. Элемент *hemarI* относится к ДНК-транспозонам семейства Tc1/mariner и принадлежит подсемейству *capitata*.
2. Элемент *hemarI* распределен в геноме дисперсно с отдельными кластерами. Его копии составляют приблизительно 0.01% от генома трематоды.
3. Данные ПЦР анализа и саузерн гибридизации свидетельствуют об отсутствии недавнего горизонтального переноса в системах хозяин-паразит, формируемых на разных стадиях жизненного цикла *H. elongata*.
4. Доказан факт генетической вариабельности партенит *H. elongata*. Метод AFLP (amplified fragment length polymorphism) позволил установить клональную вариабельность церкарий и патенит трематоды.
5. Метод TID (transposon insertion display), основанный на *hemarI*-специфичном праймере, увеличивает гетерогенность зон амплификатов по сравнению с AFLP. Это позволяет предположить участие последовательности транспозона *hemarI* в формировании генетической вариабельности партенит.

Цитированная литература

1. Галактионов Н.К., Галактионов К.В., Скирниссон К., Регель К.В., Атрашкевич Г.И., Орловская О.М. 2009. Использование молекулярных маркеров для уточнения видовых статусов и видовой принадлежности спороцист и церкарий некоторых рениколид (Trematoda, Renicolidae). В кн.: Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке, изд. Ин-та систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, 62—65.
2. Галактионов Н.К., О.И. Подгорная, А.В. Федоров, 2009. Характеристика транспозона *marginer* из генома плоского паразитического червя *Himasthla elongata*. Цитология: 51 (11): 924—928
3. Жимулев И. Ф. 2007. Общая и молекулярная генетика. Сибирское университетское издательство
4. Левакин И.А., Лосев Е.А., Завирский Я.В., Галактионов К.В. 2013. Клональная изменчивость времени жизни церкарий *Himasthla elongata* (Trematoda: Echinostomatidae). Паразитология 47 (5): 353-360
5. Подгорная О. И., Галактионов Н. К., 2009. Мобильные элементы как потенциальные векторы горизонтального переноса генетической информации в системах паразит-хозяин. Труды зоологического института РАН: 313 (3): 283—296
6. Прокофьев В.В., Левакин И.А., Лосев Е.А., Завирский Я.В., Галактионов К.В. 2011. Клональная изменчивость в проявлении гео- и фотореакций у церкарий *Himasthla elongata* (Trematoda: Echinostomatidae). Паразитология, 45 (5): 345-357.
7. Соловьева А.И., Галактионов Н.К., Подгорная О.И.. 2013. Ретротранспозон класса LINE является компонентом паттерна полиморфных фрагментов партенит трематоды *Himasthla elongata*. Цитология. 55(7): 492—500

8. Федоров А. В. 2008. Регуляция транскрипции ретротранспозонов LINE1 млекопитающих. Цитология. 50 (12): 1011–1022
9. Халтурин К. В., Михайлова Н. А., Гранович А. И. 2000. Генетическая неоднородность природных популяций партенит *Microphallus piriformes* и *M. pygmaeus* (Trematoda: Microphallidae). Паразитология. 34 (6): 486-501
10. Alzohairy AM, Gyulai G, Jansen RK, Bahieldin A. 2013. Transposable elements domesticated and neofunctionalized by eukaryotic genomes. Plasmid. Jan;69(1):1-15.
11. Arkhipova I, Meselson M. 2000. Transposable elements in sexual and ancient asexual taxa. PNAS. 97(26): 14473-14477
12. Arkhipova IR, Meselson M. 2005. Diverse DNA transposons in rotifers of the class Bdelloidea. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(33):11781-6
13. Barbara McClintock. Controlling elements and the gene. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1956;21:197-216.
14. Barbara McClintock. The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. Proc Natl Acad Sci U S A. 1950 Jun; 36(6): 344–355.
15. Bayne CJ, Grevelding CG. 2003. Cloning of *Schistosoma mansoni* sporocysts in vitro and detection of genetic heterogeneity among individuals within clones. J Parasitol. 89(5):1056-1060.
16. Behura SK, 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.
17. Behura SK. 2012. Individual analysis of transposon polymorphisms by AFLP. Methods Mol Biol. 859:155-167.
18. Belfort M, Reaban ME, Coetzee T, Dalgaard JZ. 1989. Prokaryotic introns and inteins: a panoply of form and function. Gene. 15;82(1):5-30.
19. Belgrader P, Siegel AJ, Berezney R. 1991. A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix. J. Cell Sci. 98: 281—291.

20. Berg DE, Howe MM, editors. 1989. Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington DC. 347 pp.
21. BITs 2d Annual World Congress of Marine Biotechnology-2013 (WCMB-2013). Hangzhou, China September 23-25, 2013.
22. Bleykasten-Grosshans C1, Neuvéglise C. 2011. Transposable elements in yeasts. *C R Biol.* Aug-Sep;334(8-9):679-86.
23. Botstein D, White RL, Skolnick MH, Davis RW (1980) Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331
24. Bourc'his D., Bestor T. H. 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature.* 431 : 96—99.
25. Brown TA. 2002. Group II intron retroelements: function and diversity in Genomes. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss. 291 pp.
26. Capy P., Bazin C., Higuët D., Langin T. 1998. Dynamics and evolution of transposable elements. New York: Chapman of Hall. 197 pp.
27. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. 1997. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 401 pp.
28. Craig NL. Craigie R. Gellert M.; Lambowitz AM. 2002. Mobile DNA II. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol. Press. 371 pp.
29. Cremer T, Cremer C. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet.* 2(4):292-301
30. Cribb TH, Bray RA, Olson PD, Littlewood DT. 2003. Life cycle evolution in the digenea: a new perspective from phylogeny. *Adv Parasitol.* 54:197-254.
31. de Souza FS, Franchini LF, Rubinstein M. 2013. Exaptation of transposable elements into novel cis-regulatory elements: is the evidence always strong? *Mol Biol Evol.* 30(6):1239-51
32. DeBerardinis RJ, Kazazian HH Jr. 1999. Analysis of the promoter from an expanding mouse retrotransposon subfamily. *Genomics.* 15;56(3):317-23.

33. Deininger PL, Moran JV, Batzer MA, Kazazian HH Jr. 2003. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev.* 13(6):651-8.
34. Dewannieux M., Esnault C., Heidmann T. 2003. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat. Genet.* 35 : 41—48.
35. Doak TG, Doerder FP, Jahn CL, Herrick G. 1994. A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 942-946.
36. Dobrovolskij AA & Ataev GL. 2003. The nature of reproduction of trematodes rediae and sporocysts. In: Combes C, Jourdane J, editors. *Hommage a` Louis Euzet — taxonomy, ecology, and evolution of metazoan parasites*, vol. 1. Perpignan, Presses Universitaires de Perpignan. p. 273–290
37. Doolittle W.F. and Sapienza C. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, 284: 601-603.
38. Doolittle WF. 2013. Is junk DNA bunk? A critique of ENCODE. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2;110(14):5294-300.
39. Drew AC, Brindley PJ. 1995. Female-specific sequences isolated from *Schistosoma mansoni* by representational difference analysis. *Mol Biochem Parasitol.* 71(2):173-181.
40. Eickbush TH, Jamburuthugoda VK. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. 2008. *Virus Res.* 134(1-2):221-34.
41. Elgar G1, Vavouri T. 2008. *Trends Genet.* Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. 24(7):344-52.
42. Enukashvily NI, Donev R, Waisertreiger IS, Podgornaya OI. 2007. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells. *Cytogenet Genome Res.* 118(1):42-54.
43. Enukashvily NI, Malashicheva AB, Waisertreiger IS. 2009. Satellite DNA spatial localization and transcriptional activity in mouse embryonic E-14 and IOUD2 stem cells. *Cytogenet Genome Res.* 124(3-4):277-87

44. Enukashvily NI, Ponomartsev NV. 2013. Mammalian satellite DNA: a speaking dumb. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 90:31-65.
45. Federoff N.V. 1994. McClintock B (June 16, 1902- September 2, 1992). *Genetics.* 136: 1-10
46. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH Jr, Boeke JD. 1996. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell.* 29;87(5):905-16.
47. Feschotte C. and Pritham E. J. 2007. DNA Transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review of Genetics,* 41: 331–368.
48. Flavell, A., and D. Ish-Horowicz, 1981 Extrachromosomal circular copies of the eukaryotic transposable element copia in cultured *Drosophila* cells. *Nature* 292: 591-5.
49. Flavell, A., and D. Ish-Horowicz, 1983 The origin of extrachromosomal circular copia elements. *Cell* 34: 415-9.
50. Flavell, A., S. Ruby, J. Toole, B. Roberts and G. Rubin, 1980 Translation and developmental regulation of RNA encoded by the eukaryotic transposable element copia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7107-11.
51. Frascaroli E, Schrag TA, Melchinger AE. 2013. Genetic diversity analysis of elite European maize (*Zea mays* L.) inbred lines using AFLP, SSR, and SNP markers reveals ascertainment bias for a subset of SNPs. *Theor Appl Genet.* 126(1): 133-41
52. Frazer KA. 2012. Decoding the human genome. *Genome Res.* 22(9):1599-601.
53. Frøkjær-Jensen C, Davis MW, Sarov M, Taylor J, Flibotte S, LaBella M, Pozniakovsky A, Moerman DG, Jorgensen EM. 2014. Random and targeted transgene insertion in *Caenorhabditis elegans* using a modified Mos1 transposon. *Nat Methods.* 11(5):529-34

54. Fujino K, Sekiguchi H. 2011. Transposition behavior of nonautonomous a hAT superfamily transposon nDart in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Genet Genomics*. 286(2):135-42.
55. Furano AV, Robb SM, Robb FT. 1988. The structure of the regulatory region of the rat L1 (L1Rn, long interspersed repeated) DNA family of transposable elements. *Nucleic Acids Res*. 11;16(19):9215-31.
56. Furano AV. 2000. The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 64:255-94.
57. Galaktionov K.V., Dobrovolskiy A.A. 2003. The biology and evolution of trematodes. An essay on the biology, morphology, lifecycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. 579 pp.
58. Galaktionov KV. 2001. Parasites of common animals and animals of market value. In: Berger V, Dahle S (eds) *White Sea, ecology and environment*. Derzsavets, St. Petersburg, p 95–110
59. Galaktionov N.K., Solovyeva A.I., Fedorov A.V., Podgornaya O.I. Trematode *Himasthla elongata* mariner element (Hemar): structure and applications. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2014, 322: 142–155.
60. Garcia-Fernàndez J, Bayascas-Ramírez JR, Marfany G, Muñoz-Mármol AM, Casali A, Baguñà J, Saló E. 1995. High copy number of highly similar mariner-like transposons in planarian (Platyhelminthe): evidence for a trans-phyla horizontal transfer. *Mol. Biol. Evol*. 12:421-431.
61. Gibbs R. A., Weinstock G. M., Metzker M. L., Muzny D. M., Sodergren E. J. et al. 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 428 : 493—521.
62. Gibson DI, Bray RA. 1994. The evolutionary expansion and host-parasite relationships of the Digenea. *Int J Parasitol*. 24(8):1213-1226.

63. Graur D, Zheng Y, Azevedo RB. 2015. An evolutionary classification of genomic function. *Genome Biol Evol.* [Epub ahead of print]
64. Gregory, T.R. 2013. Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com>.
65. Grevelding CG. 1999. Genomic instability in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 101:207-216
66. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. 2000. An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition: Molecular nature of transposable elements in eukaryotes New York. pp. 186.
67. Hare EE, Johnston JS. 2011. Genome size determination using flow cytometry of propidium iodide-stained nuclei. *Methods Mol. Biol.* 772:3-12
68. Hartl D.L., Lohe A.R., Lozovskaya E.R., 1997b Modern thoughts of an ancient mariner: function, evolution, regulation // *Ann. Rev. Genet* 31:337-358
69. Havecker ER, Gao X, Voytas DF. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol.* 5(6):225.
70. Haymer D.S., Marsh J.L. 1986. Gem line and somatic instability in white mutant *Drosophila mauritiana* due to transposable element // *Dev. Genet.* 6: 281-291.
71. Hellen EH, Brookfield JF. 2013. Transposable element invasions. *Mob Genet Elements.* 1;3(1):e23920
72. Hickey DA. 1992. Evolutionary dynamics of transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. *Genetica.* 86(1-3):269-74
73. International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921
74. International Human Genome Sequencing Consortium. 2004 Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945
75. Ivics Z, Kaufman CD, Zayed H, Miskey C, Walisko O, Izsvák Z. 2004. The Sleeping Beauty transposable element: evolution, regulation and genetic applications. *Curr Issues Mol Biol.* 6(1):43-55.

76. Jacobson JW, Medhora MM, Hartl DL. 1986. Molecular structure of somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8684–8688
77. Jakobson J.V., Hartl D.L., 1985 Coupled instability of two X-linked genes in *Drosophila mauritiana*, germline and somatic instability // *Genetics* 111: 57-65
78. Janicki M, Rooke R, Yang G. 2011. Bioinformatics and genomic analysis of transposable elements in eukaryotic genomes. *Chromosome Res.* 19(6): 787-808.
79. Jeyaprakash A, Hoy MA. 1995. Complete sequence of a mariner transposable element from the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* isolated by an inverse PCR approach. *Insect Mol Biol.* 4(1):31-39
80. Jurka J, Kapitonov VV, Kohany O, Jurka MV. 2007. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 8:241-59.
81. Kapitonov VV, Jurka J. 2001. Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8714–19.
82. Kapitonov VV, Jurka J. 2008. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nat Rev Genet.* 9(5): 411-2
83. Karlsson E, Melhus A. 2006. Nontypeable *Haemophilus influenzae* strains with the capsule-associated insertion element IS1016 may mimic encapsulated strains. *APMIS.* 114(9):633-40.
84. Karlyshev AV, Pallen MJ, Wren BW. 2000. Single-primer PCR procedure for rapid identification of transposon insertion sites. *BioTechniques* 28: 1078–1082.
85. Kay GF. 1998. Xist and X chromosome inactivation. *Mol Cell Endocrinol.* 25; 140(1-2):71-6.
86. Kazazian HH Jr. 2004. Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science.* 12; 303: 1626–1632.

87. Kazazian HH, Jr . 2011. Mobile DNA: Finding Treasure in Junk. FT Press Science
88. Kidd, S., and M. Young, 1986 Transposon-dependent mutant phenotypes at the Notch locus of *Drosophila*. *Nature* 323: 89-91.
89. Kidwell MG. 1992a. Horizontal transfer of P elements and other short inverted repeat transposons. *Genetica*. 86:275-286.
90. Kidwell MG. 1992b. Horizontal transfer. *Curr. Opin. Genet.Dev.* 2: 868–873
91. Kim, A., E. Belyaeva and M. Aslanian, 1990. Autonomous transposition of gypsy mobile elements and genetic instability in *Drosophila melanogaster*. *Mol.Gen.Genet.*224:303-8.
92. Koehler AV, Poulin R. 2012. Clone-specific immune reactions in a trematode-crustacean system. *Parasitology* 139: 128-136
93. Koehler AV, Springer YP, Keeney DB, Poulin R. 2011. Intra- and interclonal phenotypic and genetic variability of the trematode *Maritrema novaezealandensis*. *Biological Journal of Linnaean Society* 103, 106-116.
94. Korsunen A, Chrisanfova G, Lopatkin A, Beer SA, Voronin M, Ryskov AP, Semyenova SK. 2012. Genetic differentiation of cercariae infrapopulations of the avian schistosome *Trichobilharzia szidati* based on RAPD markers and mitochondrial *cox1* gene. *Parasitol Res.* 110(2):833-841
95. Korsunen AV, Chrisanfova GG, Ryskov AP, Movsessian SO, Vasilyev VA, Semyenova SK. 2010. Detection of European *Trichobilharzia* schistosomes (*T. franki* , *T. szidati* , and *T. regenti*) based on novel genome sequences. *J Parasitol.* 96(4):802-806.
96. Kulpa D. A., Moran J. V. 2006. Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 655-660.
97. Lampe DJ, Grant TE, Robertson HM. 1998. Factors affecting transposition of the Himar1 mariner transposon in vitro. *Genetics*. 149(1): 179-87.

98. Lampe DJ, Walden KK, Robertson HM. 2001. Loss of transposase-DNA interaction may underlie the divergence of mariner family transposable elements and the ability of more than one mariner to occupy the same genome. *Mol Biol Evol.* 18(6): 954-961.
99. Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C. et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409: 860—921.
100. Lazarow K, Doll ML, Kunze R. 2013. Molecular biology of maize Ac/Ds elements: an overview. *Methods Mol Biol.* 1057:59-82.
101. Levakin IA, Losev EA, Nikolaev KE, Galaktionov KV. 2012. In vitro encystment of *Himasthla elongata* cercariae (Digenea, Echinostomatidae) in the haemolymph of blue mussels *Mytilus edulis* as a tool for assessing cercarial infectivity and molluscan susceptibility. *J Helminthol.* 30: 1-9.
102. Lohe AR, Hartl DL. 1996. Germline transformation of *Drosophila virilis* with the transposable element mariner. *Genetics* 143: 365-374.
103. López-Flores I, Garrido-Ramos MA. 2012. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dyn.* 7: 1-28.
104. LoVerde PT, Hirai H, Merrick JM, Lee NH, El-Sayed N. 2004. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. *Parasitol Int.* 53(2): 183-92.
105. Maher B. 2012. ENCODE: The human encyclopaedia. *Nature.* 489 (7414): 46-48
106. Mahillon J, Chandler M. 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 62: 725-774.
107. Maksakova IA, Zhang Y, Mager DL. 2009. Preferential epigenetic suppression of the autonomous MusD over the nonautonomous ETn mouse retrotransposons. *Mol Cell Biol.* 29(9): 2456-68
108. Mariyama K., Hartl D.L, 1991a. Evidence of interspecific transfer in the transposable element mariner between *Drosophila* and *Zaprionus*. *J. Mol. Evol.* 33: 514-524

109. Mariyama K., Hartl D.L, 1991b. Evlution of transposable element mariner in Drosophila species. *Genetics* 128: 319- 329
110. Masiga DK, Tait A, Turner CM. 2000. Amplified restriction fragment length polymorphism in parasite genetics. *Parasitol Today*. 16(8): 350-353
111. Mathias S. L., Scott A. F., Kazazian H. H., Jr., Boeke J. D., Gabriel A. 1991. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science*. 254: 1808—1810.
112. McDonald JF. 1993. Evolution and consequences of transposable elements. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 855-864.
113. Medhora M, Maruyama K, Hartl DL. 1991. Molecular and functional analysis of the mariner mutator element Mos1 in Drosophila. *Genetics*. 128(2): 311-8.
114. Medhora M.M., MacPeck A.H., Hartl D.L. 1998. Excision of Drosophila transposable element mariner: identification and characterisation of the Mos1 factor. *EMBO. J.* 7: 2185-2189.
115. Michel F, Umesono K, Ozeki H. 1989. Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns. *Gene*. 15;82(1):5-30
116. Michel F. 1995. Prokaryotic introns and inteins: a panoply of form and function. *J Bacteriol*. 177(14):3897-903.
117. Moran J. V., DeBerardinis R. J., Kazazian H. H., Jr. 1999. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science*. 283: 1530—1534.
118. Mueller UG, Wolfenbarger LL. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol*. 14(10): 389-394.
119. Muñoz-López M, García-Pérez JL. 2010. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*. 11; 2: 115–128.
120. Muñoz-López M, Siddique A, Bischerour J, Lorite P, Chalmers R, Palomeque T. 2008. Transposition of Mboumar-9: identification of a new naturally active mariner-familytransposon. *J Mol Biol*. 382(3): 567-72.

121. Musto H, Rodríguez-Maseda H, Alvarez F, Tort J. 1994. Possible implications of CpG avoidance in the flatworm *Schistosoma mansoni*. *J Mol Evol.* 38(1): 36-40
122. Nakashima, K., L. Yamada, Y. Satou, J. Azuma, N. Satoh. 2004. The evolutionary origin of animal cellulose synthase. *Dev. Genes Evol.* 214:81–88.
123. Nei M. and Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 333 pp.
124. Plasterk RH. 1993. Molecular mechanisms of transposition and its control. *Cell* 74: 781–786.
125. Pritham EJ, Feschotte C. 2007. Massive amplification of rolling-circle transposons in the lineage of the bat *Myotis lucifugus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6; 104(6):1895-900
126. Pritham EJ, Putliwala T, Feschotte C. 2007. Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene.* 390:3–17.
127. Radice AD, Bugaj B, Fitch DH, Emmons SW. 1994. Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish. *Mol. Gen. Genet.* 244: 606–612
128. Ray DA, Walker JA, Batzer MA. 2007. Mobile element-based forensic genomics. *Mutat Res.* 616(1-2): 24-33.
129. Rezende-Teixeira P, do Amaral JB, Siviero F, Machado-Santelli GM. 2012. Molecular characterization of a mariner-like element in the *Atta sexdens rubropilosa* genome. *Genet Mol Res.* 11(2): 1475-85.
130. Robart AR, Zimmerly S. Group II intron retroelements: function and diversity. *Cytogenet Genome Res.* 2005; 110(1-4):589-97.
131. Robertson HM and Lampe DJ. 1995a. Recent horizontal transfer of a mariner element between Diptera and Neuroptera. *Mol. Biol. Evol.* 12: 850-862.
132. Robertson HM and Lampe DJ. 1995b. Distribution of transposable elements in arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 40: 333-357.

133. Robertson HM, Asplund ML. 1996. Bmmar1: a basal lineage of the mariner family of transposable elements in the silkworm moth, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 945–954.
134. Robertson HM, MacLeod EG, 1993. Five major subfamilies of mariner transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly, and related arthropods. *Insect Mol. Biol.* 2: 125–139.
135. Robertson HM, Martos R. 1997a. Molecular evolution of the second ancient human mariner transposon, Hsmar2, illustrates patterns of neutral evolution in the human genome lineage. *Gene*. 205:219-28.
136. Robertson HM, Zumpano KL. 1997b. Molecular evolution of an ancient mariner transposon, Hsmar1, in the human genome. *Gene*. 205:203-217.
137. Robertson HM. 1993. The mariner transposable element is widespread in insects. *Nature*. 362: 241-245.
138. Robertson HM. 1995. The Tc1-mariner superfamily of transposons in animals. *J. Insect Physiol.* 41: 99–105
139. Robertson HM. 1997. Multiple Mariner transposons in flatworms and hydras are related to those of insects. *J Hered.* 88(3): 195-201
140. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*'. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1341 pp.
141. Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press. 573 pp.
142. Semyenova SK, Khrisanfova GG, Korsunenkov AV, Voronin MV, Beer SV, Vodyanitskaya SV, Serbina EA, Yurlova NI, Ryskov AP. 2007. Multilocus Variation in Cercariae, Parthenogenetic Progeny of Different Species of the Class Trematoda. *Doklady Biological Sciences*. 414: 235–238
143. Shalaby I, Gherbawy Y, Banaja A. 2011. Genetic diversity among *Schistosoma mansoni* population in the western region of Saudi Arabia. *Trop Biomed.* 28(1): 90-101.

144. Sintupachee S, Milne JR, Poonchaisri S, Baimai V, Kittayapong P. 2006. Closely related Wolbachia strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. *Microb Ecol.* 51(3): 294-301
145. Stocking C, Kozak CA. 2008. Murine endogenous retroviruses. *Cell Mol Life Sci*; 65(21):3383-98.
146. Swergold GD Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. 1990. *Mol Cell Biol.* 10(12):6718-29.
147. Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11030–11035.
148. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10): 2731-2739.
149. Thormann CE, Ferreira ME, Camargo LEA, Tivang JG, Osborn TC. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor Appl Genet.* 88: 973-980
150. Tolstenkov OO, Prokofiev VV, Terenina NB, Gustafsson MK. 2011. The neuro-muscular system in cercaria with different patterns of locomotion. *Parasitol Res.* 108(5):1219-1227.
151. Veitia RA, Veyrunes F, Bottani S, Birchler JA. 2015. X chromosome inactivation and active X upregulation in therian mammals: facts, questions, and hypotheses. *J Mol Cell Biol.* pii: mjv001. [Epub ahead of print]
152. Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* 23: 4407-4414.
153. Watanabe Y, Maekawa M. 2013. R/G-band boundaries: genomic instability and human disease. *Clin Chim Acta.* 18(419):108-12.

154. Waterston R. H., Lindblad-Toh K., Birney E., Rogers J., Abril J. E. et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420 : 520—562.
155. Webster P, Mansour TE, Bieber D. 1989. Isolation of a female-specific, highly repeated *Schistosoma mansoni* DNA probe and its use in an assay of cercarial sex. *Mol Biochem Parasitol*. 36(3):217-222.
156. Werren JH. 2011. Selfish genetic elements, genetic conflict, and evolutionary innovation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 28(108): Supplement 2
157. Wicker T1, Robertson JS, Schulze SR, Feltus FA, Magrini V, Morrison JA, Mardis ER, Wilson RK, Peterson DG, Paterson AH, Ivarie R. 2005. The repetitive landscape of the chicken genome. *Genome Res*. 15(1):126-36.
158. Wickstead B, Ersfeld K, Gull K. 2003. Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67(3):360-75
159. Williams JGK, Rafalski JA, Tingey SV. 1993. Genetic analysis using RAPD markers. *Meth Enzymol* 218: 704-780
160. Wutz A, Gribnau J. 2007. X inactivation Xplained. *Curr Opin Genet Dev*. 17(5):387-93.
161. Xing J, Witherspoon DJ, Ray DA, Batzer MA, Jorde LB. 2007. Mobile DNA elements in primate and human evolution. *Am J Phys Anthropol*. Suppl 45.
162. Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*. 13 : 335—340.

Благодарности

Приложение 1

Phylum	Class	Organism	Abbiviation	Accession N	P-Dis. (protein)	Ka	Ks	Ka/Ks	P-Value (Fisher)
Platyhelminthes	Trematoda	<i>Himasthla elongata</i>	Hemar1	JQ412055	0	1.00211	0.993195	1.00898	0.829533
			HEM.2	JX470541	0.007	1.05974	0.803043	1.31965	0.00226671
			HEM.3	JX470542	0.068	1.06623	0.79632	1.33895	0.00180258
	Turbellaria	<i>Girardia tigrina</i> *	G.tigrina.0	X80893.1	0.617	1.06113	0.778907	1.36233	0.00483808
			G.tigrina.1	X71979.1	0.617	1.01254	0.952717	1.0628	0.64797
			G.tigrina.2	X80776.1	0.631	0.984725	1.0655	0.924191	0.463022
			G.tigrina.3	X80897.1	0.624	0.95167	1.17004	0.813366	0.0133663
			G.tigrina_DTU51176	U51176.1	0.177	1.12416	0.639375	1.75822	8.35687e-007
			G.tigrina.5	X80896.1	0.624	1.04734	0.837958	1.24988	0.0341351
			G.tigrina_DTU51177	AAB61384.1	0.606	1.04734	0.837958	1.24988	0.0341351
			G.tigrina.7	X80777.1	0.617	1.05634	0.809226	1.30537	0.00790938
			G.tigrina.8	X80895.1	0.638	0.987789	1.04221	0.947785	0.493611
			G.tigrina.9	X80894.1	0.617	1.04635	0.83663	1.25068	0.0313673
			G.tigrina_DTU51174	AAB61383.1	0.638	1.04762	0.838698	1.2491	0.0367461
			G.tigrina_DTU51175	U51175.1	0.564	1.05471	0.813694	1.29621	0.0185079
			G.tigrina_DTU51173	U51173.1	0.676	1.01912	0.923181	1.10392	0.381639
		<i>Stylochus zebra</i>	S.zebra_SZU51169	U51169.1	0.676	0.995764	1.01605	0.980036	0.999995
			S.zebra.2	U51170.1	0.674	0.926387	1.25692	0.737029	0.00132392
		<i>Bdelloura candida</i>	B.candida	U51172.1	0.704	1.09529	0.70009	1.5645	1.43219e-005
Cnidaria	Hydrozoa	<i>Hydra vulgaris</i>	H.vulgaris	U51183.1	0.395	1.09683	0.700623	1.56551	3.97856e-005
		<i>Hydra magnipapillata</i>	H.magnipapillata.1	XM_002160004.1	0.411	1.07853	0.781893	1.37938	0.00362915
			H.magnipapillata.2	XM_002156792.1	0.4	1.01994	0.923978	1.10386	0.204838
			H.magnipapillata.3	XM_002169020.1	0.433	0.976989	1.09293	0.893916	0.347333
		<i>Hydra littoralis</i>	H.littoralis	U51179.1	0.613	1.00916	0.968363	1.04213	0.66876
Arthropoda	Insecta	<i>Ceratitis lineata</i>	Silverfish.8.7	L10498.1	0.599	0.993349	1.02217	0.971808	0.831485
			Silverfish.8.6	L10497.1	0.599	0.97258	1.09601	0.887382	0.284282
			Silverfish.8.2	L10493.1	0.693	1.05471	0.813694	1.29621	0.0185079
		<i>Forficula auricularia</i>	Ear.wig.5.1	L10473.1	0.37	1.0649	0.782253	1.36133	0.00323903
		<i>Nabis sp. HMR-1997a</i>	Damsel.bug.4	U91362.1	0.631	0.998826	1.00408	0.994765	1
		<i>Apis mellifera</i>	A.mellifera_LOC726675	XM_001122397.2	0.586	0.951155	1.19656	0.794909	0.0366545
			A.mellifera_LOC725635	XM_001121464.1	0.604	0.923975	1.28496	0.719069	0.000432031
			A.mellifera_LOC724198	XM_001119968.2	0.652	0.943229	1.19693	0.788041	0.0111759
			A.mellifera_LOC725514	XM_001121351.2	0.589	0.964636	1.13416	0.85053	0.119161
		<i>Epicauta funebris</i>	Blister.beetle.9	U91358.1	0.582	0.982092	1.07206	0.916083	0.495235
		<i>Bombyx mori</i>	Bmmar2	AF526192.1	0.632	1.04893	0.823716	1.27342	0.0312937
			B.mori_cnichmle	AF118671.1	0.632	1.04893	0.823716	1.27342	0.0312937
			B.mori_p2d1mle	AF118673.1	0.632	1.04893	0.823716	1.27342	0.0312937
			B.mori_BL124mle	AF118674.1	0.644	1.04893	0.823716	1.27342	0.0312937
			B.mori_1	AF141938.1	0.639	1.06033	0.785629	1.34966	0.010216
			B.mori_Tamilnadumle	AF118672.1	0.632	1.04284	0.847961	1.22982	0.100898
		<i>Plebeia frontalis</i>	Stingless.bee1.12	U91386.1	0.596	1.08225	0.717802	1.50772	0.00187899
		<i>Sitodiplosis mosellana</i>	S.mosellanamle.1	DQ315365.1	0.624	0.935271	1.24357	0.752083	0.174796
			S.mosellanamle.8	DQ315368.1	0.624	1.05224	0.825815	1.27418	0.136292
		<i>Pleistodontes addicotti</i>	P.addicotti_23.1	EF408937.1	0.613	0.938857	1.24637	0.753275	0.00360809
		<i>Mayetiola destructor</i>	Desmar1	U24436.1	0.592	0.975204	1.0835	0.900048	0.29531
		<i>Chrysops vittatus</i>	Deer.fly.9.1	L10499.1	0.625	0.956386	1.15676	0.826779	0.0948092
		<i>Phlebotomus papatasi</i>	P.papatasi_24.2	U04452.1	0.602	0.991384	1.02903	0.96342	0.828556
		<i>Andrena erigeniae</i>	Andrenid.bee.4	U91347.1	0.619	0.960728	1.12474	0.85418	0.114253
			Andrenid.bee.3	U91346.1	0.59	1.00868	0.973047	1.03663	0.670509
		<i>Tapinoma sessile</i>	T.sessile_16.8	U04454.1	0.604	1.03923	0.872926	1.19051	0.0910301

Сравнение эволюционных родственников (MLE) элемента *Hemar1* по белковым и нуклеотидным последовательностям коровой последовательности транспозазы.

Клонированную последовательность *Hemar1* используем как базовую для выравнивания; параметр для остальных MLE p-distances определяется по отношению к ней. Аминокислотную последовательность кода транспозазы определяли между консервативными мотивами WVPHEL и YSPDLAP. Эти мотивы соответствуют праймерам Mar124 и Mar276 (Табл. NN). Аминокислотные последовательности выравнивали программой ClustalW. Результаты представлены в столбце p-dist (protein). Цветовой код тот же, что на рис.7: розовый – плоские черви, зеленый – кишечнополостные, синий – насекомые. Нуклеотидные последовательности

MLE выровнены программой ClustalW и рассчитан уровень синонимичных и несинонимичных замен Ka/Ks. Значение Ka/Ks больше 1 (>1) трактуется как наличие позитивного селективного давления. Значение Ka/Ks ($=1$) означает нейтральную эволюцию или одинаковое количество позитивных и негативных замен. Значение Ka/Ks (< 1) означает селективное давление в сторону консервативности белковой последовательности.

Видно, что отношение Ka/Ks бессистемно варьирует между таксонами. Вероятно, *Hemar1* плоских червей трематод не может быть использован как базовый для такого рода сравнения. Такого рода сравнения используются в основном для белков и кодирующих их генов. Применимость их для некодирующей ДНК, к которым относится большинство транспозонов, находится под большим вопросом.

Приложение 2

<i>Mariner</i> element	Organism	P- distance		<i>Mariner</i> subfamily	Citation	Accession number
		Trase	ITR			
<i>Hemar1</i>	<i>Himasthla elongata</i>	0	0	<i>C. elegans</i>	Galaktionov et al. 2009	JQ41205
<i>Cemar1</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	0.784	0.669	<i>C. elegans</i>	Rezende-Teixeira et al., 2012	FO080164.2
<i>Armar1</i>	<i>Ascogaster reticulatus</i>	0.844	0.628	<i>irritians</i>		AB056895
<i>Ammar1</i>	<i>Apis mellifera</i>	0.936	0.911	<i>mellifera</i>		U19902
<i>G.tigrina.5</i>	<i>Girardia tigrina</i>	1.045	0.883	<i>mauritiana</i>	Robertson, 1993	X80896
<i>Hcmar1</i>	<i>Hyalophora cecropia</i>	1.076	0.844	<i>cecropia</i>	Rezende-Teixeira et al., 2012	M63844
<i>Camar1</i>	<i>Chymomyza amoena</i>	1.076	1.325	<i>capitata</i>		AY155491
<i>HimarI</i>	<i>Haematobia irritans</i>	1.104	1.266	<i>lineata</i>		U11645
<i>Bmmar1</i>	<i>Bombyx mori</i>	1.657	1.236	<i>mori</i>	Robertson, 1993	U47917.1
<i>Mos1</i>	<i>Drosophila mauritiana</i>	0.675	1.619	<i>mauritiana</i>		M14653

Сравнение инвертированных концевых повторов (ITR) и транспозазы полноразмерных MLE, наиболее близких к Hemar1 по параметру P-distance.

Из баз данных выбрали полноразмерные MLE наиболее похожие на Hemar1. Нуклеотидные последовательности отдельно ITR и отдельно транспозазы сравнивали программой ClustalW. Последовательности ITR и транспозазы Hemar1 выбраны как базовые. Анализ проведен программой MEGA5.

Приложение 3

>litomar

1	CCTCGCGAAT	GCACCTAGAT	TTGGGTGCCG	CATGAGCTCC	GGGAGGGTAA	GCAGATCCTG	60
61	CCCCACACGT	GACACCCGTT	GTGTTGCTTA	TGTGGTTACA	ATTCCGGTAA	ATAGTCTAAT	120
121	TCGTTAGGTC	ACATTTATGA	AAGGGAAGGG	GATTGTAGTT	ACAAAGTAAG	GAGCATATCC	180
181	GATATCATTT	GTGAAACGGT	TATTCCATAA	CAGTCAACCA	GCTCGTGCGG	CACCCAAATC	240
241	GGATCCCAGG	CCCGTCGACT	GCAGAGGCCT	GCATGCAAGC	TTTCCCTATA	GTGAGTCGTA	300
301	TTAGAGCTTG	GCGTAATCAT	GGTCATAGCT	GTTTCCTGTG	TGAAATTGTT	ATCCGCTCAC	360
361	AATTCACAC	AACATACGAG	CCGGAAGCAT	AAAGTGTAAG	GCCTGGGGTG	CCTAATGAGT	420
421	GAGCTAACTC	ACATTAATTG	CGTTGCGCTC	ACTGCCCCTG	TTCCAGTCGG	GAAACCTGTC	480
481	GTGCCAGCTG	CATTAATGAA	TCGGCCAACG	CGCGGGGAGA	GGCGGTTTGC	GTATTGGGCG	540
541	CTCTTCCGCT	TCCTCGCTCA	CTGACTCGCT	GCGCTCGGTC	GTTCGGCTGC	GGCGAGCGGT	600
601	ATCAGCTCAC	TCAAAGGCGG	GTAATACGG				631

Последовательность консервативного участка транспозазы транспозона Litolit_C1.

Последовательность амплифицирована праймерами Mar124F и Mar276R из геномной ДНК *Littorina littorea* и принадлежит к семейству транспозонов *mariner*.